

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física



**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE PLAGUICIDAS MEDIANTE
BIOMARCADORES MOLECULARES Y ENZIMÁTICOS**

MEMORIA PRESENTADA POR

DAVID LOZANO PANIAGUA

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: David Lozano Paniagua
ISBN: 978-84-9163-545-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48337>

El doctorando / *The doctoral candidate* **David Lozano Paniagua** y los directores de la tesis
/ *and the thesis supervisors* **Antonio F. Hernández Jérez** y **Antonio Pla Martínez**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

We guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work carried out by the PhD candidate under our direction as thesis supervisors and, as far as our knowledge reaches, has respected the rights of other authors to be cited in relation to their results or publications.

Granada, 13 de Junio de 2017

Directores de la Tesis / *Thesis supervisors*

Doctorando / *Doctoral candidate*

Dr. Antonio F. Hernández Jérez

Dr. Antonio Pla Martínez

David Lozano Paniagua

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el marco del Proyecto de Investigación “Evaluación de la toxicidad subclínica del uso de plaguicidas mediante biomarcadores moleculares, enzimáticos y genéticos en poblaciones expuestas” financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia, referencia P09-CVI-5062) y cuyo investigador principal ha sido el Profesor Antonio F. Hernández Jerez.

Parte de los resultados obtenidos en dicho trabajo han sido publicados en la siguiente revista, incluida en *JCR Science Citation Index*:

Lozano-Paniagua, D., Gómez-Martín, A., Gil, F., Parrón, T., Alarcón, R., Requena, M., Lacasaña, M., Hernández, A.F., 2016. Activity and determinants of cholinesterases and paraoxonase-1 in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Chemico-Biological Interactions*; 259, 160-167. doi:10.1016/j.cbi.2016.04.008. PMID: 27062891.

AGRADECIMIENTOS

Con la redacción de esta memoria se pone el punto final a una etapa en la que tengo mucho que agradecer a todas aquellas personas que a lo largo de todos estos años han estado, de una u otra forma, a mi lado, ofreciéndome su ayuda y comprensión, y que en cierto modo forman parte de esta Tesis Doctoral. Es por eso que no quisiera dejar pasar esta oportunidad para hacerlo.

En primer lugar quisiera mostrar mi enorme gratitud a mis directores. Al Profesor Antonio F. Hernández, *alma mater* y soporte de este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar en algo que me apasiona y con infinita paciencia confiar en mí. Gracias a su persistencia este proyecto se ha podido materializar. Al Doctor Antonio Pla, Codirector de esta Tesis Doctoral, por su disponibilidad y sus enseñanzas magistrales.

A todos los miembros del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física, con los que he compartido durante los últimos años mis ilusiones, trabajo y esfuerzo. Todos ellos han sido un gran apoyo y han hecho posible que el lugar de trabajo se convierta en algo más que eso. A Marga, la cual ha sido como una madre desde el primer día que entré en el Departamento. A Lourdes por sus incansables ratos de laboratorio y su infinita predisposición a echarme una mano en cualquier momento. A Olga que, desde aquellas sesiones maratónicas de trabajo de laboratorio, se ha convertido en una gran amiga y que ha supuesto un gran estímulo para finalizar este trabajo.

A todos los compañeros de laboratorio Isa, Pablo, María Martín, María Jesús, Ana, María Meaños, Gema y un largo etcétera, con los que tan buenos momentos he vivido, y de los que he recibido tanto apoyo y cariño durante estos años de investigación. A Antonio Gómez, compañero de fatigas durante todos estos años y María Saiz, que me acogió sin ningún reparo en la fase final y ha sido un apoyo fundamental para terminar este proyecto. Gracias “precarios”.

A toda mi familia, sin los que nada de esto hubiera sido posible. A mis padres, por darme siempre su apoyo incondicional y cariño desde el día en que nació. Gracias por haber luchado tanto para

que me convirtiera en la persona que hoy en día soy. A mi hermano, por hacerme ver la vida siempre con un prisma diferente y sin el que no hubiera llegado hasta donde he llegado.

Por último, no puedo olvidarme de Lola, mi compañera, por su ánimo, cariño y comprensión durante todo estos años. Este trabajo no hubiera sido posible sin ti. Gracias por haber estado ahí, lo cual no es fácil.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

AChE: Acetilcolinesterasa

ASCh: Acetiltiocolina

AEPLA: Asociación empresarial de fabricantes de productos fitosanitarios en España

ALT: Alanina aminotransferasa

AREasa: Arilesterasa

AST: Aspartato aminotransferasa

BChE: Colinesterasa plasmática

BeChE: Benzoilcolinesterasa plasmática

b-FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BuChE: Butirilcolinesterasa plasmática

CAT: Catalasa

CB: Carbamato

CL50: Concentración letal media

CYP450: Citocromo P450

DAP: Dialquilfosfato

DEP: Dietilfosfato

DEs: Dietilos

DEDTP: Dietilditiofosfato

DETP: Dietiltiofosfato

DL50: Dosis letal media

DMP: Dimetilfosfato

DMs: Dimetilos

DMDTP: Dimetilditiofosfato

DMTP: Dimetiltiofosfato

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DZOasa: Diazoxonasa (actividad de la PON1)

DHCasa: Dihidrocumarasa (actividad lactonasa de la PON1)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

SCh: Tiocolina

EPI: Equipo de protección individual

FAL: Fosfatasa alcalina

FRAP/FRAS: Capacidad de reducción férrica del plasma/suero

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocito

GGT: Gamma glutamil transferasa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-s-transferasa

GST- α : Glutación-S transferasa alfa

Hb: Hemoglobina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HRP: Peroxidasa de rábano

IFG: Índice de filtración glomerular

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

IP-10: Proteína 10 inducida por IFN- γ

LMR: Límites máximos de residuos

MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (antes MAGRAMA)

MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

MDA: Aldehído malónico.

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa

MIP-1 β : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta

NGAL: Lipocaina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

OC: Organoclorado

OMS: Organización Mundial de la Salud

OP: Organofosforado

OPN: Osteopontina

OTC: Ornitinatrascarbamilasa

PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB

pNF-H: Neurofilamento fosforilado de alto peso molecular

POasa: Paraoxonasa (basal)

PON 1: Paroxonasa-1

PYR: Piretroide

RANTES: Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SHT: Grupos tiol totales

SOD: Superoxido dismutasa

ssPOasa: Paraoxonasa (estimulada con sal)

ST-PE: Complejo estreptavidina-ficoeritrina

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TFF3: Factor trébol 3

TMB: Tetrametilbencidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UHPLC-QqQ-MS/MS: Cromatografía líquida de ultra alta resolución con espectrómetro tandem de masas de triple cuadrupolo

US-EPA: Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (también EPA)

UV/VIS: Ultravioleta/visible

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

β 2M: Beta-2 microglobulina

ÍNDICE

Capítulo 1: RESUMEN / ABSTRACT	1
Capítulo 2: INTRODUCCIÓN	11
1. PLAGUICIDAS Y TOXICIDAD	13
1.1. <i>Concepto de plaguicida</i>	13
1.2. <i>Clasificación de los plaguicidas</i>	14
1.3. <i>Marco legislativo aplicable a los plaguicidas</i>	20
1.4. <i>Magnitud del uso de plaguicidas</i>	22
2. EXPOSICIÓN CRÓNICA A PLAGUICIDAS EN EL ÁREA DE ESTUDIO	27
2.1. <i>Identificación de la zona de estudio</i>	27
2.2. <i>Uso de plaguicidas en la zona de estudio</i>	28
2.3. <i>Riesgos de la exposición ocupacional a plaguicidas</i>	29
3. BIOMARCADORES UTILES EN LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN Y EL EFECTO CRÓNICO A PLAGUICIDAS	32
3.1. <i>Empleo de biomarcadores para la evaluación del riesgo en la salud humana</i>	32
3.2. <i>Biomarcadores de exposición a plaguicidas (DAPs y esterases)</i>	33
3.3. <i>Biomarcadores de efecto tóxico</i>	39
Capítulo 3: ANTECEDENTES	77
1. BIOMARCADORES PARA EVALUAR LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS	79
1.1. <i>Dialquilfosfatos (DAPs)</i>	79
1.2. <i>Colinesterasas (AChE y BChE)</i>	83
1.3. <i>Paraoxonasa-1 (PON1)</i>	92
2. BIOMARCADORES PARA LA EVALUACIÓN DEL DAÑO ORGANO-ESPECIFICO DERIVADO DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS.....	95
2.1. <i>Biomarcadores de estrés oxidativo</i>	95
2.2. <i>Biomarcadores de nefrotoxicidad</i>	99
2.3. <i>Biomarcadores de hepatotoxicidad</i>	109
2.4. <i>Biomarcadores de neurotoxicidad</i>	116
2.5. <i>Biomarcadores para la evaluación del daño inmunológico</i>	119
Capítulo 4: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	127
1. JUSTIFICACIÓN.....	129
2. HIPÓTESIS	132

3. ...OBJETIVOS.....	133
Capítulo 5: MATERIALES Y MÉTODOS	135
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	137
1.1. <i>Diseño del estudio</i>	137
1.2. <i>Reclutamiento de individuos</i>	137
1.3. <i>Recogida y tratamiento de muestra</i>	140
2. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	141
3. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN POR HPLC	142
4. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN POR ELISA.....	144
5. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN MULTIPLEX.....	146
6. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS OPs.....	150
7. DETERMINACIÓN DE ESTERASAS	153
7.1. <i>Determinación de actividades B-Esterasas (Colinesterasas, ChE)</i>	154
7.2. <i>Determinación de actividades A-Esterasas (Paraoxonasa-1, PON1)</i>	159
8. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	164
8.1. <i>Tioles totales (SHT)</i>	164
8.2. <i>Capacidad antioxidante total (FRAS)</i>	165
8.3. <i>Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	168
9. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE DAÑO ÓRGANO-ESPECÍFICO.....	170
9.1. <i>Biomarcadores de nefrotoxicidad</i>	170
9.2. <i>Biomarcadores de hepatotoxicidad</i>	175
9.3. <i>Biomarcadores de neurotoxicidad</i>	179
9.4. <i>Parámetros inmunológicos</i>	181
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	184
Capítulo 6: RESULTADOS	185
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.....	187
1.1. <i>Edad</i>	187
1.2. <i>Sexo</i>	187
1.3. <i>Peso, talla e IMC</i>	188
1.4. <i>Consumo de tabaco</i>	188
1.5. <i>Consumo de alcohol</i>	189
2. BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN.....	190
2.1. <i>Metabolitos de plaguicidas OPs (dialquilfosfatos)</i>	190
2.2. <i>Esterasas</i>	197

3.	BIOMARCADORES DE EFECTO TÓXICO.....	206
3.1.	<i>Biomarcadores de estrés oxidativo</i>	206
3.2.	<i>Biomarcadores de nefrotoxicidad</i>	211
3.3.	<i>Biomarcadores de hepatotoxicidad</i>	220
3.4.	<i>Biomarcadores de neurotoxicidad</i>	228
3.5.	<i>Parámetros inmunológicos</i>	231
	Capítulo 7: DISCUSIÓN.....	253
1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.....	255
2.	BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN.....	256
2.1.	<i>Metabolitos de compuestos organofosforados (dialquilfosfatos, DAPs)</i>	256
2.2.	<i>Esterasas</i>	260
3.	BIOMARCADORES DE EFECTO TÓXICO.....	264
3.1.	<i>Biomarcadores de estrés oxidativo</i>	264
3.2.	<i>Biomarcadores de nefrotoxicidad</i>	267
3.3.	<i>Biomarcadores de hepatotoxicidad</i>	270
3.4.	<i>Biomarcadores de neurotoxicidad</i>	273
3.5.	<i>Parámetros inmunológicos</i>	275
4.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	280
	Capítulo 8: CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	283
	Capítulo 9: BIBLIOGRAFÍA	291
	Anexo: CUESTIONARIO CLÍNICO-LABORAL	319

Capítulo 1

RESUMEN / ABSTRACT

El uso de productos fitosanitarios y fertilizantes en agricultura, especialmente en el cultivo intensivo bajo invernaderos, ha supuesto un cambio sustancial en la producción agrícola pero también ha originado problemas de salud ambiental y ocupacional debido a la exposición a estos agentes químicos. Los invernaderos se caracterizan por presentar unas condiciones ambientales excepcionales de calor, humedad y ventilación que incrementan de forma sustancial la producción agrícola. No obstante, estas condiciones también favorecen la proliferación de plagas que ponen en peligro el rendimiento de los cultivos, lo que precisa el uso de plaguicidas, en ocasiones de forma inadecuada y sin seguir las buenas prácticas agrícolas. Estas circunstancias entrañan situaciones de riesgo para los trabajadores que desempeñan su actividad laboral en el interior de invernaderos, independientemente de que sean aplicadores profesionales o no. En las últimas décadas, la provincia de Almería, especialmente su litoral, se ha convertido en uno de los lugares más importantes para el cultivo bajo plástico debido a sus características geográficas y climatológicas. Allí se concentran grandes extensiones de invernaderos que suponen la principal actividad económica.

La aplicación frecuente de plaguicidas, de forma más o menos regular, puede originar efectos adversos sobre la salud de los trabajadores expuestos, especialmente en un entorno de agricultura intensiva. Así, las exposiciones crónicas a estos compuestos pueden dar lugar inicialmente alteraciones bioquímicas que no conducen necesariamente a síntomas clínicos, aunque al tratarse de respuestas biológicas medibles y objetivables pueden usarse como biomarcadores que ayudan a predecir la aparición de una enfermedad antes de que se manifieste clínicamente. Por eso tiene la consideración de toxicidad subclínica, ya que, tras un período de latencia más o menos prolongado, puede desencadenar manifestaciones propias de una intoxicación crónica. Estos trastornos van precedidos de una afectación a nivel bioquímico de los órganos diana (hígado, riñón, sistema nervioso y sistema inmunológico, entre otros) que puede evaluarse mediante el uso de biomarcadores de respuesta tóxica órgano-específica así como de biomarcadores inespecíficos de estrés oxidativo o alteraciones de enzimas que interaccionan con plaguicidas (esterasas). Esto ayudaría a establecer una relación causal entre la exposición crónica a plaguicidas y alteraciones funcionales y orgánicas subclínicas.

En el presente estudio se han evaluado trabajadores de invernadero expuestos a plaguicidas y un grupo de controles no expuestos en dos periodos diferentes de una misma campaña agrícola, uno de alta exposición (con un mayor uso de plaguicidas) y el otro de baja exposición, donde se utilizan menos estos compuestos. Se recogieron muestras biológicas en las que se determinaron biomarcadores de exposición a plaguicidas (metabolitos de diversos grupos de plaguicidas) y

biomarcadores de efecto órgano-específicos (hepáticos, renales, neurológicos e inmunológicos) e inespecíficos (esterasas y estrés oxidativo).

Los resultados del análisis de metabolitos de plaguicidas en orina indican que la población de estudio está expuesta principalmente a metabolitos de organofosforados –OPs– (dialquilfosfatos, DAPs) preformados en el ambiente y presentes en alimentos, sobre todo a expensas de OPs dimetilo que son la mayoría de los que están autorizados en la actualidad para su uso agrícola en la Unión Europea. Sin embargo, no hay indicios de que los trabajadores de invernadero evaluados presentaran exposición ocupacional a OPs en base a la encuesta epidemiológica administrada y a la información agronómica sobre los plaguicidas usados en los productos hortofrutícolas cultivados en los invernaderos durante el periodo de estudio. El análisis de una importante submuestra de trabajadores no arrojó resultados detectables de ácido 3-fenoxibenzoico y ácido 6-cloronicotínico, metabolitos comunes de numerosos piretroides y neonicotinoides, respectivamente, debido probablemente a la corta vida media de estos plaguicidas. Por tanto, los resultados de la biomonitorización de la población de estudio no indican exposición ocupacional a OPs, piretroides o neonicotinoides, aunque no se puede descartar por completo la exposición a otros plaguicidas o incluso a estos mismos pero que la biomonitorización no ha sido capaz de detectarlos por su baja persistencia y razones de tipo toxicocinético.

En lo que respecta a las esterasas estudiadas, la acetilcolinesterasa (AChE) mostró un descenso en su actividad en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles, especialmente en el periodo de alta exposición, que se relacionó con un incremento de estrés oxidativo inducido por plaguicidas y ulterior peroxidación lipídica de las membranas eritrocitarias. Dicho efecto no se puede atribuir a la exposición a OPs por las razones indicadas previamente. Por su parte, las colinesterasas plasmáticas mostraron niveles más altos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y en los expuestos frente a los controles, lo que se puede interpretar como respuesta homeostática dirigida a regular los niveles de acetilcolina para mantener así un bajo nivel de inflamación sistémica como mecanismo de defensa reactivo frente a la exposición a plaguicidas. Ambas colinesterasas (plasmática y eritrocitaria) actuarían, por tanto, de manera coordinada en la terminación de la vía antiinflamatoria colinérgica controlada por la acetilcolina.

En cuanto a la paraoxonasa-1 (PON1), los trabajadores de invernadero presentaron niveles significativamente más altos de actividad hidrolítica frente al paraoxón (POasa) y de arilesterasa

(AREasa) que los controles, así como en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Esta mayor actividad PON1 es dependiente del sustrato (pues con la lactonasa –DHCasa– se observa un descenso en lugar de un aumento) y podría atribuirse a una mayor expresión del enzima a través de diversos receptores nucleares para contrarrestar la disminución de la actividad AChE secundaria a un mayor estrés oxidativo como el inducido por plaguicidas. Así, ambas esterasas (PON1 y AChE) actuarían de forma coordinada.

En relación a los biomarcadores de estrés oxidativo se observaron mayores niveles de sustancias reactivas al ácido barbitúrico (TBARS) y grupos tioles totales (SHT) en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles en el periodo de alta exposición a plaguicidas. Sin embargo, el hallazgo más consistente fue el aumento de GGT en los trabajadores también en el periodo de alta exposición. Estos resultados parecen indicar cierto grado de estrés oxidativo asociado a la exposición a plaguicidas y que probablemente tiene su origen en el metabolismo de plaguicidas o por interferencia con los sistemas de defensa antioxidante celular. Del presente estudio se desprende que la GGT puede ser un biomarcador sensible de estrés oxidativo ante la exposición a plaguicidas.

Los biomarcadores de nefrotoxicidad estudiados no sugieren afectación glomerular ya que los valores de microalbuminuria, índice de filtración glomerular (IFG), creatinina y cistatina C séricas no se asociaron con la exposición a plaguicidas. Sin embargo, sí parece observarse una ligera alteración tubular, debido a las alteraciones de osteopontina (OPN) y el factor trébol 3 (TFF3), que mostraron niveles más altos en los trabajadores expuestos que en los controles y en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Estos resultados reflejarían cierta afectación de la reabsorción tubular o una mayor expresión de ambas proteínas como consecuencia de un daño tubular renal atribuido a la exposición a plaguicidas. No obstante, otros biomarcadores de daño tubular (β 2M, cistatina C urinaria y NGAL) no mostraron alteraciones significativas asociadas con la exposición.

El comportamiento de los biomarcadores de hepatotoxicidad no es muy concluyente. Aunque se ha observado un ligero aumento de la transaminasa AST en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles en ambos periodos de estudio, que sería indicativo de cierta afectación tóxica hepatocelular, los resultados más llamativos muestran un descenso de la fosfatasa alcalina, arginasa I y GST- α en los trabajadores expuestos con respecto a los controles, lo que habla en contra de un posible daño tóxico hepatocelular. Ese descenso podría atribuirse

a un hipotético mecanismo que regule la expresión de las tres enzimas de una manera coordinada, aunque no está claro su origen.

Los resultados de los biomarcadores de neurotoxicidad estudiados (pNF-H y proteína S100B) muestran ciertos indicios, no muy sólidos, de afectación neurológica asociada a la exposición a plaguicidas. Esto puede deberse a que los trabajadores de invernadero no estaban expuestos a plaguicidas intrínsecamente neurotóxicos. Es posible que esta ligera afectación, tanto neuronal como glial, pueda deberse también a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica o a cierto grado de neuroinflamación, en ambos casos secundarios a una respuesta inespecífica frente a la exposición a plaguicidas.

Por último, y en relación a los biomarcadores de inmunotoxicidad estudiados, el aumento de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas sugiere que la exposición a plaguicidas puede provocar una respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado, estimulando la producción de mediadores de inflamación y favoreciendo la migración de células inflamatorias hacia tejidos en los que se ha desencadenado el proceso inflamatorio. Por su parte, el aumento de los factores de crecimiento hematopoyéticos induciría angiogénesis por proliferación y activación de células endoteliales en aquellos tejidos que presentan respuesta inflamatoria. Sin embargo, el alto porcentaje de valores no detectados de factores estimulantes de colonias sugiere que la inflamación que se produce es de baja intensidad y no precisa de la formación y maduración de nuevas células. Esta inflamación sistémica podría aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y estimular las vías neuroinflamatorias, dando lugar a cierta afectación neurotóxica indirecta.

Palabras claves: *plaguicidas; exposición crónica; biomarcadores, esteroides; estrés oxidativo hepatotoxicidad; nefrotoxicidad; neurotoxicidad; inmunotoxicidad*

The use of plant protection products and fertilizers in intensive agriculture, especially in greenhouses, represented a substantial change in crop production but also may lead to environmental and occupational health problems as a result of exposure to those chemicals. Greenhouses are characterized by exceptional environmental conditions of warm, humidity and ventilation, which substantially increase crop production. However, these conditions contribute to the proliferation of pests that threaten crop yields, and hence the use of pesticides is required to prevent this threat, although sometimes they are inadequately used and without following good agricultural practices. These circumstances give rise to risky situations for farm workers performing their work within greenhouses, regardless of whether they are professional applicators or not. In recent decades, the province of Almería (Spain), especially its coastline, has become one of the most important areas of intensive agriculture under plastic greenhouses because of its geographic and weather characteristics. These large areas of greenhouses represent the main economic activity of Almería.

Long-term exposure to pesticides can cause adverse health effects in the exposed populations, especially in intensive farming workers. These exposures may initially induce biochemical alterations that do not necessarily result in overt clinical symptoms; in turn, they may lead to measurable and objective biological responses that can be used as biomarkers of effect that are helpful for the prediction of diseases before they manifest clinically. This represents a kind of subclinical toxicity that, after a period of latency, can trigger clinical manifestations of chronic toxicity. These disorders are preceded by biochemical dysfunction of target organs (liver, kidney, nervous system and immune system, among others), which can be evaluated by using organ-specific biomarkers of toxic response and non-specific biomarkers such as those reflecting oxidative stress or changes in enzymes interacting with pesticides (e.g., certain esterases). This would help to establish a causal relationship between chronic exposure to pesticides and functional and subclinical organ dysfunction.

The present study assessed greenhouse workers exposed to pesticides, and a group of controls lacking this exposure, in two different periods of the same crop season, one of high exposure (with greater use of pesticides) and the other of low exposure, where these compounds were less used. In the collected biological samples (blood and urine), biomarkers of exposure to pesticides (metabolites of several pesticide groups) and biomarkers of target organ toxicity (liver, kidney, neurological and immunological systems) were measured together with non-specific biomarkers such as esterase activities and oxidative stress end-points.

The analysis of metabolites of pesticides in urine indicated that the study population was mainly exposed to organophosphate -OPs- metabolites (dialkylphosphates, DAPs) preformed in the environment and present in food, especially at the expense of dimethyl compounds, most of which are currently authorized for their use in agriculture in the European Union. However, there was no evidence that greenhouse workers presented occupational exposure to OPs according to the epidemiological questionnaire administered to the study subjects and the agronomic information on pesticides used for the horticultural products grown in greenhouses during the study period. The analysis of an important subset of workers did not yield detectable results of 3-phenoxybenzoic acid and 6-chloronicotinic acid, common metabolites of numerous pyrethroid and neonicotinoid insecticides, respectively, probably because of the short half-life of these compounds. Therefore, the biomonitoring results of the study population failed to indicate occupational exposure to OPs, pyrethroids or neonicotinoids, although exposure to other pesticides or even to those pesticides cannot be ruled out at all.

Regarding the esterases studied, acetylcholinesterase (AChE) activity was reduced in greenhouse workers relative to controls, especially in the period of high pesticide exposure, which was related to pesticide-induced oxidative stress and further lipid peroxidation of erythrocyte membranes where AChE is located. Such an effect cannot be attributed to OPs exposure for the reasons mentioned above. On the other hand, plasma cholinesterases showed higher levels in the period of high versus low pesticide exposure and in greenhouse workers as compared to controls. This finding can be interpreted as a homeostatic response intended to regulate acetylcholine at levels enough to maintain a low level systemic inflammation as a reactive mechanism of defense against exposure to pesticides. Both cholinesterases (plasma and erythrocyte), therefore, would act in a coordinated way in the termination of the cholinergic anti-inflammatory pathway controlled by acetylcholine.

Regarding paraoxonase-1 (PON1), greenhouse workers had significantly higher levels of hydrolytic activity towards paraoxon (POase) and arylestersase (AREase) than controls, as well as in the period of high versus low exposure to pesticides. This higher PON1 activity was substrate-dependent (since lactonase -DHCase- exhibited a decreased activity) and might be attributed to an enhanced expression of the enzyme through nuclear receptors to counter the decreased AChE activity resulting from pesticide-induced oxidative stress. Thus, both esterases (PON1 and AChE) would also act in a coordinated manner.

In relation to biomarkers of oxidative stress, higher levels of barbituric acid reactive substances (TBARS) and total thiol groups (SH-T) were observed in greenhouse workers compared to controls during the period of high pesticide exposure. However, the most striking finding was the increase in GGT in workers at the period of high exposure. These results suggest a certain degree of oxidative stress associated to pesticide exposure, likely generated during pesticide metabolism or by interference with antioxidant cellular defense systems. The present study suggests that GGT can be a sensitive biomarker of oxidative stress in relation to pesticide exposure.

The biomarkers of nephrotoxicity studied did not suggest a glomerular involvement because levels of microalbuminuria, glomerular filtration rate (GFR), and serum creatinine and cystatin C failed to be associated with pesticide exposure. However, a subtle tubular change was suspected as osteopontin (OPN) and the factor trefoil 3 (TFF3) showed higher levels in the exposed workers than in controls and in the period of high versus low pesticide exposure. These results appear to reflect some impairment of tubular reabsorption or increased expression of both proteins as a result of renal tubular damage in relation to exposure to pesticides. However, other biomarkers of tubular damage (β 2M, urinary cystatin C and NGAL) failed to show significant changes.

As for biomarkers of hepatotoxicity, results were not conclusive. Although a slight increase in the transaminase AST was observed in greenhouse workers relative to controls in both study periods, thus reflecting some toxic hepatocellular involvement, the most striking result was a decrease in alkaline phosphatase, arginase I and GST- α levels in greenhouse workers relative to controls, which do not support a possible toxic hepatocellular damage. This decrease could be attributed to a hypothetical mechanism that regulates the expression of the three enzymes in a coordinated way, although its origin is far from being clear.

The results of the neurotoxicity biomarkers studied (pNF-H and S100B) showed weak evidence of neurological involvement associated with pesticide exposure. This may be because greenhouse workers were not exposed to pesticides intrinsically neurotoxic. It is possible that this subtle change at both neuronal and glial level may be due to a greater permeability of the blood-brain barrier or to a certain degree of neuroinflammation, being in both cases secondary to a nonspecific response to pesticide exposure.

Finally, in relation to the immunotoxicity biomarkers studied, the increase in proinflammatory cytokines and chemokines suggests that exposure to pesticides can induce a low-grade systemic inflammatory response, resulting in an increased production of inflammatory mediators and

promoting the migration of inflammatory cells to tissues where the inflammatory process has been triggered. On the other hand, the increase in hematopoietic growth factors would induce angiogenesis by proliferation and activation of endothelial cells in tissues exhibiting an inflammatory response. However, the high percentage of undetected values of colony stimulating factors suggests that the inflammation produced was of low intensity and did not require the production and maturation of new inflammatory cells. This systemic inflammation may also increase the permeability of the blood-brain barrier and stimulate neuroinflammatory pathways, leading to some indirect neurotoxic involvement.

Key words: *pesticides; chronic exposure; biomarkers; esterases, oxidative stress; hepatotoxicity; nephrotoxicity; neurotoxicity; immunotoxicity*

Capítulo 2

INTRODUCCIÓN

1. PLAGUICIDAS Y TOXICIDAD

1.1. Concepto de plaguicida

Desde tiempos muy remotos el hombre ha tenido una gran preocupación por aumentar la cantidad y calidad de sus cosechas, evitando que sean dañadas por insectos, hongos, especies de plantas no deseadas, *etc.* Sin embargo, no va a ser hasta después de la Segunda Guerra Mundial cuando los plaguicidas se comenzaron a emplear de forma masiva como herramienta básica para luchar contra las plagas que destruían o mermaban las cosechas (Albert, 2002).

Así, la Real Academia Española de las Letras (R.A.E.), define plaguicida o pesticida como una sustancia que se emplea para combatir plagas. Por otro lado, la FAO/OMS, en su último Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas (Roma, 2014), define plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas (OMS y FAO, 2014).

El término plaguicida a menudo se confunde con los de biocida y producto fitosanitario. Los biocidas son sustancias activas, preparados o microorganismos cuyo objetivo es destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo para la salud humana o animal y los materiales naturales o manufacturados. Los biocidas se utilizan con finalidad no agrícola y, según el anexo V de la Directiva 98/8/CE, relativa a la comercialización de biocidas (posteriormente derogado por el Reglamento 528/2012 de la Unión Europea), se clasifican en cuatro grupos: desinfectantes y biocidas generales, conservantes, plaguicidas y otros biocidas. Por su parte, los productos fitosanitarios son sustancias que contienen al menos una sustancia activa y cuyo objetivo es proteger los vegetales y sus productos de organismos nocivos y así aumentar el rendimiento de los cultivos. Según el MAPAMA (Ministerio de agricultura, pesca, alimentación y medio ambiente), también se consideran como productos fitosanitarios las sustancias que destruyen las malas hierbas, regulan el crecimiento o inhiben la germinación.¹

¹ <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/fitosanitarios/>

Los plaguicidas, por tanto, pueden ser considerados tanto productos fitosanitarios o biocidas. La diferencia reside en que los primeros hacen referencia a su uso agrícola de los mismos, mientras que el término biocida se utiliza cuando el ámbito de aplicación de las sustancias activas es diferente al agrícola. Ambos tienen incluso una regulación legal diferente tanto a nivel comunitario como nacional.

En el caso de biocidas, las sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan una o varias de dichas sustancias o ingredientes, deben estar incluidos en el listado de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). Por su parte, la comercialización y uso de productos fitosanitarios requiere una autorización que conlleva la realización de una estricta evaluación de riesgos, según establece el Reglamento (CE) nº 1107/2009. Todos los países miembros de la Unión Europea aplican los mismos procedimientos de evaluación y autorización para poner los productos fitosanitarios en el mercado. Las sustancias activas se autorizan a nivel comunitario tras una exhaustiva evaluación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) mientras que los productos fitosanitarios que contienen estas sustancias activas, es decir, las formulaciones comerciales, son autorizadas por cada Estado miembro.

1.2. Clasificación de los plaguicidas

Existen muchas clasificaciones de plaguicidas, dependiendo de los criterios que se utilicen para tal fin. A continuación se mencionan las que pueden ser más importantes desde la perspectiva del presente estudio:

- a. Según la naturaleza química del plaguicida, es decir, según su estructura química se distinguen los siguientes grupos de plaguicidas:
 - **Organoclorados (OCs):** se trata de compuestos orgánicos, por lo general cíclicos, que poseen al menos un átomo de cloro en su estructura. Son liposolubles, muy estables químicamente y persistentes en el ambiente, que alcanzan la cadena alimentaria y se acumulan en el organismo. Aunque fueron muy usados en la década de los 50 y 60, especialmente como insecticidas, cada vez se emplean menos. Estos compuestos, a su vez, se subclasifican en los siguientes grupos (Figura 1): derivados clorados del etano (diclorodifeniltricloroetano o DDT, metoxicloro), ciclodienos (aldrín, endrín, dieldrín, clordano, endosulfán y heptaclor), derivados clorados del ciclohexano

(hexaclorociclohexano -HCH-, isómeros α , β y γ , este último conocido también como lindano) y canfenos clorados (toxafeno y clordecona). Ninguno de ellos está autorizado en la actualidad por la Comisión Europea para ser usados en agricultura.

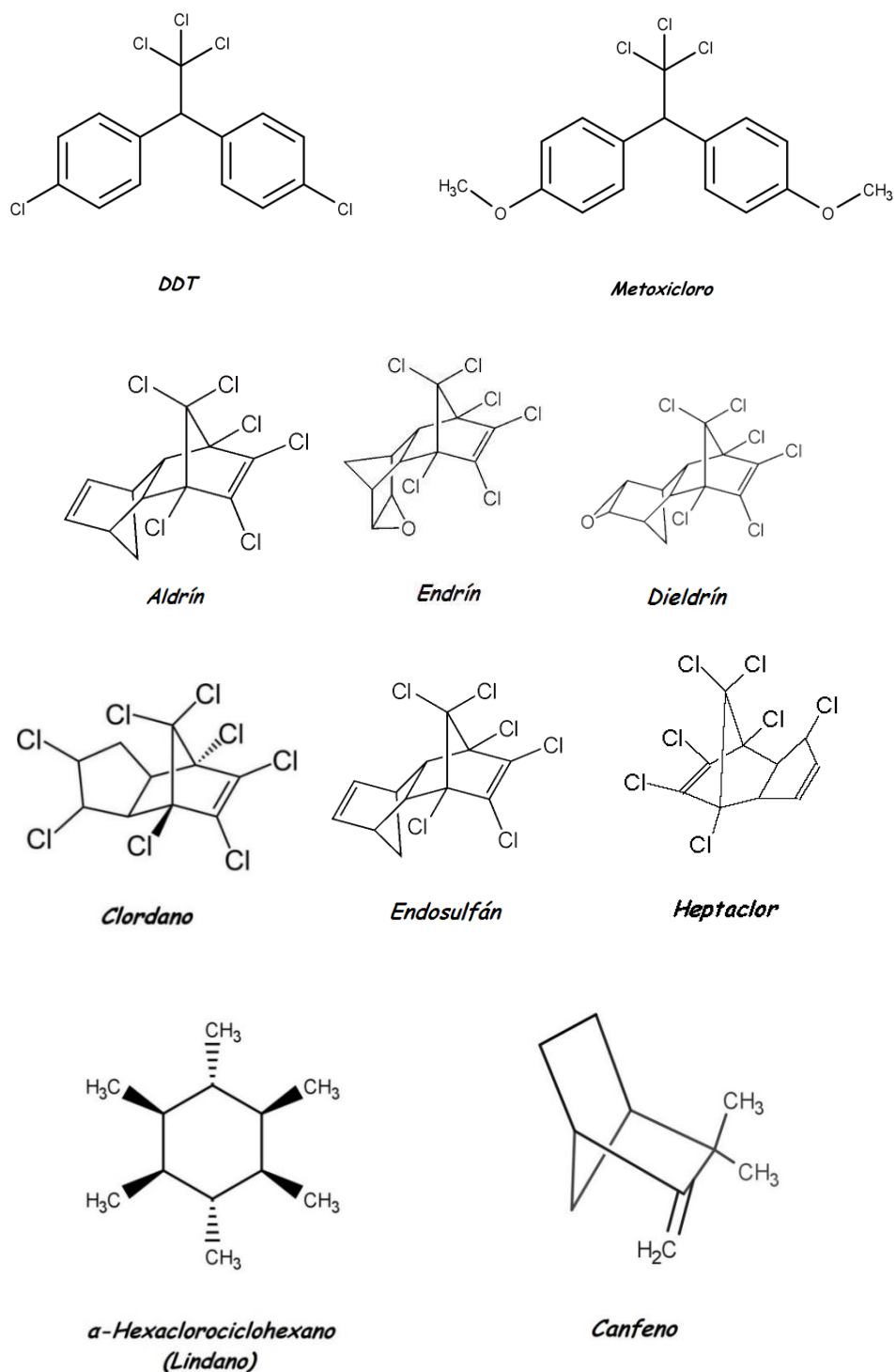


Figura 1. Principales estructuras químicas de los plaguicidas OCs

- **Organofosforados (OPs):** se trata en su mayoría de ésteres del ácido fosfórico. Según sean los átomos o grupos unidos al átomo de fósforo, se encuentran diferentes tipos de OPs (Figura 2). Son sustancias fácilmente hidrolizables en condiciones alcalinas y tienen una vida media más corta que los OCs ya que con el tiempo pueden sufrir alteraciones físicas y químicas, aunque su toxicidad es más elevada. Esto implica que, a las dosis que se utilizan en el ámbito ocupacional, estos compuestos se eliminan rápidamente por la orina y son difíciles de detectar. Algunos de los más conocidos son: demeton, paration, metilparation, fention, diazinon, diclorvos, fenitrothion, tricorfon, dimetoato, malation.

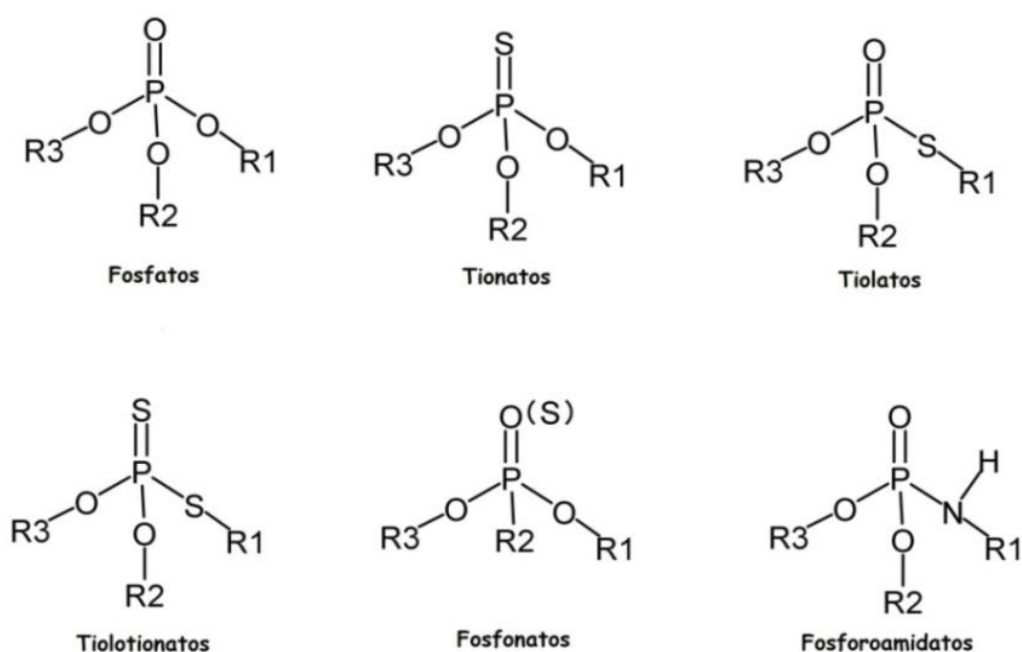


Figura 2. Principales estructuras que presentan los plaguicidas OPs

- **N-metilcarbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos:** se trata de ésteres derivados de los ácidos N-metilcarbámico, tiocarbámico o ditiocarbámico respectivamente (Figura 3). Son sustancias fácilmente hidrolizables en condiciones alcalinas. Entre ellos se encuentran: aldicarb, carbofurano, metomilo, propoxur, pirimicarb, carbaril, molinato, dialato, trialato, metam-sodio, mancozeb, tiram, maneb, zineb, ziran, ferbam, nabam.

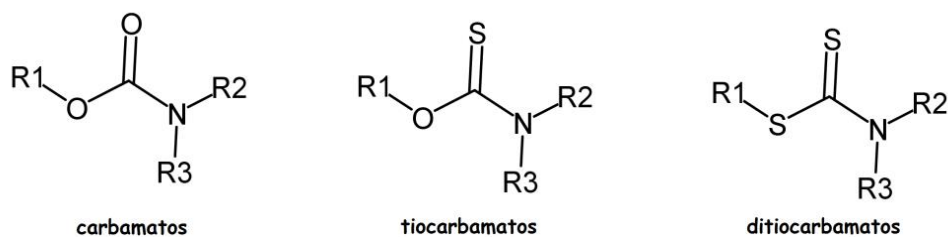


Figura 3. Estructura general de los carbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos

- Piretrinas y piretroides:** las piretrinas son sustancias naturales de origen vegetal extraídas de la flor de crisantemos y que se suelen usar como insecticidas (Figura 4). Por su parte, los productos análogos sintetizados en laboratorio y que tienen estructura y propiedades similares a las piretrinas se denominan piretroides. Por lo general, los piretroides son más tóxicos y persistentes que las piretrinas. Debido a que se metabolizan y eliminan rápidamente en el organismo, su determinación en orina tan solo indica exposición reciente. Existen numerosos piretroides sintéticos que normalmente se subclasifican como de tipo I, si carecen del grupo α -ciano en su molécula (aletrina, bifentrina, permetrina, fenotrina, tetrametrina, resmetrina y teflutrina), y tipo II, si poseen el grupo α -ciano (ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, flumetrina, fluvalinato y tralometrina).

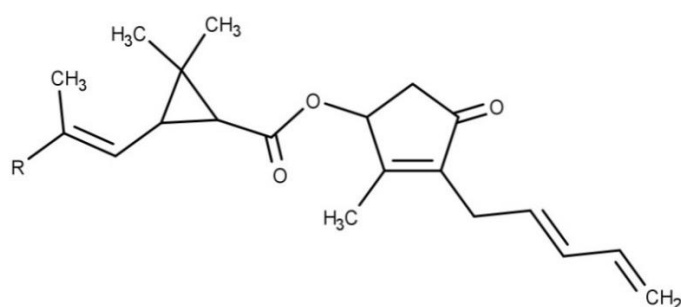


Figura 4. Estructura de las piretrinas naturales. Si R es un grupo CH₃- se denominan piretrinas I y si es un grupo CH₃-COO- como piretrinas II

- Bipiridilos:** son compuestos de amonio cuaternario con estructura de bipyridinas. Se usan comúnmente como herbicidas. Los más importantes son el paraquat y diquat (Figura 5).

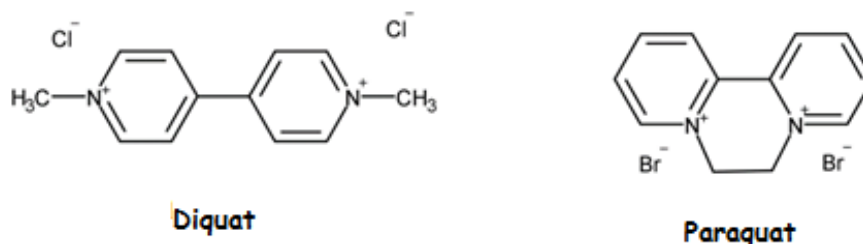


Figura 5. Estructuras del paraquat (izquierda) y diquat (derecha)

- **Clorofenoxiácidos:** son herbicidas derivados del ácido fenoxiacético (Figura 6) que se comercializan como sales, ésteres o aminas. Pertenecen a éste grupo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2, 4, 5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) y el ácido 4-clorometilfenoxiacético (CMPA).

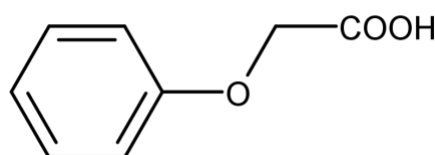


Figura 6. Ácido fenoxiacético

- **Triazinas:** existen muchos herbicidas con el núcleo triazina. Algunos de los más conocidos son: atrazina, ciazina y simazina (Figura 7).

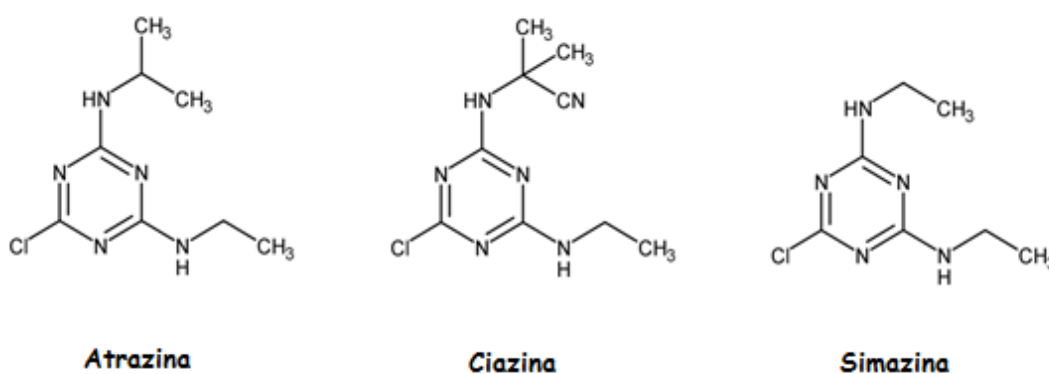


Figura 7. Estructura química de las principales triazinas

- b. Según su toxicidad: el Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 3349/1983 relativo a la Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas, clasifica estos compuestos atendiendo a

su toxicidad aguda expresada en DL₅₀ (por vía oral o dérmica en la rata) o en CL₅₀ (por vía respiratoria para la rata) (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas según el RD 162/1991 atendiendo a la toxicidad de los mismos

	DL ₅₀				CL ₅₀
	Oral		Dérmica		Respiratoria
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Gaseoso
Muy tóxico	5	25	10	50	0,5
Tóxico	5-50	25-200	10-100	50-400	0,5-2
Nocivo	50-500	200-2000	100-1000	400-4000	2-20

Las diferentes categorías de toxicidad significan lo siguiente:

- **Nocivos:** aquellos que por cualquier vía de penetración y en pequeñas cantidades solo pueden entrañar riesgos de gravedad limitada.
- **Tóxicos:** los plaguicidas que pueden entrañar riesgos graves, agudos o crónicos.
- **Muy tóxicos:** son los plaguicidas que, incluso en muy pequeña cantidad, conllevan riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

c. Según su mecanismo de acción se clasifican en:

- **De contacto:** actúan por contacto con el cuerpo del insecto provocando bien la muerte por asfixia o parálisis de los centros nerviosos.
- **Ingestión:** actúan al ser ingeridos por el animal.
- **Ingestión y contacto:** actúan de ambas formas.
- **Sistémicos:** actúan a través de la savia de la planta. Tratan de inmunizar al vegetal.
- **Fumigantes:** actúan en forma de gas.

d. Según la acción específica sobre la plaga o enfermedad: los plaguicidas pueden ser insecticidas (actúa sobre insectos), acaricidas (sobre ácaros), fungicidas (sobre hongos),

nematicidas (sobre gusanos), herbicidas (sobre “malas hierbas”), fitorreguladores (regulan el crecimiento de las plantas mediante hormonas vegetales), molusquicidas (actúan sobre moluscos), rodenticidas (controlan la población de roedores), avicidas (controlan la población de aves) o bactericidas (eliminan bacterias).

- e. Según el destino de su aplicación: fitosanitarios (destinados a su utilización en sanidad vegetal), ganadero (utilizados en crianza de animales), industria alimentaria (destinados a tratamientos de productos alimentarios), ambiental (saneamiento de locales u otros establecimientos), en higiene personal (aplicación directa sobre el ser humano) y doméstica (aplicación en lugares habitados por personas no cualificadas).

1.3. Marco legislativo aplicable a los plaguicidas

Tanto en España como en la Unión Europea existe una amplia normativa sobre plaguicidas. De toda esta legislación, cabe destacar la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas recogida en el Real Decreto 3349/1983 (que no es sino la transposición de la Directiva Europea 78/631/CEE), modificada posteriormente por los Reales Decretos 162/1991 y 443/1994. En estos Reales Decretos se establecen los aspectos básicos en todo lo referente al manejo de estos productos y se define a los plaguicidas como aquellas sustancias o ingredientes activos (así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos) destinados a la destrucción, control o prevención de plagas.

En lo referente a la comercialización de plaguicidas, el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, y sus posteriores modificaciones, establecen los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, para garantizar de una manera armonizada un alto grado de protección. Dicho Reglamento completa la armonización y simplificación de los LRM de plaguicidas, garantizando al mismo tiempo que todos los consumidores de la UE, incluidos los más vulnerables, estén suficientemente protegidos. Esta normativa sustituye los diferentes LMR nacionales por un único LMR armonizado en el ámbito de la UE, lo que garantiza el libre comercio en su seno. Las principales mejoras que introduce son que no se autorizará ningún plaguicida que no tenga un LMR establecido y que a todas las combinaciones de plaguicidas y productos alimenticios básicos que no tengan fijado un LMR les adjudica uno a priori de 0.01 mg/kg. El

Reglamento 396/2005 considera que la salud pública debe tener prioridad sobre los intereses de la protección de cultivos, por lo que es necesario garantizar que los residuos de plaguicidas no estén presentes a niveles que supongan un riesgo inaceptable para los seres humanos y, en su caso, para los animales. Los LMR deben fijarse en el nivel más bajo posible que se obtenga conforme a las buenas prácticas agrícolas con objeto de proteger a los grupos más vulnerables como son los niños y los *nascituri* (no nacidos, es decir, embriones y fetos). A la hora de fijar los LMR tiene en cuenta los efectos acumulativos y sinérgicos de aquellos plaguicidas que tienen un mecanismo común de toxicidad: por ejemplo, OPs y N-metilcarbamatos. En este caso es necesario establecer LRM sumatorios para tales grupos. Además, el Reglamento garantiza que los consumidores estén suficientemente informados con objeto de mejorar la transparencia. Los Estados miembros deben publicar cada año en internet los resultados del seguimiento nacional de residuos, facilitando todos los datos.

Por otro lado, la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo establece un marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas mediante la reducción de los riesgos y los efectos del uso de los plaguicidas en la salud humana y ambiental, así como el fomento de la gestión integrada de plagas y de planteamientos o técnicas alternativas no químicas a los plaguicidas. Además establece el procedimiento para la autorización de nuevas sustancias activas con las que elaboraran productos fitosanitarios. El marco regulador europeo se completa con el Reglamento (CE) nº 1107/2009, del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y que deroga las Directivas 79/117/CEE sobre productos fitosanitarios prohibidos y 91/414/CEE sobre comercialización de productos fitosanitarios. Su objetivo es garantizar un alto grado de protección de la salud humana, animal y del medio ambiente, así como salvaguardar la competitividad de la agricultura comunitaria. Una novedad importante es que protege específicamente a grupos vulnerables de población como son las mujeres embarazadas, los lactantes y los niños. Según el Reglamento la industria tiene que demostrar que las sustancias o productos producidos o comercializados en la Unión Europea (UE) no tienen efectos nocivos en la salud humana o animal ni efectos inaceptables en el medio ambiente. También establece las normas relativas a la aprobación de sustancias activas, protectores y sinergistas contenidos en los productos fitosanitarios o que son ingredientes de los mismos, así como normas relativas a los adyuvantes y coformulantes.

Otro aspecto importante es la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, desarrollado por la

directiva 98/24/CEE, de 7 de abril de 1998 y transpuesta por el Real Decreto 374/2001, de 6 de abril. Asimismo, el Consejo Interterritorial de la Salud, en sesión plenaria de octubre de 1999, aprobó el protocolo de vigilancia de la salud específico para trabajadores expuestos a plaguicidas y publicado por el Ministerio de Salud ².

En relación a biocidas, el Real Decreto 1054/2002 de 11 de octubre (y modificaciones posteriores) que transpone la directiva 98/8/CE, regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. Según este Real Decreto, no se podrá comercializar ningún biocida que no haya sido autorizado previamente. Además, los biocidas solo podrán ser fabricados con sustancias activas que estén incluidas en el Anexo I de la citada Directiva. Posteriormente, la normativa sobre biocidas se actualizó mediante el Reglamento 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. Este Reglamento tiene por objetivo armonizar las normas sobre la comercialización y el uso de los biocidas, garantizando al mismo tiempo un nivel de protección elevado de la salud humana y animal y del medio ambiente, con especial atención a la protección de los grupos vulnerables.

Por último, cabe destacar también la Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo del 4 de febrero de 1994 por la que se prohíbe la importación, comercialización y utilización dentro del territorio nacional, salvo casos excepcionales, de plaguicidas de uso ambiental que contienen determinados ingredientes activos peligrosos tales como aldrín, clordano, dieldrín, DDT, endrín, hexaclorociclohexano que contenga menos del 99% de isómero gamma, heptacloro, hexaclorobenceno, canfeno clorado (toxafeno), arsénico y sus derivados, estrocnina y sus sales y cultivos microbianos de enterobacteriáceas.

1.4. Magnitud del uso de plaguicidas

A nivel mundial existen decenas de miles de formulaciones comerciales de plaguicidas en todo el mundo, que incluyen algo más de mil ingredientes activos. Según la US-EPA, la cantidad de plaguicidas utilizada a nivel mundial aumentó de 2,20 a 2,64 millones de toneladas entre 2008 y 2012 (Atwood y Paisley-Jones, 2017). En España, las ventas de plaguicidas durante el año 2015 alcanzaron una cantidad total de 93.252 toneladas. Un tercio de esa cantidad se utilizó en Andalucía, debido a la existencia de importantes áreas de

² www.msc.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/plaguicidas.pdf

agricultura intensiva en invernaderos de plástico (especialmente en la zona de Almería), donde se emplearon la mayor parte de ellos, casi el 24% (García-García et al., 2016).

En EEUU, la agricultura es la actividad en la que se hace un mayor uso de estos compuestos, pues alrededor del 90% de los mismos se destina al control químico de las plagas que actúan sobre las cosechas de vegetales y de alimentos. El resto se utiliza con fines ambientales (control de vectores de enfermedades infecciosas) o doméstico (Atwood y Paisley-Jones, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, la comunidad andaluza representa aproximadamente un tercio de las ventas nacionales de productos fitosanitarios, alcanzando en 2011 unas cifras de 29.160 toneladas y 199 millones de euros, según datos de la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA). En la Figura 8 se puede apreciar la evolución del consumo de fitosanitarios en Andalucía desde el año 2000 al 2010 (Consejería de Medio Ambiente).

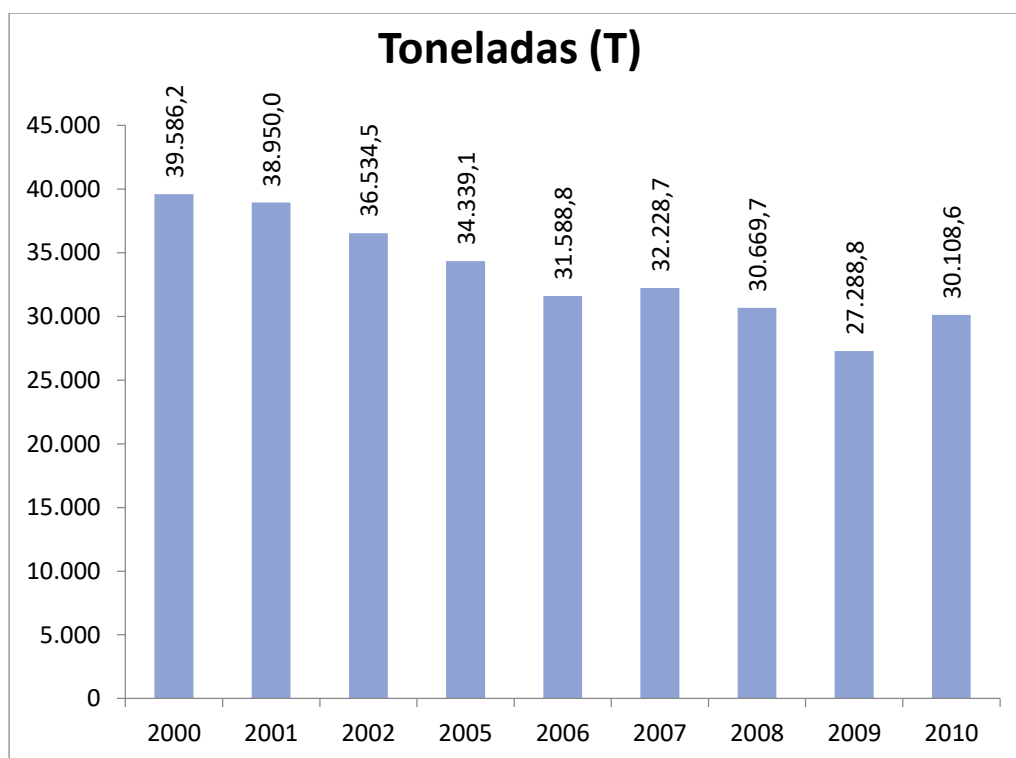


Figura 8. Evolución del consumo de fitosanitarios en Andalucía según AEPLA (Datos básicos de Medio Ambiente en Andalucía). Edición 2011

El Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) realiza las encuestas anuales sobre comercialización de productos fitosanitarios ³ (tanto a los titulares autorizados de tales productos como a los no titulares), según establece el Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo. Las estadísticas realizadas sobre dichas encuestas recogen las cantidades de sustancias activas contenidas en los productos fitosanitarios comercializados en nuestro país y desagregados por categoría de productos y clasificación química. La Figura 9 expresa la comparativa de los cinco años disponibles hasta el momento (2011 a 2015) de la estadística realizada por el MAGRAMA.

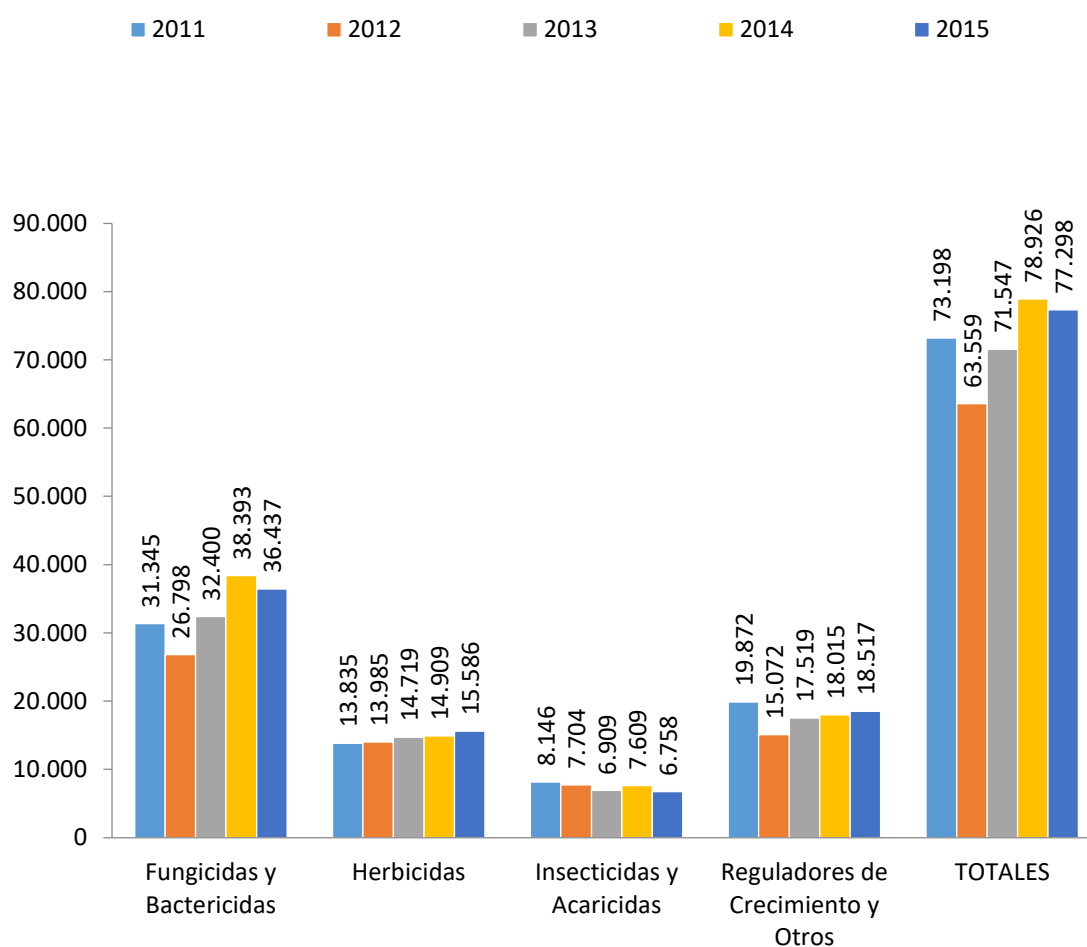


Figura 9. Consumo de productos fitosanitarios en España durante los años 2011, 2012, 2013, 2014 y 2015 expresado en toneladas de productos fitosanitarios a nivel nacional.

³ <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx>

En la Tabla 2 se muestran los mismos datos pero tabulados. Se puede apreciar que el total de fitosanitarios comercializado en 2015 fue de 77.298 toneladas, con un descenso anual del 1,5% con respecto al año anterior.

Tabla 2. *Productos fitosanitarios comercializados en los últimos 5 años (expresados en toneladas) según la encuesta anual del MAGRAMA*

Principales grupos de sustancias químicas	2011	2012	2013	2014	2015
Fungicidas y Bactericidas	31.345	26.798	32.400	38.393	36.437
Herbicidas	13.835	13.985	14.719	14.909	15.586
Insecticidas y Acaricidas	8.146	7.704	6.909	7.609	6.758
Reguladores del crecimiento y otros	19.872	15.072	17.519	18.015	18.517
Total	73.198	63.559	71.547	78.926	77.298

Fuente: MAGRAMA

La Tabla 3 desglosa por grupos los datos de la tabla anterior según los principales grupos funcionales de fitosanitarios.

Tabla 3. Toneladas de productos fitosanitarios por grupos expresado en Tm durante el periodo 2011-2015

	2011	2012	2013	2014	2015
FUNGICIDAS Y BACTERICIDAS					
<i>Inorgánicos</i>	25.387	21.499	26.911	32.617	30.639
<i>Carbamatos y Ditiocarbamatos</i>	3.228	2.814	2.928	2.781	2.820
<i>Benzimidazoles</i>	121	116	146	-	-
<i>Imidazoles y Triazoles</i>	296	274	334	445	411
<i>Morfolinas</i>	34	22	25	-	-
<i>Biológicos</i>	1	5	7	14	14
<i>Otros y no clasificados</i>	2.278	2.068	2.049	2.536	2553
TOTAL	31.345	26.798	32.400	38.393	36.437
HERBICIDAS					
<i>Fenoxifitohormonas</i>	1.670	1.385	1.338	1.531	1.470
<i>Triazinas y Triazinonas</i>	793	799	335	435	354
<i>Amidas y Anilidas</i>	982	1.261	969	1.155	1.172
<i>Carbamatos y Bicarbamatos</i>	24	19	20	23	34
<i>Derivados de Dinitroanilina</i>	334	318	396	-	-
<i>Urea y Uracilo</i>	908	906	817	904	802
<i>Otros y no clasificados</i>	9.124	9.297	10.844	10.861	11.754
TOTAL	13.835	13.985	14.719	14.909	15.586
INSECTICIDAS Y ACARICIDAS					
<i>Piretroides</i>	129	118	179	164	276
<i>Carbamatos y Oximacarbamatos</i>	52	35	55	70	40
<i>Organofosfatos</i>	2.572	2.571	2.162	2.553	2.280
<i>Basados en productos en biológicos y botánicos</i>	84	64	87	93	68
<i>Otros y no clasificados</i>	5.309	4.916	4.426	4.729	4.094
TOTAL	8.146	7.704	6.909	7.609	6.758
MOLUSQUICIDAS, REGULADORES DE CRECIMIENTO Y OTROS					
<i>Molusquicidas</i>	228	69	88	-	68
<i>Reguladores del Crecimiento</i>	223	181	169	156	170
<i>Otros productos protectores</i>	19.421	14.822	17.262	17.859	18.279
TOTAL	19.872	15.072	17.519	18.015	18.517

Fuente: MAGRAMA

2. EXPOSICIÓN CRÓNICA A PLAGUICIDAS EN EL ÁREA DE ESTUDIO

2.1. Identificación de la zona de estudio

El presente estudio se ha efectuado en la zona de El Poniente de Almería, una de las mayores extensiones del mundo donde se cultivan productos hortofrutícolas bajo invernaderos de plástico, gracias a las características de su clima (Olea, 2003). Este tipo de cultivos permiten la obtención de cosechas de una manera rápida y con una alta calidad, rendimiento y precocidad, así como alargar el ciclo de las plantas y obtener cosechas fuera de temporada. Sin embargo, para lograr estos objetivos es necesario emplear programas de control de plagas debido a las condiciones de humedad, temperatura y hermeticidad de los invernaderos, que favorecen el desarrollo de plagas que pueden mermar el rendimiento de las cosechas, por lo que se requiere el uso de plaguicidas. En el cultivo en invernaderos se utiliza un promedio de aplicación de 200 kg de fitosanitarios por hectárea en el año 2000 (Tolón Becerra y Lastra Bravo, 2010).

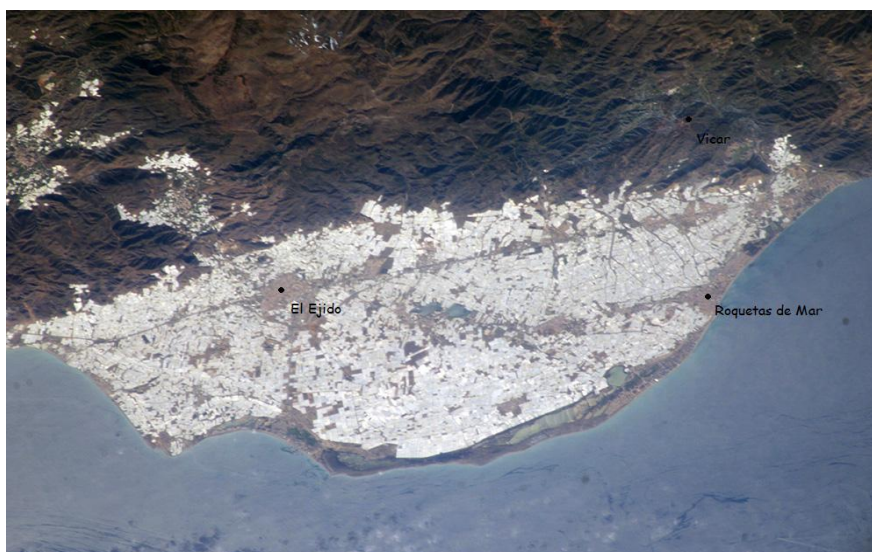


Figura 10. Vista aérea de la zona del Poniente de Almería. En ella se puede observar la concentración de invernaderos que se produce alrededor de las localidades de Vicar, El Ejido y Roquetas de Mar. Fuente: NASA (editada)

En España, la superficie de invernaderos destinada al cultivo de frutas y verduras fructíferas es de 66.346 Ha, estando concentrada gran parte de esa superficie en Almería (37.575 hectáreas), con una superficie media entre 0,5 y 0,8 hectáreas, dependiendo del tipo de estructura. En comparación, la provincia vecina de Murcia tiene una superficie de 4.733 hectáreas (Glass et al., 2012). En la provincia de Almería los invernaderos se encuentran

concentrados en una franja de terreno que alcanza desde la costa mediterránea hasta la Sierra de Gádor. Los municipios con mayor densidad de invernaderos corresponden a El Ejido y Roquetas de Mar (Figura 10). La zona de estudio tiene una población aproximada de 220.000 habitantes y una superficie total de 960 Km² y en ella se contabilizan un total de 20.000 hectáreas de invernaderos que producen aproximadamente 2 millones de toneladas de pimientos, tomates, pepinos, calabacines, sandías, melones, berenjenas y judías verdes entre otros productos (Tolón Becerra y Lastra Bravo, 2010).

Progresivamente se van utilizando menos productos fitosanitarios ya que se van sustituyendo por procedimientos de gestión integrada de plagas. Según la Delegación Territorial de la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente, en la campaña agrícola 2014/2015 la provincia de Almería dedicó unas 26.600 hectáreas de invernaderos a cultivos de hortalizas y frutas con control biológico de plagas. Esta superficie supone un ligero incremento (0,5%) con respecto a la campaña anterior. Esto significa que la provincia aplica control biológico al 65% del total de las frutas y hortalizas producidas bajo plástico. La mayor superficie cultivada con control biológico se dedica principalmente al pimiento, con 9.300 hectáreas, lo que representa prácticamente el 100% de la extensión dedicada a este producto. Le sigue el tomate, con 9.160 hectáreas (algo más del 82% de las plantaciones); el pepino, con 2.530 hectáreas; la berenjena, con unas 1.160 hectáreas; y el calabacín con 990 hectáreas.⁴

2.2. Uso de plaguicidas en la zona de estudio

Los insecticidas OPs, desde que sustituyeron en la década de los 70s a los OCs debido a sus riesgos medioambientales, han sido los fitosanitarios más empleados en todo el mundo para aumentar y mejorar la producción agrícola. Sin embargo, en los últimos años están siendo sustituidos gradualmente por otros compuestos nuevos de menor toxicidad, tales como *N*-metilcarbamatos, piretroides y neonicotinoides. En el área objeto del presente estudio, los principales plaguicidas que se utilizaban hace una década eran *N*-metilcarbamatos, ditiocarbamatos, OPs, piretroides y neonicotinoides (Hernández et al., 2006a), mientras que los responsables del mayor número de intoxicaciones agudas son los *N*-metilcarbamatos, OPs, neonicotinoides y piretroides (Hernández et al., 2010).

⁴ Diario digital de la actividad hortofrutícola, Hortoinfo, 21-08-2014, <http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias/3931-control-bio-almeria-210814>

En el año 2000, la Consejería de Salud Andaluza desarrolló un programa de vigilancia de intoxicaciones agudas por exposición ocupacional a plaguicidas. Según el mismo, los datos más relevantes durante el periodo 2000-2009 fueron los siguientes (Parrón Carreño et al., 2009):

- Edad media de los intoxicados: 38,1 ± 15,04 años.
- Sexo: 86,9% varones, 13,1% mujeres.
- Ocupación principal: agricultura 63%.
- Protección en el momento de la intoxicación: 46,3%.
- Principal vía de absorción: cutánea (252 casos) y la cutáneo-respiratoria (120).
- Nacionalidad: 84% españoles.
- Causa: 73% al fumigar directamente.
- Intoxicaciones previas: 31,2% había tenido al menos una. El 68,3% tras la atención en urgencias se derivó a su domicilio.

2.3. Riesgos de la exposición ocupacional a plaguicidas

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de productos fitosanitarios y fertilizantes en agricultura, y especialmente en el cultivo intensivo bajo invernaderos, ha supuesto un cambio sustancial en la producción agrícola, pero también ha originado nuevos problemas sanitarios relacionados con la exposición a sustancias químicas (Parrón et al., 1996). Además, en el sector existe una creencia errónea y generalizada de que a mayor dosis de plaguicida mayor es el rendimiento de los cultivos hortofrutícolas. Esto supone una exposición adicional a la estrictamente necesaria y que plantea un problema de salud pública a medio y largo plazo.

La exposición a plaguicidas, al igual que ocurre con cualquier otro xenobiótico, puede ser aguda o crónica, provocando diferentes efectos en uno u otro caso. La exposición aguda a dosis altas (intoxicación) ha sido muy estudiada a lo largo de los años y es fácil de diagnosticar y tratar desde el punto de vista clínico, por lo que sus consecuencias están muy bien establecidas. Sin embargo, los efectos sobre la salud derivados de la exposición crónica a dosis bajas de plaguicidas (inferiores al umbral que origina síntomas agudos) son muy difíciles

de evaluar debido a las limitaciones propias de los estudios clínicos y epidemiológicos, por lo que no se ha podido establecer una relación dosis-respuesta.

A su vez, la utilización mezclas de plaguicidas, circunstancia bastante habitual en la agricultura intensiva de invernadero, complica aún más la situación. Muchos de los estudios de toxicidad que implican mezclas de plaguicidas han generado un amplio espectro de respuestas, en el cual la complejidad de las interacciones depende de las diferencias en las propiedades químicas de cada uno de los componentes de la mezcla y del modo de acción toxica del plaguicida (Hernández et al., 2013d).

Por otro lado, los invernaderos, como lugares de trabajo, se caracterizan por ser espacios cerrados y generalmente estrechos, con una elevada temperatura y humedad, y donde la circulación de aire es mínima, lo que permite que se concentren sustancias volátiles procedentes de la aplicación de plaguicidas. En este ambiente el trabajador realiza actividad física, lo que hace que, con frecuencia, no utilice de manera correcta las medidas preventivas recomendadas para el uso de los plaguicidas, tales como ropa adecuada o equipos de protección individual (EPIs), debido a la alta temperatura y humedad del ambiente de trabajo. A todo esto hay que sumarle los hábitos inadecuados, como fumar o comer mientras se manipulan o aplican los plaguicidas.

En relación a las exposiciones crónicas, éstas dan lugar a alteraciones bioquímicas que no necesariamente conducen de manera inmediata a síntomas clínicos reconocibles, aunque se trata de respuestas biológicas que, al ser medibles y objetivables, pueden usarse como biomarcadores (Lopez Guarnido, 2005). Por eso se considera como una forma de toxicidad subclínica que, tras un período de latencia, podría desencadenar manifestaciones clínicas propias de una intoxicación crónica.

Por tanto, la exposición ocupacional a plaguicidas, como resultado de la preparación (mezcla y carga) o la aplicación de estos compuestos, genera un riesgo de sufrir efectos adversos para la salud debido a la posibilidad de exposición puntual a dosis altas o de exposición crónica a dosis bajas. Esta exposición se produce principalmente por contacto con la piel, seguida de inhalación y, en último término, ingestión (Strelitz et al., 2014). Por vía respiratoria se absorben los plaguicidas gaseosos y volátiles y su absorción dependerá en gran medida de la naturaleza del principio activo y la forma de aplicación. Tras la aplicación del plaguicida, el

trabajador está expuesto a los aerosoles generados. Estos normalmente poseen un tamaño de partícula lo suficientemente grande como para que no alcance el espacio alveolar, pero pueden producir efectos locales sobre las vías respiratorias. No obstante, la vía más importante de absorción en el medio laboral es la cutánea debido a la liposolubilidad de plaguicidas y las condiciones ambientales que dan lugar a la vasodilatación cutánea, lo cual se ve agravado por el uso inadecuado de indumentaria y EPIs. Por último, los plaguicidas se pueden absorber también por vía digestiva. Esto suele ser debido a malos hábitos higiénicos, a un uso negligente de los mismos, ingesta accidental con alimentos, agua, tabaco, *etc.* o intentos de autolisis.

La aplicación de plaguicidas de forma continuada puede ocasionar efectos adversos sobre la salud de carácter crónico (Bassil et al., 2007b; Mostafalou y Abdollahi, 2013) entre los que destacan: problemas inmunológicos (Castillo-Cadena et al., 2013; Corsini et al., 2013; Costa et al., 2013), respiratorios (Hernández et al., 2011; Ye et al., 2013), neurológicos (Androutsopoulos et al., 2011; Parrón et al., 2011), dermatológicos (Hanssen et al., 2015), sobre la salud reproductiva (Mehrpour et al., 2014) y la aparición de diferentes tipos de cáncer (Bassil et al., 2007a; Parrón et al., 2014) y genotoxicidad (Gómez-Martín et al., 2015).

A diferencia de los trabajadores, que están expuestos de forma ocupacional a plaguicidas, la población general presenta una exposición a través de la dieta, el agua de consumo y la contaminación ambiental. Sin embargo, los efectos que producen en la población general resultan mucho más difíciles de demostrar debido a que su exposición es menor y está combinada con otras exposiciones ambientales y estilos de vida que hacen difícil establecer relaciones de causalidad. Por el contrario, los trabajadores de agricultura intensiva presentan una exposición mucho más acusada debido al uso regular que hacen de estos productos a lo largo de su vida laboral.

3. BIOMARCADORES ÚTILES EN LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN Y EL EFECTO CRÓNICO A PLAGUICIDAS

3.1. Empleo de biomarcadores para la evaluación del riesgo en la salud humana

Según el MeSH (*Medical Subject Headings*, descriptores de temas médicos, publicado anualmente por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos), biomarcadores o marcadores biológicos son aquellos parámetros biológicos medibles y cuantificables que sirven como índices para la evaluación relacionada con la salud y la fisiología, tales como el riesgo de padecer enfermedades o trastornos psiquiátricos, la exposición ambiental y sus efectos, el diagnóstico de enfermedades, procesos metabólicos, abuso de sustancias, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, *etc.* Ejemplos de biomarcadores serían la actividad catalítica de una determinada enzima, concentración de una hormona, distribución del fenotipo de genes específicos en una población, presencia de moléculas biológicas en fluidos o tejidos, *etc.*

Dependiendo de la finalidad para la que se utilicen, los biomarcadores se pueden clasificar en tres grupos: biomarcadores de exposición, de efecto (o de daño específico) y de susceptibilidad (Arango, 2012; Gil y Hernández, 2009; Sogorb et al., 2014). Los primeros hacen referencia a la medida directa de una sustancia química, o de alguno de sus metabolitos (biomarcadores de exposición selectivos) o subproductos generados tras la interacción de un xenobiótico con una molécula o célula diana (biomarcadores de exposición no selectivos) en muestras biológicas (orina, pelo, sangre, meconio, saliva, *etc.*).

Por su parte, los biomarcadores de efecto evalúan alteraciones bioquímicas, fisiológicas o del comportamiento producidas en el organismo tras la exposición a xenobióticos y que pueden terminar produciendo una enfermedad. Entre ellos destacan parámetros bioquímicos sanguíneos, alteraciones enzimáticas o de proteínas, formación de aductos, pruebas funcionales respiratorias, neuropsicológicas, *etc.* Su determinación permite prevenir la enfermedad incluso antes de que se manifieste clínicamente. Los biomarcadores de efecto se suelen organizar en grupos según el órgano o sistema que se encuentre afectado (biomarcadores órgano-específicos). Así, los hay de nefrotoxicidad, hepatotoxicidad,

neurotoxicidad e inmunotoxicidad, entre otros (Hernández et al., 2014, 2013d). Además, existen otros biomarcadores de carácter inespecífico, como los de estrés oxidativo y genotoxicidad, cuya alteración no hace referencia al órgano donde se produce el efecto tóxico sino más bien a un daño molecular genérico (Gil y Pla, 2001). Estos biomarcadores tienen una gran importancia en estudios preclínicos para valorar precozmente el potencial tóxico de una nueva molécula terapéutica antes de que sus efectos adversos sean clínicamente evidentes.

Por último, los biomarcadores de susceptibilidad muestran la diferente vulnerabilidad individual frente a los efectos de un tóxico. La mayoría de ellos se refieren a las variantes genéticas de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Así, ante un determinado xenobiótico, cada individuo es capaz de metabolizarlo en mayor o menor extensión dependiendo de polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras, siendo en unos casos la exposición al tóxico más grave que en otros según sea mayor o menor la velocidad de metabolización de la enzima (Chen et al., 2014).

No obstante, un elemento fundamental antes de utilizar un marcador biológico en estudios de salud humana es su validación. Esto implica que la selección y aprobación de un biomarcador requiere un cuidadoso estudio de la especificidad, fiabilidad y sensibilidad, las cuales deben ser comparadas con otras variables (Arango, 2012).

3.2. Biomarcadores de exposición a plaguicidas (DAPs y esterasas)

Los plaguicidas tienen un gran impacto en la salud humana, incluso a bajos niveles de exposición. Por eso es importante garantizar no solo que los trabajadores o los consumidores no están expuestos, sino también que el tóxico no se acumule en el organismo ni afecte seriamente ninguna función del mismo. Este es el motivo por el que la biomonitorización es una herramienta muy útil para evaluar la exposición tanto de tipo ocupacional como ambiental (Tsatsakis et al., 2012).

Los biomarcadores de exposición a plaguicidas consisten en la determinación directa del compuesto original en muestras biológicas, antes de que haya sufrido biotransformación. Sin embargo, debido a la rápida metabolización de algunos de ellos y corta vida media, es preferible la determinación de sus metabolitos, principalmente en orina.

El conocimiento de los niveles de exposición es una de las fases del proceso de evaluación del riesgo y puede determinarse midiendo la cantidad de tóxico que ingresa en el organismo, es decir, su dosis interna (OMS, 2010). La medida de estos biomarcadores de exposición contribuye a predecir un cambio en el riesgo de padecer una enfermedad, pero por sí mismos no pueden predecir el efecto tóxico del plaguicida. Para esto sería necesario utilizar biomarcadores indirectos que determinan alguno de los subproductos o efectos producidos por la interacción del tóxico con una biomolécula (Mayeux, 2004). Este es el caso de las esterasas que reaccionan con OPs (acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, carboxilesterasas, *etc.*).

Los biomarcadores de exposición, por lo general, se determinan mediante diversos métodos analíticos, basados en la cromatografía (de gases o líquida) como metodología de separación de analitos. Sin embargo, los sistemas de detección van desde la detección de la absorbancia UV-VIS hasta el análisis del espectro de masas, pasando por la captura electrónica. Tanto los plaguicidas como sus metabolitos se suelen determinar en una amplia variedad de matrices biológicas, incluyendo orina, suero, leche materna, tejido adiposo, meconio, *etc.* (Araoud, 2011).

3.2.1. Dialquil fosfatos (DAPs)

Los compuestos OPs, son los plaguicidas más ampliamente estudiados. Se pueden oxidar a un compuesto más reactivo denominado oxón (algunas veces comercializados ya de este modo), reacción denominada desulfuración oxidativa que está mediada por CYP450. Posteriormente, los oxones se hidrolizan por acción de las A-esterasas, en concreto la paraoxonasa-1 (PON1), dando lugar a metabolitos dialquil fosfatos (DAPs), comunes a casi todos los OPs (Tabla 4) y que se posteriormente se eliminan por la orina (Kapka-Skrzypczak et al., 2011).

Tabla 4. Metabolitos DAPs de los plaguicidas OPs autorizados para uso agrícola en la Unión Europea

Plaguicida	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
Clorpirifós				X	X	
Metil-clorpirifós	X	X				
Dimetoato	X	X	X			
Etoprofos						
Fenamifos						
Fosfiazato						
Fosmet	X	X	X			
Malation	X	X	X			
Metil-pirimifós	X	X				
Fosetil						
Metil tolclofós	X	X				

DMP: dimetil fosfato; **DMTP:** dimetil tiofosfato; **DMDTP:** dimetil ditiofosfato; **DEP:** dietil fosfato; **DETP:** dietil tiofosfato; **DEDTP:** dietil ditiofosfato

Tras la interacción del metabolito oxón con sus principales dianas moleculares (colinesterasas, o B-esterasas), se libera la fracción orgánica de la molécula y el grupo fosfato puede experimentar una reacción de "envejecimiento" por la pérdida de alguno de los grupos O,O-dialquilo. En este caso ya no se puede regenerar la enzima, que queda irreversiblemente inhibida e inactiva (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Sogorb y Vilanova, 2002). De un modo esquemático (Figura 11):

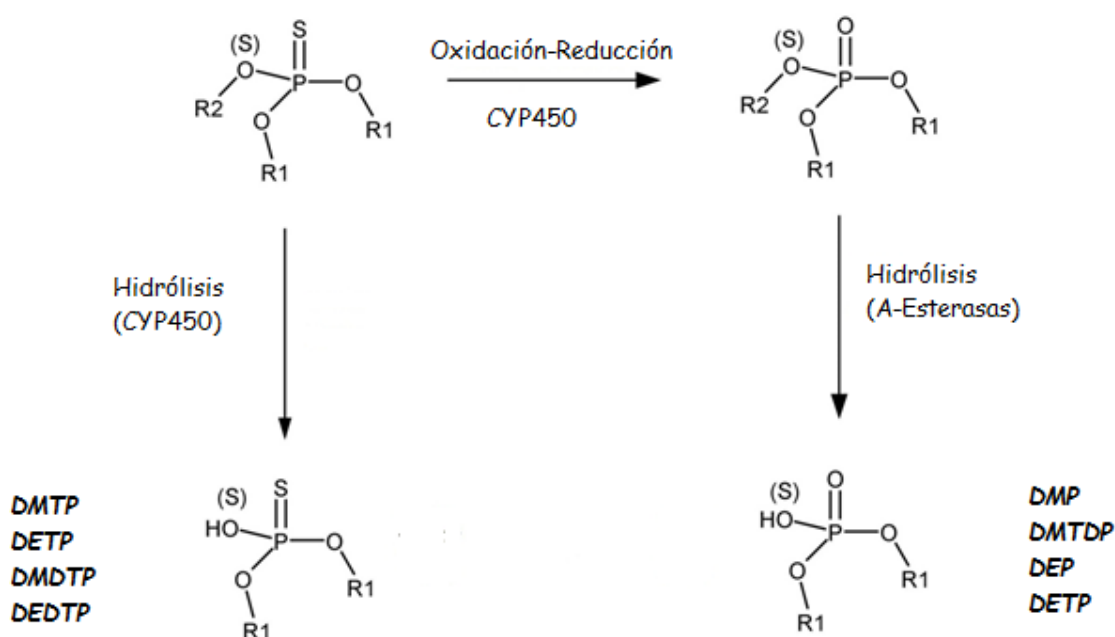


Figura11. Esquema general del metabolismo de plaguicidas OPs hacia la formación de sus metabolitos comunes denominados dialquilo fosfatos (DAPs). **DMP:** dimetil fosfato; **DEP:** dietil fosfato; **DMTP:** dimetil tiofosfato; **DETP:** dietil tiofosfato; **DMDTP:** dimetil ditioniofosfato; **DEDTP:** dietil ditioniofosfato.

Por otro lado, según los protocolos que establece la OMS, la monitorización biológica de los trabajadores expuestos a plaguicidas OPs debe basarse no solo en la determinación de DAPs en orina, sino también en la determinación de la actividad colinesterasa. Además, se ha recomendado añadir otras pruebas adicionales como la determinación de la actividad PON1 (Hernández et al., 2005; Maroni et al., 1986). Aunque los insecticidas *N*-metilcarbamatos también pueden inhibir la colinesterasa, su efecto se revierte en muy pocas horas, por lo que la monitorización biológica de esta actividad enzimática no aporta valor, salvo que se trate de una exposición aguda a dosis altas.

3.2.2. Colinesterasas (AChE y BChE)

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave en el sistema nervioso, encargada de catalizar la hidrólisis enzimática del neurotransmisor acetilcolina en las terminales sinápticas colinérgicas. Se encuentra en el espacio intersináptico de las neuronas colinérgicas, en la placa motora, en las membranas de los eritrocitos y en linfocitos. Su utilidad principal en toxicología radica en que es una diana típica de insecticidas OPs y *N*-metilcarbamatos. En presencia de estos, la AChE se fosforila o carbamila, respectivamente, no siendo ya capaz de hidrolizar la molécula de acetilcolina, que se acumula y estimula sus receptores muscarínicos

y nicotínicos postsinápticos, provocando los síntomas característicos de la intoxicación aguda.

La AChE eritrocitaria representa uno de los principales biomarcadores para evaluar la exposición ambiental y ocupacional a OPs. Su uso está cada día más extendido, no solo para la biomonitorización de plaguicidas sino que, gracias a su elevada sensibilidad, también como marcador para otros contaminantes como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, detergentes, plaguicidas, pinturas y nanomateriales (Lionetto et al., 2013). En este sentido, la AChE, además de inhibirse por insecticidas OPs y *N*-metilcarbamatos, también puede hacerlo de forma indirecta por plaguicidas capaces de producir estrés oxidativo (tales como piretroides, neonicotinoides, organoclorados, triazinas o paraquat), ya que estos producen peroxidación lipídica de la membrana de eritrocitos y afectan a las enzimas presentes en la misma, entre las que se encuentran la AChE (López et al., 2007).

El otro tipo de colinesterasa estudiada, la colinesterasa plasmática (BChE), es una enzima que se encuentra en el plasma sanguíneo y que participa en la hidrólisis de ésteres, aunque su función biológica no está aún clara. Sin embargo, recientemente, se ha implicado en la desacilación de la grelina, una de las hormonas encargada de regular el apetito y la saciedad (Brimijoin et al., 2016). Su deficiencia congénita representa una alteración enzimática hereditaria que enlentece el metabolismo de algunos medicamentos como relajantes musculares (succinilcolina y mivacurium), algunos anestésicos locales y los compuestos OPs. Se calcula que entre el 0,3 y el 0,5 % de la población mundial puede presentar una mutación, siendo los individuos de ascendencia persa, judía y los nativos americanos de Alaska los que poseen mayor riesgo de padecerla (Lurati, 2013). A su vez, hay causas no genéticas de deficiencia de BChE, entre las que se incluyen el embarazo, enfermedades hepáticas, infecciones crónicas, cáncer, desnutrición o lesiones por quemaduras (Fernández Prieto et al., 2011).

Recientemente, la BChE plasmática también se ha relacionado con exposiciones ocupacionales a metales como Pb o Zn (Kasperczyk et al., 2013) y a ésteres de ftalatos (Wang et al., 2015).

En el caso de intoxicaciones agudas por compuestos OPs o *N*-metilcarbamatos, lo primero que sucede es un rápido descenso de la BChE plasmática, acompañado de un descenso más progresivo de la AChE. Pasados 1-3 días de la exposición, la actividad BChE plasmática

comienza a recuperarse, pero la AChE sigue descendida hasta un máximo de 12 semanas, tras cual se empieza a recuperar. Por el contrario, en el caso de exposiciones crónicas, es igual de importante tanto el grado como la velocidad de inhibición, ya que aun tratándose de pequeñas exposiciones, si son continuadas, su actividad puede descender gradualmente hasta valores bajos y con escasa sintomatología (Hernández et al., 2006b).

3.2.3. Paraoxonasa-1 (PON1)

La PON1 es una enzima dependiente de Ca^{2+} que pertenece a la familia de las paraoxonasas, a la que también pertenecen la PON2 y la PON3. Se sintetiza en el hígado y parte de ella es secretada posteriormente al plasma donde se asocia a lipoproteínas de alta densidad (HDL). La PON1 presenta varios polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNPs) tanto en su región codificante como en la promotora. Sin embargo, de todos ellos, el *Q192R* y *L55M* de la región codificante y el *C-108T* de la región promotora, han sido los más estudiados (Hernández et al., 2007; Mackness y Mackness, 2015).

La PON1 es una enzima de gran interés toxicológico que posee la capacidad de hidrolizar un amplio rango de sustratos entre los que se encuentran medicamentos (antibióticos tipo quinolonas, espironolactona y algunas estatinas), lactonas, tiolactonas, esteres aromáticos, OPs, carbonatos cíclicos, gases nerviosos como sarín o somán, metabolitos glucurónidos y ésteres de estrógenos (Karataş et al., 2016; Mackness y Mackness, 2015). A pesar del amplio abanico de sustratos exógenos que presenta, el sustrato biológico de esta enzima es aún desconocido.

Aunque la PON1 se considera como un biomarcador de efecto, en algunos casos se ha utilizado para evaluar el grado de exposición a plaguicidas, tanto aguda (Sözmen et al., 2002) como crónica (Hernández et al., 2007).

En los últimos años, la actividad PON1 se ha asociado a la exposición ocupacional de otros agentes ambientales, entre ellos radiación ionizante (Serhatlioglu et al., 2003), polvo de cemento (Aydin et al., 2010), anestésicos utilizados en quirófanos (Cerit et al., 2014) y la exposición a Pb (Kamal et al., 2011; Li et al., 2006; Permpongpaiboon et al., 2011). En todos estos estudios, la exposición a los diferentes xenobióticos dio lugar a un descenso de la actividad PON1.

3.3. Biomarcadores de efecto tóxico

3.3.1. Biomarcadores de estrés oxidativo

Especies Reactivas y estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes, de manera que el balance entre ambas se ve descompensado en favor de las primeras. Este desequilibrio puede deberse a una excesiva producción de especies reactivas o radicales libres, o a un descenso en las defensas antioxidantes o a ambas circunstancias. En cualquier caso, el estrés oxidativo puede producir un daño al material genético, lípidos y proteínas. También puede comprometer la función y viabilidad de la célula e inducir una variedad de respuestas celulares a través de la generación de especies reactivas secundarias, conducentes a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Dalle-Donne et al., 2006).

El origen de las especies o sustancias reactivas en el organismo puede ser tanto endógeno como exógeno (Figura 12). En el primer caso surgen a partir de células fagocitarias, procesos inflamatorios, cadena de transporte de electrones mitocondrial, oxidaciones llevadas a cabo por CYP450s, reacciones enzimáticas (incluyendo ciertas oxidasas, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, deshidrogenasas y peroxidasas), reacciones de autooxidación, etc. También pueden tener un origen exógeno, a partir del radical hidroxilo ambiental ($\bullet\text{OH}$), radiaciones ionizantes, aditivos alimentarios, contaminación ambiental, drogas, metales, etc. (Amir Aslani y Ghobadi, 2016; Halliwell, 2011).

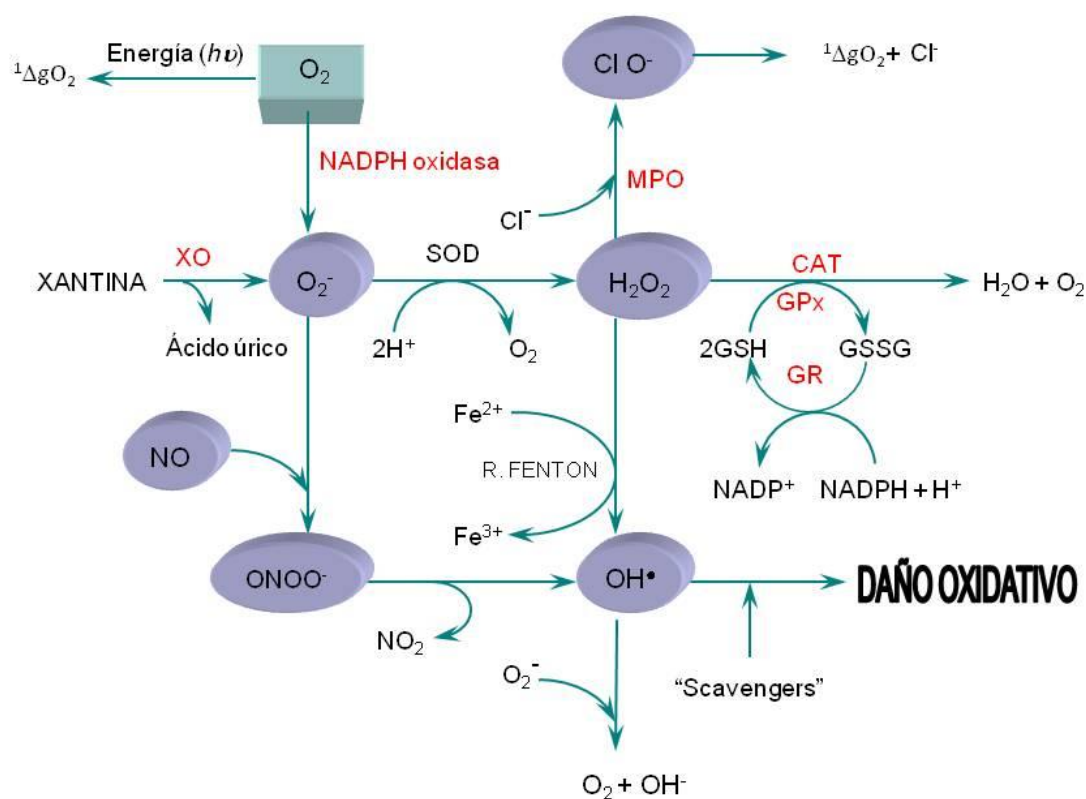
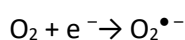
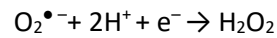


Figura 12. Ejemplo de reacciones metabólicas que conducen a daño oxidativo. $^1\Delta O_2$: oxígeno singlete, $O_2^{\bullet -}$: anión superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, OH^{\bullet} : radical hidroxilo, ClO^- : anión hipoclorito, NO^{\bullet} : óxido nítrico, MPO: mieloperoxidasa, Cl^- : anión cloruro, XO: xantina oxidasa, SOD: superóxido-dismutasa, CAT: catalasa, GPx glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido y GSSG: glutatión oxidado. FUENTE: (Lopez Guarnido, 2005).

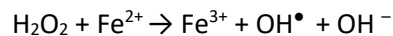
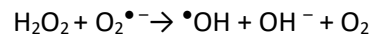
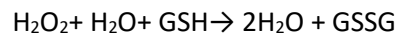
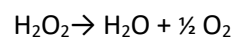
Dentro de las sustancias reactivas, las más habituales son los radicales libres de oxígeno que, junto con otras moléculas relacionadas tales como peróxidos o iones de oxígeno, constituyen las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). El oxígeno en estado natural se encuentra en forma diatómica (O_2) y actúa como elemento oxidante al aceptar hasta cuatro electrones en su orbital más externo (reducción tetravalente) para dar lugar a dos moléculas de agua. Este oxígeno molecular es un sustrato natural para la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y complejos mitocondriales I y III. Pero el oxígeno también puede aceptar uno, dos o tres electrones y sufrir reducción univalente, divalente o trivalente, dando lugar a la formación del radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), respectivamente.



El superóxido se inactiva mediante una reacción de dismutación catalizada por la superóxido-dismutasa (SOD), dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno:



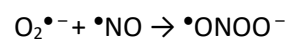
El peróxido de hidrógeno, a su vez, es eliminado por las células a través de dos reacciones, una de ellas catalizada por la catalasa (CAT), mediante la acción conjunta de la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) y la segunda catalizada por hierro en la reacción de Haber-Weiss y Fenton.



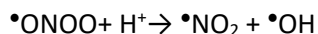
No obstante existen especies reactivas que tienen su origen en otros átomos y moléculas diferentes al oxígeno. Entre ellos destacan las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) en cuya formación intervienen los óxidos de nitrógeno NO y NO₂. También existen otras sustancias reactivas, como los derivados de tioles (S[•]), derivados orgánicos, derivados clorados (•CCl₃⁻), etc. Las RNS se producen como consecuencia de la acción conjunta de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS), que utiliza oxígeno como sustrato, o a partir del nitrato (•NO₃⁻) de la dieta que posteriormente es reducido a iones nitrito (NO₂⁻) (Carocho y Ferreira, 2013; Cobb y Cole, 2015). Finalmente, la reducción del nitrito produce radicales de óxido nítrico (•NO).



Por tanto, en ambos casos el punto de partida para la formación de RNS es el óxido nítrico (•NO) que, además, es capaz de reaccionar con el radical superóxido para formar un radical peroxinitrito (•ONOO⁻).



A su vez, la reducción de los nitritos y la acidificación de los radicales peroxinitritos dan lugar a la formación de radicales de dióxido de nitrógeno.



Sistema de defensas antioxidantes

Para hacer frente al exceso de sustancias reactivas, los organismos vivos presentan unos mecanismos de defensa capaces de restablecer el equilibrio redox. Entre ellos destaca una compleja red de defensa antioxidante cuya función es reducir al mínimo los niveles de especies reactivas para que así desempeñen su función biológica correspondiente, que ocurre a bajas concentraciones de las mismos (Amir Aslani y Ghobadi, 2016; Halliwell, 2011).

Los mecanismos de defensa antioxidante, pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. En ambos casos, y ante una situación de estrés oxidativo, las defensas primarias se encargan de regular los niveles de especies reactivas impidiendo la formación de nuevas especies o neutralizando las existentes. Cuando se desborda esta capacidad de regulación, entra en juego la segunda línea de defensa (defensas secundarias), que contribuye a disminuir el estrés oxidativo pero sin neutralizar directamente las especies reactivas, sino que actúa como soporte de otros sistemas antioxidantes endógenos (Abdollahi et al., 2004). Entre las enzimas antioxidantes primarias destacan la GPx, CAT, SOD y las peroxirredoxinas y entre las secundarias la glutatión reductasa (GR) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Los antioxidantes no enzimáticos, por su parte, pueden tener un origen metabólico o ingerirse a través de la dieta (antioxidantes-nutrientes). Los primeros incluyen al glutatión reducido (GSH), tiorredoxina, glutaredoxina, ácido lipoico, melatonina, coenzima Q10, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metales, etc. En cuanto a los antioxidantes presentes en la dieta, se trata de compuestos exógenos como las vitaminas C y E, carotenoides (vitamina A), oligoelementos (selenio, azufre, zinc), polifenoles, etc.

Daño oxidativo a biomoléculas

Como se ha mencionado anteriormente, en condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio entre la concentración de sustancias reactivas y la de defensas antioxidantes. A altas concentraciones de sustancias reactivas se rompe este equilibrio y se produce una situación de estrés oxidativo, en la que hay una mayor probabilidad de que las sustancias reactivas interaccionen y dañen a biomoléculas importantes para las células. Entre ellas se incluyen proteínas, enzimas, aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, ocasionando degeneración celular (Amir Aslani y Ghobadi, 2016). Este daño molecular se detalla a continuación:

- **Daño oxidativo a lípidos:** se produce cuando una especie reactiva interacciona con un carbono de la cadena alquilo de un ácido graso, iniciando lo que se conoce como peroxidación lipídica (Figura 13). Cuando ocurre sobre los enlaces insaturados de los lípidos de la membrana se produce una disrupción de la misma, alterando su fluidez y permeabilidad. Esto provoca una alteración de las propiedades de transporte a través de la membrana y la incorporación de proteínas a la misma.

En una primera fase de la peroxidación lipídica, la etapa de iniciación, el lípido insaturado es atacado por un radical hidroxilo para producir un radical libre lipídico. Una vez generado sufre un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O_2 y formar un radical lipoperóxido. Este radical libre puede dar lugar a endoperóxidos, o bien tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metílico de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperóxido. El primero de ellos se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño (reacción en cadena). Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena (Martinez - Cayuela, 1998; Yin et al., 2011).

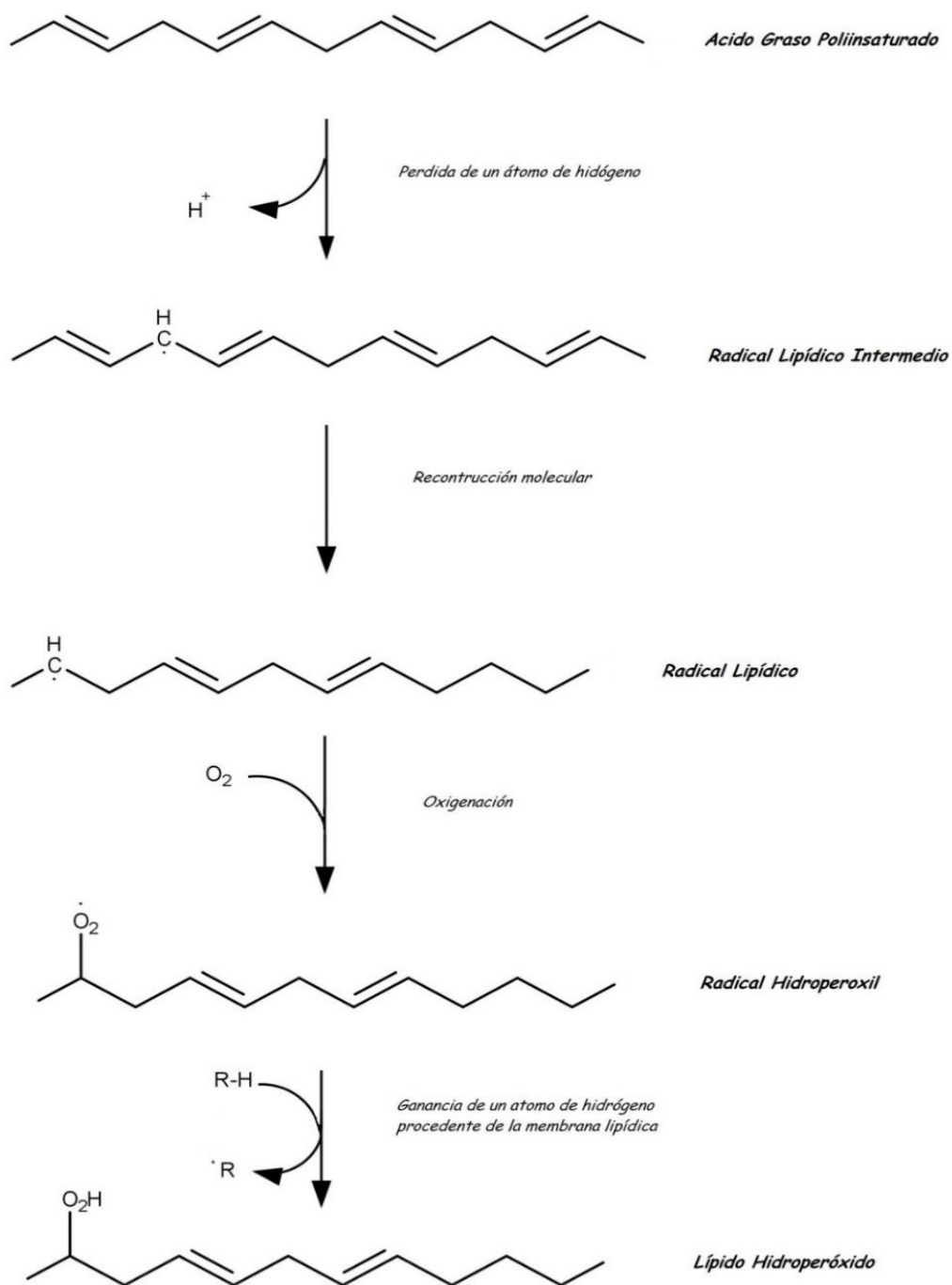


Figura 13. Esquema general de las reacciones que acontecen durante el proceso de peroxidación lipídica. Fuente: Wikipedia.

Como resultado de la peroxidación lipídica también puede aparecer un gran número de subproductos tales como malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal, alcanos, alquenos, dienos conjugados y diversos hidróxidos e hidroperóxidos lipídicos.

- **Daño oxidativo a ácidos nucleicos:** el estrés oxidativo puede afectar la escisión del ADN, la reticulación ADN-proteína y la oxidación de bases nitrogenadas (purinas). Esto puede dar lugar a mutaciones genéticas o bloqueos de la replicación.
- **Daño oxidativo a proteínas, aminoácidos y enzimas:** el daño oxidativo a enzimas y proteínas que contienen azufre puede dar lugar a desnaturalización, inactivación y reticulación de las mismas. Asimismo, los aminoácidos que poseen anillos aromáticos son más proclives a ser oxidados por especies reactivas, alterando su conformación espacial y, por tanto, su función. Aunque las proteínas modificadas por oxidación son normalmente reconocidas y degradadas dentro de las células, parte de ellas pueden acumularse y originar disfunción celular.
- **Daño oxidativo en carbohidratos:** aunque es posible, ocurre en menor medida. La interacción entre una especie reactiva y un carbohidrato puede alterar las funciones de los receptores celulares (hormonales y de neurotransmisores), la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas.

Biomarcadores de estrés oxidativo

Existen evidencias suficientes de que el estrés oxidativo producido por numerosos xenobióticos está implicado en el desarrollo de ciertas enfermedades. Entre ellas destacan procesos neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson), cataratas, aterosclerosis, cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal, asma y el envejecimiento (Abdollahi et al., 2004).

El inconveniente que plantea el estudio del estrés oxidativo es que el tiempo de vida media de las especies reactivas es muy pequeño, en algunos casos por debajo de un segundo, por lo que su determinación es prácticamente imposible. Por esto se utilizan biomarcadores que determinen el estrés oxidativo de forma indirecta. La elección de uno u otro biomarcador de estrés oxidativo depende de la finalidad para la que se quiera medir. Así, para determinar el nivel de estrés oxidativo general se emplean biomarcadores que miden la capacidad antioxidante total (TAC, por sus siglas en inglés), tales como capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés), capacidad de reducción férrica del suero/plasma (FRAS/FRAP, por sus siglas en inglés) y la capacidad antioxidante

equivalente al Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un antioxidante análogo a la vitamina E), conocida por sus siglas en inglés como TEAC.

Al margen de la medida del nivel global de estrés oxidativo, se puede determinar el daño oxidativo producido en biomoléculas. Así, el daño oxidativo en lípidos se puede evaluar determinando subproductos de la peroxidación lipídica, tales como malondialdehído (MDA), isoprostanos, acroleína o 4-hidroxinonenal (4-HNE). El MDA es un cetoaldehído producido por la degradación peroxidativa de ácidos grasos poliinsaturados con dos o más dobles enlaces, aunque también puede formarse durante el metabolismo del ácido eicosanoico, un ácido graso saturado. El exceso de MDA puede combinarse con grupos aminos de proteínas produciendo aductos. Por su parte, los F₂-Isoprostanos son una familia de 64 prostaglandinas generadas *in vivo* por peroxidación del ácido araquidónico inducida por radicales libres y posterior acción de fosfatasa que liberan sus productos de reacción al torrente sanguíneo para ser finalmente excretados en orina como isoprostanos libres (Dalle-Donne et al., 2006). Su determinación se lleva a cabo por técnicas cromatográficas (HPLC y GC). Por otro lado, el 4-HNE es el aldehído mayoritario y de mayor toxicidad generado por el ataque de especies reactivas a ácidos grasos insaturados ω -6. Aunque en condiciones fisiológicas se produce en pequeñas cantidades, sus concentraciones plasmáticas aumentan significativamente en situaciones de estrés oxidativo. El método analítico más comúnmente empleado para su detección es HPLC con detector UV/VIS (Dalle-Donne et al., 2006).

El principal producto de la peroxidación lipídica es el MDA. Su concentración se determina habitualmente en plasma mediante derivatización con ácido 2-tiobarbitúrico, que constituye el método denominado de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés). Con este procedimiento se obtiene un complejo MDA-TBA cuya determinación se suele llevar a cabo mediante técnicas espectrofotométricas (UV/VIS), o HPLC con detector fluorimétrico o UV/VIS (Del Rio et al., 2005).

Por su parte, el daño oxidativo a proteínas se determina a partir de subproductos resultantes del ataque de especies reactivas, tales como hidroperóxidos, y que pueden generar nuevas especies reactivas. Entre ellas destacan las proteínas nitradas, los aminoácidos nitrados (principalmente de tirosina, metionina y triptófano) o proteínas carboniladas generadas por oxidación de cadenas laterales (2-pirrolidona, semialdehído glutámico, semialdehído aminoacético, ácido 2-amino-3-cetobutírico, etc.). Los aminoácidos azufrados son más susceptibles al daño oxidativo debido a la generación de puentes disulfuro que pueden

formar agregados. En el caso de otros aminoácidos, como la lisina o la histidina, se produce oxidación a grupos aldehídos que también puede dar lugar a grupos carbonilo. Sin embargo, uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el daño a proteínas es la determinación de tioles totales (SHT). Los tioles son compuestos endógenos que poseen al menos un grupo sulfhidrilo (-SH), principal responsable de sus efectos antioxidantes. (Costa et al., 2006). El método estándar para la determinación de tioles de suero humano fue descrito originalmente por Ellman (Ellman, 1959).

En relación al daño oxidativo al ADN, relacionado con proceso de carcinogénesis, las especies reactivas son capaces de producir hidroxilación o nitración en las bases nitrogenadas del ADN. Posteriormente, la base dañada es reconocida y reparada, liberándose la base oxidada o nitrada a la sangre. Así, la determinación de los niveles de estas bases permite evaluar el daño genotóxico producido por las especies reactivas. Entre los biomarcadores más utilizados a tal efecto se encuentran la bases oxidadas (8-hidroxidesoxiguanidina, —8-OHdG—; 8-oxoguanina, —8-oxoG—; 5-hidroxiuracilo, —5-OHUr—; 8-oxoadenina, —8-oxoA—) o nitradas (3-nitrotirosina, —3-NT—). De todos ellos habitualmente se determina el 8-OHdG mediante HPLC con detector de espectrometría de masas o UV/VIS.

Por último, también se puede medir la actividad de enzimas antioxidantes como biomarcadores de estrés oxidativo. Entre ellas, las más utilizadas son la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), γ -glutamilttransferasa (GGT), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Todas ellas contribuyen a eliminar de manera eficiente especies reactivas tóxicas y son responsables, en parte, de la protección frente el estrés oxidativo (López et al., 2007). Por eso pueden considerarse como biomarcadores de la actividad antioxidante y, en caso de mostrar una menor actividad catalítica, serían también indicadores de estrés oxidativo.

Estudios recientes sugieren que la actividad GGT en suero puede ser un biomarcador precoz de estrés oxidativo (Ferguson et al., 2011; Irie et al., 2012; Lee y Jacobs, 2009; Onur et al., 2014; Ucar et al., 2015). La GGT es una enzima que se sintetiza en el hígado y se localiza en la superficie externa de la membrana plasmática. Allí ejerce un papel importante en la homeostasis del glutatión reducido (GSH), uno de los principales metabolitos antioxidantes, al hidrolizarlo en dos fracciones: γ -glutamilt-cisteína y cisteinilglicina. Sin embargo, en condiciones fisiológicas la GGT puede generar indirectamente especies reactivas de oxígeno en presencia metales de transición como el hierro (Lim et al., 2004). Este hecho se basa en

que la cisteinilglicina es capaz de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual a su vez promueve la generación de especies reactivas a través de la reacción de Fenton (Lee y Jacobs, 2009).

3.3.2. Biomarcadores de daño renal

La principal vía de eliminación de plaguicidas y sus metabolitos es la renal. El riñón humano está formado por aproximadamente 1 millón de unidades funcionales llamadas nefronas. Las nefronas de dos riñones normales filtran entre 150 y 180 litros de plasma por día y luego procesan el filtrado para regular el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base, eliminando al mismo tiempo los productos de desecho. A medida que el filtrado glomerular se mueve a lo largo de la compleja estructura tubular de cada nefrona, sus componentes pueden concentrarse en el túbulo proximal y, en algunos casos, en el túbulo distal y el conducto colector. Estas altas concentraciones intratubulares, junto con los mecanismos de reabsorción tubular, aumentan las concentraciones intracelulares de sustancias químicas. Además, el transporte de agentes tóxicos desde los capilares peritubulares hasta la membrana basolateral de las células tubulares contribuye también a su acumulación intracelular (Bonventre et al., 2010).

Sin embargo, las células tubulares renales también muestran actividad metabólica, por lo que pueden activar "*in situ*" determinados compuestos y generar metabolitos reactivos. La disfunción celular resultante puede conducir a daño, y posterior necrosis, de células tubulares renales. La detección precoz de la lesión renal sería factible utilizando diferentes biomarcadores basados en los mecanismos de toxicidad de cada xenobiótico (Hernández et al., 2014). No obstante, este enfoque no sería posible en aquellos casos en los que no está bien establecido el mecanismo de toxicidad, por lo que una alternativa consiste en utilizar biomarcadores específicos de cada zona concreta de la nefrona, tales como el glomérulo y sistema tubular. Dentro de este se podrían utilizar biomarcadores más o menos específicos del túbulo proximal, túbulo distal y túbulo colector.

Los niveles séricos de urea y creatinina, parámetros utilizados clásicamente para valorar el estado de la función renal, no son adecuados para evaluar una afectación renal subclínica, ya que solo aumentan por encima del límite superior de la normalidad cuando el daño renal es muy extenso (Bagshaw y Gibney, 2008). Para detectar alteraciones bioquímicas de disfunción renal es preciso utilizar otros biomarcadores más sensibles. El grupo de trabajo sobre

nefrotoxicidad del consorcio de ensayos de seguridad predictiva (*Predictive Safety Testing Consortium*, PSTC) consideró los siguientes criterios como características fundamentales que debe cumplir un biomarcador renal (Bonventre et al., 2010):

- Identificar la lesión renal de una manera precoz.
- Reflejar el grado de toxicidad con el fin de caracterizar su relación dosis-respuesta.
- Mostrar fiabilidad en diversas especies, incluyendo los humanos.
- Localizar el sitio concreto de la lesión renal.
- Ser capaz de monitorizar la progresión de la lesión y la regeneración del daño.
- Conocer bien sus limitaciones.
- Poder determinarse en fluidos biológicos o tejidos.

Entre los biomarcadores de nueva generación capaces de detectar un daño renal subclínico (Figura 14), destacan aquellos que permiten evaluar:

- **Lesión tubular:** se suelen evaluar determinando los siguientes biomarcadores en orina: hidrolasas lisosomales (N-acetilglucosaminidasa, —NAG—; β -galactosidasa, — β -GAL—); enzimas citosólicas (lactato deshidrogenasa, —LDH—; glutatión-S-transferasa, —GST—), proteínas de membrana celular (γ -glutamiltanspeptidasa, —GGT—; alanina aminotransaminasa —ALT—, fosfatasa alcalina, —ALP— y molécula de lesión renal, —KIM1—). También se pueden determinar proteínas de bajo peso molecular, como α_1 -microglobulina (α_1 M), β_2 -microglobulina (β_2 M), cistatina C, clusterina, proteína de unión del retinol (RBP), etc.
- **Lesión glomerular:** además de los dos biomarcadores clásicos mencionados (urea y creatinina en suero), también se puede determinar cistatina C en suero, cuyo significado sería muy similar al de la creatinina. El daño glomerular también se puede evaluar mediante la determinación de proteínas totales en orina, albúmina urinaria, intercambiador de sodio-hidrógeno 3, —NHE-3—; inductor angiogénico rico en cisteína 61, —CYR61—; pro-péptido natriurético auricular, —pro-ANP—; etc. (Bagshaw y Gibney, 2008; Emeigh Hart, 2005; Ferguson et al., 2008; Parikh y Devarajan, 2008; Trof et al., 2006).

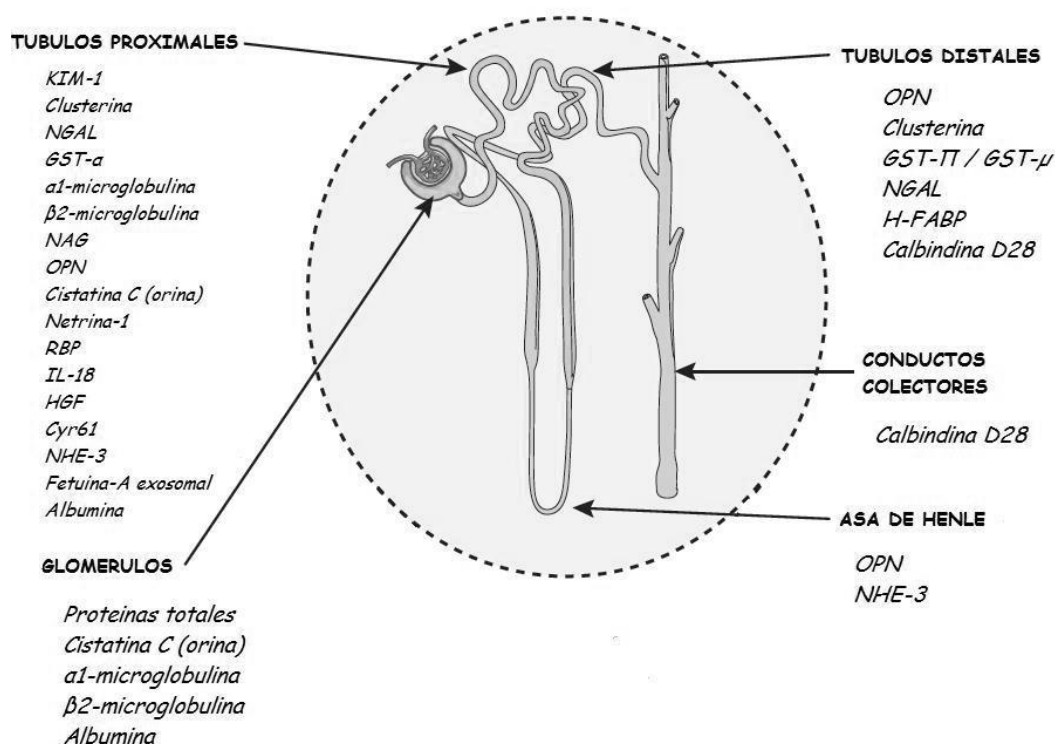


Figura 14. Biomarcadores que permiten detectar daño renal en segmentos específicos de la nefrona producido por compuestos nefrotóxicos. Fuente:(Bonventre et al., 2010)

Biomarcadores clásicos (creatinina sérica, IFG y albuminuria)

El principal biomarcador clásico para evaluar la función y daño renal es la creatinina plasmática. La creatinina es un compuesto orgánico de desecho generado por la degradación de la creatina de los músculos y que se excreta por la orina sin sufrir transformación. Se filtra libremente, y a velocidad constante, por el glomérulo y no es reabsorbida, lo que supone una ventaja importante como marcador de la función renal (Ford, 2014). Sin embargo, también presenta inconvenientes derivados fundamentalmente de su inespecificidad, pues puede aumentar durante la degradación muscular o disminuir tras enfermedades prolongadas que lleven asociada pérdida de masa muscular. Más recientemente, se ha propuesto la determinación de cistatina C, una proteína de bajo peso molecular, como biomarcador más sensible que la creatinina ya que detecta alteraciones más precoces de la función renal. Además, proporciona mejor información que la creatinina en determinados grupos de pacientes como ancianos, niños o diabéticos. Sin embargo, su concentración sérica puede alterarse por factores diferentes al filtrado glomerular (Wei et al., 2015).

Otro de los biomarcadores clásicos utilizado de modo habitual es el índice de filtración glomerular (IFG). Para evitar la necesidad de recoger orina de 24 horas, el IFG se puede estimar a partir de diversas fórmulas que usan la concentración sérica de creatinina y otras variables demográficas y antropométricas (edad, raza, sexo y altura). Este índice es una medida del volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo en los capilares glomerulares renales (no del reabsorbido o secretado a través de los túbulos) y también se conoce como aclaramiento renal de creatinina. Por tanto, el IFG puede considerarse como una medida sensible del total de nefronas funcionales. De todos los métodos descritos en bibliografía para el cálculo de IFG, en el presente estudio se ha elegido la ecuación (Cockcroft y Gault, 1976):

$$IFG = \frac{(140 - E) \times m}{72 \times C_{plasma}}$$

donde E es la edad en años del individuo, m la masa corporal expresada en Kg y C_{plasma} la concentración plasmática de creatinina expresada en mg/dl. El valor obtenido, en el caso de tratarse de una mujer, se corrige multiplicando por 0,85. El resultado se expresa en ml/min/1,73 m².

Otra ecuación para calcular el IFG es la propuesta por el grupo de trabajo sobre Modificación de la Dieta en la Enfermedad Renal (MDRD). En este caso, el IFG se estima a partir de la concentración de creatinina sérica, la edad y sexo del paciente, su origen étnico (raza negra o no), los niveles de urea y albúmina en suero (Levey et al., 2000). Esta ecuación tiene una versión reducida que no considera los valores de albumina. La fórmula MDRD es más exacta y precisa cuando el IFG es inferior a 90 ml/min/1,73 m². Para valores superiores se han propuesto ajustes de esta fórmula incorporando otras variables, entre las destaca la MDRD-4 o MDRD-IDMS (que solo tiene en cuenta la creatinina sérica, la edad, el sexo y la raza).

Otra de las fórmulas que estiman el valor del IFG es la CKD-EPI (Enfermedad Renal Crónica - Colaboración Epidemiológica) del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades digestivas y renales). Esta ecuación es más precisa que la MDRD, especialmente para valores altos de IFG (Levey et al., 2009). Para su cálculo tiene en cuenta los mismos parámetros que la ecuación MDRD-IDMS.

La albuminuria es otro de los parámetros clásicos utilizados para evaluar el daño glomerular. La albúmina es una proteína hidrosoluble, de 66 kDa y mayoritaria en el suero (supone aproximadamente el 60 % de las proteínas de la sangre). Sus principales funciones son la de mantener la presión oncótica y transportar moléculas a través del torrente sanguíneo (ácidos grasos, xenobióticos, hormonas, vitaminas, etc.). Se caracteriza por tener carga eléctrica negativa, al igual que la membrana glomerular, lo que impide que se filtre a la orina, además de que su tamaño molecular no le permite atravesar los poros de los capilares glomerulares. En caso de daño glomerular, disminuye la carga eléctrica negativa de la membrana glomerular y aumenta el tamaño de los poros, por lo que se filtra albúmina por la orina, donde aparece en cantidades elevadas.

Nuevos biomarcadores (microalbuminuria, β 2M, cistatina C, NGAL, OPN, TFF3)

Más recientemente han surgido nuevos biomarcadores, que se utilizan sobre todo en estudios preclínicos, entre los que se encuentra la microalbuminuria. Se entiende por microalbuminuria la excreción de albúmina en orina en concentraciones entre 30 y 300 mg/l. La microalbuminuria ha sido relacionada con la administración de antibióticos y quimioterápicos nefrotóxicos (Ferguson et al., 2008), lo que sugiere que puede ser también un marcador útil de daño celular en el túbulo proximal. Por tanto, el aumento de la excreción urinaria de albumina puede reflejar no solo alteraciones en la permeabilidad glomerular, sino también defectos en la reabsorción tubular proximal (Bonventre et al., 2010).

Las β -microglobulinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular pertenecientes a las globulinas y que circulan por el suero. De todas ellas destaca la β 2-microglobulina (β 2M), una proteína de 11,8 kDa que, unida a la cadena α_3 , forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I), situado en la superficie celular de todas las células nucleadas a excepción de los eritrocitos (Figura 15).

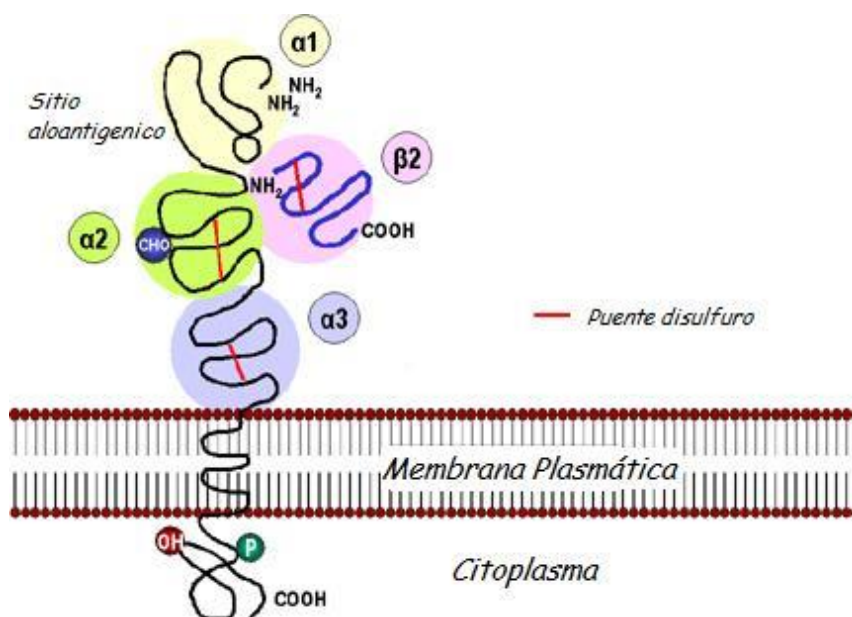


Figura 15. Representación del complejo de histocompatibilidad MHC I, donde se localiza la β_2 -microglobulina. FUENTE: <http://www.microbiologybook.org/bowers/mhc.htm> (editada)

La β_2 M es filtrada por el glomérulo y casi completamente reabsorbida y metabolizada por las células tubulares proximales. Una mayor excreción de β_2 M en orina indica lesión tubular precoz en caso de exposición a sustancias nefrotóxicas, cirugía cardíaca o trasplante renal (Ferguson et al., 2008). Desafortunadamente, la utilidad de β_2 M como biomarcador está limitada por su inestabilidad en la orina, ya que se degrada rápidamente a temperatura ambiente y a pH ácido.

La cistatina C es una proteína de bajo peso molecular perteneciente a la superfamilia de cistatinas, grupo de enzimas inhibidoras de la cisteína-proteasa. La cistatina C humana se produce a una velocidad constante por las células nucleadas del organismo en todos los fluidos corporales. La cistatina C plasmática se filtra libremente por el glomérulo y posteriormente se reabsorbe y degrada en el túbulo proximal renal. La concentración plasmática de cistatina C se correlaciona negativamente con el IFG, por lo que se puede considerar un marcador sensible de la tasa de filtración glomerular (Levey et al., 2009). A diferencia de la creatinina, la cistatina C no es secretada por el túbulo, por lo que su aparición en orina indica una disfunción tubular con fallo en la reabsorción (Charlton et al., 2014). Por tanto, la cistatina C en plasma es indicativa de daño glomerular, mientras que la urinaria indica daño tubular. Además, una baja concentración de cistatina C en plasma supone un factor de riesgo de eventos cardiovasculares secundarios, ya que se ha correlacionado con

los triglicéridos, colesterol LDL, índice de masa corporal (IMC) y edad de los individuos. En definitiva, la cistatina C puede ser determinada tanto en sangre como en orina.

La lipocaina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) es una glicoproteína de 25 kDa sintetizada en la médula ósea durante la mielopoiesis (maduración de granulocitos), aunque también pueden producirla las células epiteliales ante un daño o inflamación (Vaidya et al., 2008). Esta enzima se puede encontrar en forma de monómeros, formando homodímeros, o conjugada con gelatinasas, formando heterodímeros. En ambos casos, se expresa de modo limitado en el hígado, bazo y riñón. Se han descrito también otras funciones de la NGAL, como transporte de hierro, inhibición del crecimiento bacteriano o inducción del crecimiento de células epiteliales. En condiciones normales, una pequeña cantidad de NGAL se filtra por el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal mediante endocitosis mediada por megalina (un receptor de membrana). Tras la lesión celular, la NGAL se libera al plasma y, en caso de lesión renal, a orina (Bagshaw y Gibney, 2008).

La osteopontina (OPN) es una fosfoproteína estructural extracelular, que actúa también como citoquina proinflamatoria, de 44 kDa que se sintetiza en los huesos y en tejidos epiteliales (Jin et al., 2013). Se expresa en los riñones, principalmente en el túbulo proximal y distal y en el asa de Henle (Bonventre et al., 2010). Entre sus funciones están la de inhibir de la formación de oxalato de calcio, la regulación de la función de los osteoclastos durante la formación de hueso, la tumorigénesis y la acumulación de macrófagos (Vaidya et al., 2008). El aumento de OPN en orina se ha relacionado con lesión por isquemia-reperfusión renal, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica (inflamación y fibrosis túbulo-intersticial) y en rechazo al injerto renal (Jin et al., 2013).

El factor trébol 3 (TFF3) es un pequeño péptido de aproximadamente 7 kDa que pertenece a una familia de proteínas formada por tres miembros (TFF1, TFF2 y TFF3). Las tres proteínas se caracterizan por ser resistentes a la digestión y al calor gracias a la presencia de uno o más dominios trébol (Du et al., 2013). Cada dominio está formado por 40 aminoácidos con 6 residuos de cisteína que forman 3 puentes disulfuro para dar lugar a una estructura de tres hojas. Aunque su función no se conoce del todo, está implicado en varios procesos fisiopatológicos, ya que juega un papel fundamental en la protección y reparación de las mucosas, en la proliferación y migración celular, la modulación de la respuesta inmune y en procesos inflamatorios. Existen estudios que relacionan un aumento de la expresión de TFF3

con la inflamación del tracto gastrointestinal y una amplia variedad de tumores (DeGregory et al., 2016).

3.3.3. Biomarcadores de daño hepático

Desde el punto de vista histológico el hígado humano está formado por lobulillos con forma hexagonal que constituyen la unidad estructural del hígado. Desde el punto de vista funcional, el lobulillo hepático (Figura 16) se divide en tres regiones: la más cercana a la entrada de la sangre donde existe una mayor cantidad de oxígeno (zona periportal), la zona que rodea la vena central y tiene una oxigenación más pobre (zona centrolobulillar) y la zona localizada entre ambas (zona media). La sangre llega al hígado por dos vías: la vena porta y la arteria hepática. Mientras que la primera transporta sangre con nutrientes, la segunda transporta la sangre oxigenada proveniente de los pulmones.

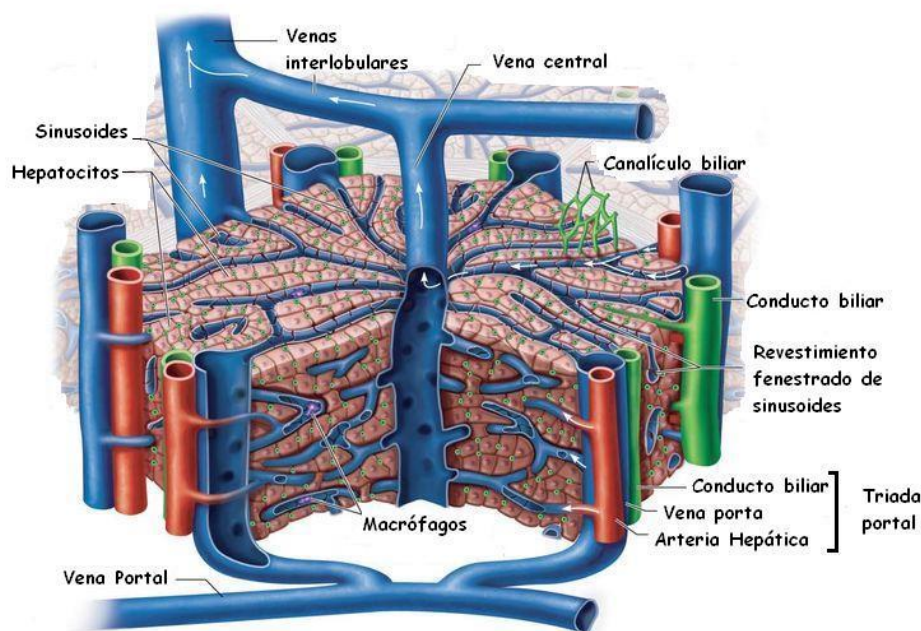


Figura 16. Figura de la organización de los lobulillos hepáticos. FUENTE: Pearson Education, 2011 (editada)

El hígado juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del organismo y es la principal vía de metabolización de xenobióticos y sus metabolitos. Sin embargo, como resultado de las reacciones de oxidación microsomal de fase I muchos de estos agentes pueden sufrir bioactivación en lugar de detoxificación. Estas reacciones pueden originar

metabolitos tóxicos, como en el caso de los oxones, e intermediarios reactivos capaces de lesionar el hígado y otros tejidos donde tiene lugar la reacción por un mecanismo de estrés oxidativo. Tales metabolitos pueden interactuar con ciertas macromoléculas intracelulares que desempeñan un papel importante y producir necrosis hepatocelular (Hernández et al., 2014).

Las pruebas funcionales hepáticas convencionales se pueden utilizar como indicadores del grado de hepatotoxicidad a nivel bioquímico y proporcionan información acerca de la integridad de los hepatocitos (transaminasas) y del sistema biliar (GGT y fosfatasa alcalina) (Gil y Hernández, 2009). Con este fin se pueden utilizar también otros biomarcadores convencionales tales como bilirrubina, albúmina o tiempo de protrombina (Limdi, 2003). Además existen otros biomarcadores no convencionales que evalúan el daño hepatocelular (como la arginasa I, ornitina transcarbamilasa –OTC– y GST- α) y la integridad del sistema biliar (5-nucleotidasa). También existen otros biomarcadores menos estudiados como el 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (4-HDP), glutamato deshidrogenasa (GLDH), fragmentos de queratina-18, sorbitol deshidrogenasa y purina nucleósido fosforilasa (Antoine et al., 2014; Bailey et al., 2012; Campion et al., 2013). Existen estudios que sugieren que la aminooxidasa, una enzima sérica sintetizada en el hígado, puede ser útil también en la evaluación de hepatotoxicidad, aunque no se ha establecido si los cambios en esta enzima son específicos de la función hepática (Hernández et al., 2006). También se ha utilizado el aumento de triglicéridos y colesterol como biomarcadores de disfunción hepática ya que se alteran tras la exposición a tóxicos tales como disolventes orgánicos (Hernández et al., 2014).

Aminotransferasas (ALT Y AST)

Las aminotransferasas o transaminasas son unos excelentes marcadores de daño hepatocelular. Se trata de un conjunto de enzimas con actividad transferasa que intervienen en la gluconeogénesis catalizando la transaminación, es decir, la transferencia de un grupo amino desde un aminoácido al ácido α -cetoglutarico. Su nomenclatura se establece a partir del aminoácido desde el que transfieren el grupo amino. El aumento de transaminasas en plasma indica afectación de la zona periportal del lobulillo hepático y suele estar asociado al consumo de alcohol, medicamentos (tales como antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, estatinas, antiepilépticos y tuberculostáticos), hepatitis por virus B y C,

enfermedades autoinmunes, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, hígado graso, enfermedad celiaca, deficiencia de α_1 -antitripsina, etc. (Limdi, 2003).

La AST es una isoenzima citosólica y mitocondrial que se encuentra en el hígado, aunque también se localiza en músculos, corazón, riñón, cerebro y páncreas. Su función consiste en transferir un grupo amino desde el ácido aspártico al ácido α -cetoglutárico para producir ácido oxalacético. Es un biomarcador indicativo de aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y de necrosis celular ya que la enzima se libera al torrente sanguíneo cuando los hepatocitos y fibras musculares estriadas resultan dañados (Ozer et al., 2008). Su especificidad no es muy elevada ya que se encuentra en cantidades significativas en otros tejidos (Yang et al., 2014).

La ALT, por su parte, es una enzima casi exclusivamente citosólica, que se encarga de transferir un grupo amino desde la alanina al ácido α -cetoglutárico para formar una molécula de ácido pirúvico. Cuando se produce una lesión hepatocelular, la ALT se filtra al espacio extracelular y pasa a la sangre, donde muestra una tasa de aclaramiento lenta, con una vida media de aproximadamente 42 h, depurándose en los sinusoides hepáticos (Ozer et al., 2008). Además de en el hígado, la ALT se encuentra también, aunque en baja concentración, en músculo esquelético y riñones. Por tanto, su elevación es más específica de daño hepático.

Enzimas de colestasis (ALP Y GGT)

El término colestasis hace referencia a todos aquellos síntomas comunes en muchas enfermedades y afecciones hepáticas en las que se reduce u obstruye el flujo de la bilis del hígado hacia el duodeno. Esto provoca que la bilirrubina, producto de desecho formado por la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos y que habitualmente se excreta junto a la bilis en las heces, pase al torrente sanguíneo y se acumule. Esta acumulación produce una alteración de las enzimas de colestasis (GGT y fosfatasa alcalina –ALP–).

La fosfatasa alcalina es una enzima de elevado peso molecular que presenta actividad hidrolasa, responsable de eliminar grupos de fosfatos de moléculas biológicas. Se encuentra fundamentalmente en el hígado, vías biliares y huesos, aunque puede estar presente en muchos otros tejidos como intestino, riñón, placenta o leucocitos. La ALP tiene una gran variedad de isoenzimas situadas en la membrana celular que intervienen en diversas

situaciones fisiológicas: precipitación del fosfato cálcico en los huesos, absorción de fosfatos por el intestino, síntesis de proteínas tisulares e hidrólisis de los ésteres fosfáticos del riñón e hígado (Sánchez Rodríguez, et al., 2002). Su elevación puede ser fisiológica (elevación benigna familiar, como consecuencia del embarazo o en adolescentes) o patológica. Esta última se debe a obstrucción del conducto biliar, cirrosis, metástasis, enfermedad ósea, ductopenia idiopática, consumo de ciertos fármacos o colangitis esclerosante primaria (Limdi, 2003).

Debido a la poca especificidad de la ALP, que puede aumentar debido a alteraciones del sistema biliar o del esqueleto, se suele recurrir a la determinación de la enzima GGT (EC 2.3.2.2) para establecer el origen de ese aumento y confirmar si es debido a una disfunción del sistema biliar (Hernández et al., 2014; Yang et al., 2014). La GGT se encuentra en las membranas celulares de los hepatocitos y células epiteliales biliares y su función se ha descrito previamente. A pesar de ser un marcador sensible de las enfermedades hepatobiliares, su utilidad está limitada por la falta de especificidad. Niveles elevados de GGT pueden observarse también en enfermedades pancreáticas, infarto de miocardio, fallo renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, alcoholismo, enfermedades hepatobiliares o consumo de ciertos medicamentos y drogas (Singh y Loscalzo, 2014).

Enzimas del ciclo de la urea (OTC y arginasa I)

Tras las reacciones de desaminación que se producen durante la degradación de aminoácidos, el exceso de amonio producido que no se reutiliza para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados se debe excretar ya que resulta tóxico, especialmente para el cerebro. El organismo lo elimina mediante el ciclo de la urea, un proceso metabólico formado por dos reacciones mitocondriales y cuatro citoplasmáticas que tienen lugar en el interior de los hepatocitos, mediante el cual los grupos aminos de los aminoácidos se transforman en un único producto final de excreción, la urea (Figura 17).

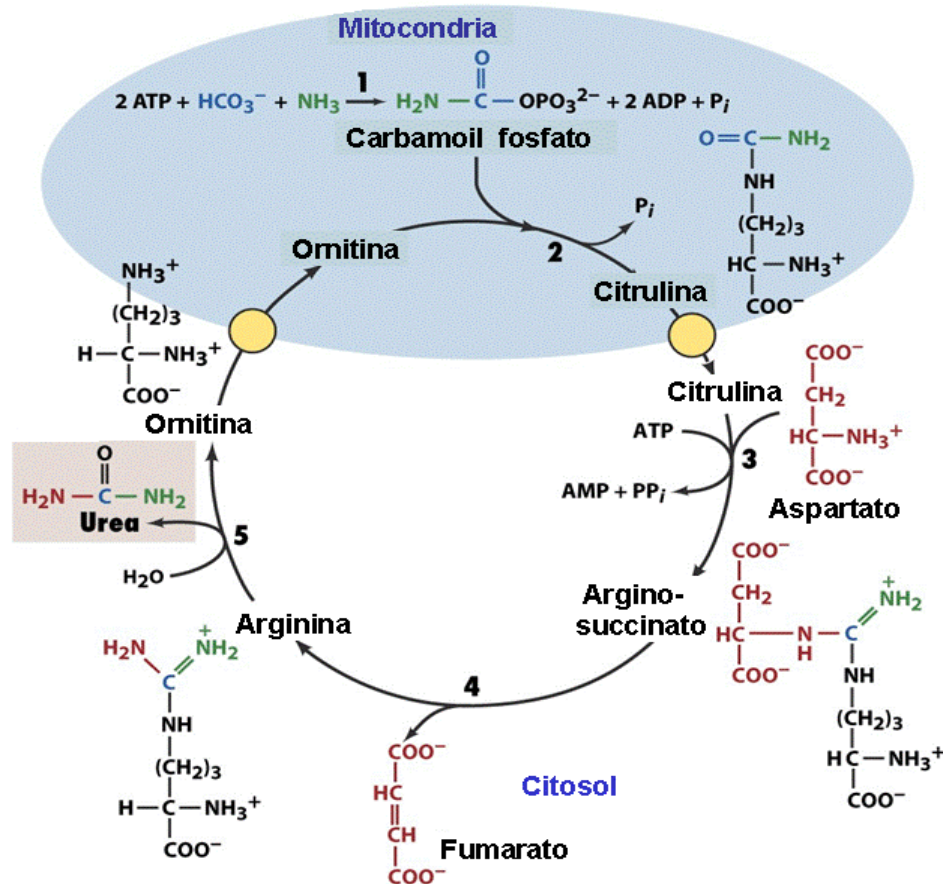


Figura 17. Ciclo de la urea. Las enzimas implicadas en cada etapa son: (1) carbamoilfosfatosintetasa I, (2) ornitinatranscarbamilasa, (3) argininosuccinatossintetasa, (4) argininosuccinatosilasa y (5) arginasa I. Fuente: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_quimica/tema20-3.htm (editada)

La ornitinatranscarbamilasa (OTC) es una enzima citosólica localizada en las mitocondrias de hepatocitos periportales y cuya elevación en suero indica daño a los mismos (Ishikawa et al., 2003). Aunque se encuentra en pequeñas cantidades en el hígado, en circunstancias normales no está presente en sangre. Sin embargo, cualquier daño en los hepatocitos periportales debido a infecciones, toxicidad o procesos degenerativos provoca un aumento considerable en el suero (Ceriotti, 1983). El nivel sérico de OTC exhibe una fuerte correlación con los niveles de AST y ALT. Mientras que ambas transaminasas derivan en gran medida del citosol de hepatocitos, la OTC se libera después de una lesión mitocondrial. Por lo tanto, las relaciones OTC/AST y OTC/ALT pueden considerarse indicadores del grado de pérdida de enzimas mitocondriales hepáticas con relación a la de las enzimas citosólicas (Matsushita et al., 2014).

La arginasa es una hidrolasa formada por dos isoformas con actividades enzimáticas similares: arginasa I y arginasa II. Forma parte del ciclo de la urea convirtiendo la arginina en

ornitina y urea, por lo que es una enzima clave de los mamíferos para eliminar el amonio producido durante el catabolismo de proteínas (Bailey et al., 2012). La arginasa I es una enzima hidrolítica de 35 kDa que se expresa mayoritariamente en el citosol de los hepatocitos y que suele formar homotrímeros. No obstante también se encuentra en otros tejidos como glóbulos rojos, glándulas mamarias o riñón. Al ser altamente específica del hígado constituye uno de los biomarcadores con mayor especificidad para determinar daño hepático en comparación con otras enzimas hepáticas (Ozer et al., 2008).

Glutation-S-transferasa alfa (GST- α)

Las glutatión-S-transferasas (GST) representan una superfamilia de ocho isoenzimas (alfa, mu, pi, theta, sigma, omega, kappa, y zeta) encargadas de la protección de las células frente a sustancias o metabolitos tóxicos. Estas enzimas transfieren moléculas de glutatión reducido a compuestos tóxicos, generalmente metabolitos primarios, lo que facilita su inactivación y eliminación a través del riñón (Dessi et al., 2012). Una de estas isoformas es la GST- α , una enzima citosólica que sirve de marcador de daño en el túbulo proximal, a diferencia de la GST- π que es indicativa de daño tubular distal. Para evaluar el daño renal, estas proteínas se determinan en orina. Concretamente, la GST- α refleja un deterioro funcional de la reabsorción tubular proximal debido a lesión glomerular o daño tubular directo (Hernández et al., 2014).

3.3.4. Biomarcadores de daño neurológico

Un gran número de productos químicos puede producir neurotoxicidad. Entre ellos destacan metales pesados (plomo), productos químicos industriales (acrilamida), disolventes orgánicos (tolueno), toxinas naturales (ácido domoico), fármacos (doxorubicina), drogas de abuso ("éxtasis") y plaguicidas (Costa et al., 2008). Los compuestos neurotóxicos pueden alterar el sistema nervioso por afectar diversas dianas (Figura 18) neuronales como membranas, señalización intracelular, transporte axonal o aporte de energía (Hernández et al., 2014). Los agentes neurotóxicos pueden afectar el soma celular de las neuronas (neuronopatía), dando lugar a necrosis o apoptosis, o bien producir degeneración del axón (axonopatía), afectar la mielina (mielopatías) o interferir en la neurotransmisión, bien por inhibir la liberación de neurotransmisores, por actuar como agonista o antagonista de

receptores específicos o por interferir con los procesos de transducción de señales (Moser et al., 2013).

Por su parte, algunos compuestos no neurotóxicos pueden afectar la barrera hematoencefálica y hacerla más permeable a compuestos iónicos de manera que ciertas moléculas presentes en el sistema nervioso alcanzan la sangre, por lo que pueden ser útiles como biomarcadores de daño cerebral.

Los plaguicidas, y en especial los insecticidas, actúan de una manera directa sobre el sistema nervioso, aunque en determinados casos originan una disrupción celular generalizada debido a la alta actividad metabólica del sistema nervioso, que provoca efectos tóxicos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Keifer y Firestone, 2008). Los plaguicidas pueden ejercer su acción sobre al menos once dianas del sistema nervioso, entre las que destacan la AChE para los insecticidas OPs y *N*-metilcarbamatos, el receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) en el caso de los neonicotinoides, el receptor/canal GABA/cloruro para los policlorociclohexanos y fipronil, y el canal de sodio dependiente de voltaje para piretroides y algunos OCs como el DDT. Otras dianas adicionales son el canal de sodio, el canal de cloruro regulado por glutamato, el receptor de octopamina y el canal de calcio (Casida y Durkin, 2013).

El daño axonal y neuronal puede determinarse midiendo los niveles en sangre de enolasa específica de neuronas (NSE), proteína básica de la mielina (MBP) o neurofilamentos hiperfosforilados (pNF). Por otro lado, las proteínas tau están asociadas a microtúbulos y se encargan de estabilizarlos y facilitar el ensamblaje de la tubulina (Korfias et al., 2009; Zetterberg et al., 2013). Si estas proteínas presentan un mayor número de fosfatos de lo habitual, se debilita su unión a los microtúbulos, lo que altera el transporte axonal mediado por microtúbulos (Matamoros y Baas, 2016).

La hidrolasa L1 de ubiquitina C-terminal es un biomarcador que indica daño al soma neuronal en casos de lesión traumática cerebral grave, isquemia o hemorragia. Por su parte, la proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2) es otro biomarcador cuya pérdida es característica de una lesión dendrítica como la que ocurre después de una lesión cerebral traumática. Sin embargo, estos biomarcadores emergentes no son específicos de neurotoxicidad y, por lo tanto, no proporcionan información predictiva sobre la afectación neurotóxica (Roberts et al., 2015).

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un biomarcador de astrogliosis, es decir, de una reacción celular que indica daño tanto neuronal como glial. Cuando acontece una lesión neuronal, se produce una reacción y proliferación de astrocitos para reparar el daño producido. Esto se traduce en un aumento en la expresión de la GFAP, un filamento intermedio que da apoyo y fuerza a células astrogliales. Esta GFAP se libera parcialmente a la sangre, donde puede determinarse (O'Callaghan y Sriram, 2005). El daño astrogial también puede determinarse mediante la proteína S100B, como se verá más adelante (Menascu et al., 2010).

Por último, las células periféricas, incluyendo plaquetas, eritrocitos, linfocitos, y fibroblastos, han sido usadas para evaluar la exposición a agentes neurotóxicos tales como disolventes orgánicos y plaguicidas (Hernández et al., 2014). Esto es el caso de la AChE eritrocitaria que se inhibe tras la exposición a insecticidas OPs y N-metilcarbamatos.

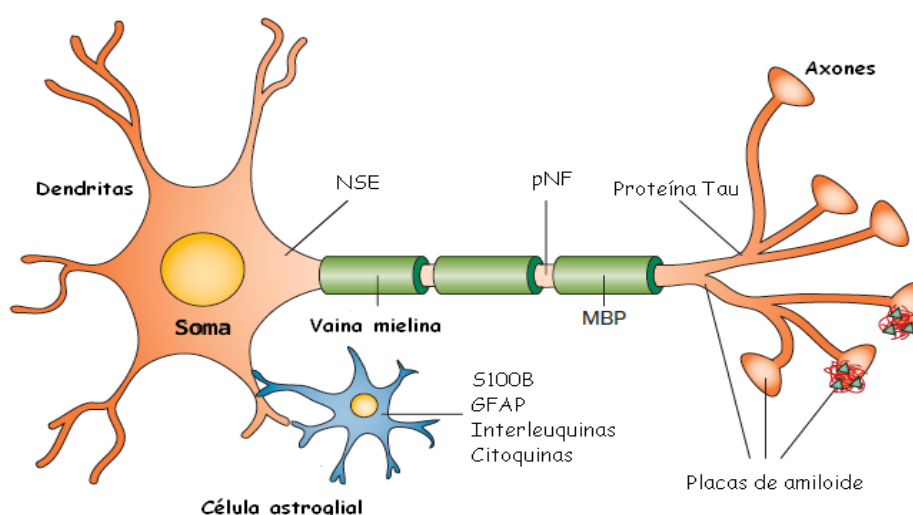


Figura 18. Localización celular de los principales biomarcadores de neurotoxicidad (Zetterberg et al., 2013)

Proteína S100B

La superfamilia multigénica de proteínas S100 está formada por al menos 25 proteínas de unión a calcio de un tamaño aproximado de 20 kDa. La mayor parte de ellas se encuentran formando dímeros y se expresan principalmente en las células gliales del sistema nervioso central y en las células de Schwann del sistema nervioso periférico, aunque también se encuentra en melanocitos, adipocitos y condrocitos (Takahashi et al., 1984). En concreto, la

proteína S100B hace referencia a dímeros que poseen al menos un monómero del tipo S100 β , bien por formar homodímeros (S100 $\beta\beta$) o heterodímeros junto con el monómero S100 α (S100 $\alpha\beta$) (Menascu et al., 2010).

La S100B es una proteína altamente conservada que está implicada en la homeostasis del calcio (regula los niveles de calcio intracelular), en la transducción de señales y en la regulación de la morfología celular por interactuar con elementos del citoesqueleto (Zetterberg et al., 2013; Žurek y Fedora, 2012). Sus efectos dependen de la concentración de proteína secretada. Así, a bajas concentraciones estimula el crecimiento neuronal y mejora la supervivencia neuronal durante el desarrollo, mientras que a altas concentraciones aumenta la expresión de la interleuquina pro-inflamatoria IL-6 y promueve la muerte celular apoptótica (Astrand et al., 2013).

La determinación de la proteína S100B se lleva a cabo en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (su vida media biológica es de 1 hora). Ha demostrado ser clínicamente útil para la valoración de pacientes con daño cerebral debido a un traumatismo craneoencefálico, enfermedades degenerativas, isquemias, paro cardíaco, accidente cerebrovascular y también en el pronóstico y seguimiento del tratamiento de los pacientes con melanoma maligno (Astrand et al., 2013; Korfiás et al., 2009; Menascu et al., 2010).

Neurofilamento pNF-H

Los neurofilamentos son proteínas estructurales de 10 nm de diámetro que forman parte del citoesqueleto de las neuronas, especialmente de los axones. Son elementos esenciales para la estructura axonal y para el establecimiento de los diámetros correctos de los axones mielinizados motores y sensoriales. Según su peso molecular se distinguen 3 tipos de neurofilamentos: neurofilamento de bajo peso molecular (NF-L), de peso molecular medio (NF-M) y de alto peso molecular (NF-H). El NF-H es una proteína de 200 KDa que presenta una secuencia inusual de repeticiones de lisina-serina-prolina (KSP) que son los principales sitios de fosforilación axonal (Lees et al., 1988). El número de estas repeticiones varía de unas especies a otras y entre alelos, de manera que el alelo humano más común tiene 44 versiones de estas repeticiones. La forma axonal de NF-H (pNF-H) se fosforila sobre la mayoría, si no todos, los residuos de serina en las secuencias de KSP, por lo que difiere de las formas pericárdica y dendrítica, que normalmente no están fosforiladas en esos sitios (Shaw, 2015).

La fosforilación de neurofilamentos varía en función del tipo de célula, su localización y el estado de desarrollo. Los cambios en los patrones de fosforilación de los neurofilamentos se han asociado con diversas enfermedades degenerativas. En concreto, la fosforilación del NF-H juega un importante papel en la formación de puentes de entrecruzamiento entre neurofilamentos, en su interacción con los microtúbulos y en el transporte axonal. Además, los grupos fosfato del NF-H pueden dar lugar a repulsión electrostática que, a su vez, podría aumentar el diámetro axonal. La forma fosforilada del NF-H (pNF-H) es muy resistente a la proteólisis, por eso, cuando se liberan al torrente sanguíneo por cualquier tipo de afectación axonal, permanecen mucho tiempo sin apenas degradarse. Su detección en sangre implica de manera inequívoca degeneración axonal (Llorens, 2013).

3.3.5. Biomarcadores de daño inmunológico: citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento

La función esencial del sistema inmunológico es proteger al organismo de agentes infecciosos y organismos potencialmente nocivos presentes en el ambiente. Para ser eficaz, debe reconocer y destruir un antígeno concreto de patógenos mediante una serie de mecanismos fisiológicos de defensa y distinguirlos de las células y tejidos del propio organismo. Los antígenos son moléculas que se encuentran en la superficie de células, virus, hongos o bacterias, así como otras sustancias, tales como toxinas o drogas (Chaplin, 2010).

El sistema inmunitario suministra el microambiente adecuado para la maduración de linfocitos a la vez que se encarga de capturar a los antígenos, generando un entorno adecuado para que el linfocito actúe sobre él. Para ello consta de una serie de líneas de defensa encaminadas a evitar diferentes daños y que integran la respuesta inmune. Dentro de él se puede hablar de inmunidad innata e inmunidad específica. La primera se encarga de controlar la mayor parte de los agentes patógenos, mientras que la segunda suministra una respuesta específica (respuesta inflamatoria) a un daño fisiológico o infeccioso. Sin embargo, antes de ponerse en marcha la respuesta inmune innata, actúan una serie de barreras naturales físicas, químicas o biológicas tales como la piel, las mucosas, flora microbiana, etc. (Bonilla y Oettgen, 2010).

La inmunidad innata, natural o inespecífica, representa la primera línea de defensa del organismo para hacer frente a antígenos, una vez han atravesado las barreras naturales. En

ella, los granulocitos y macrófagos reconocen ciertas moléculas que se encuentran en la superficie de bacterias y actúan de una manera inespecífica sobre el agente invasor. Entre los mecanismos de respuesta de la inmunidad innata se encuentran principalmente la endocitosis (captación de macromoléculas solubles mediante invaginaciones de membrana), fagocitosis (incorporación del microorganismo por una célula) o la inflamación aguda (reacción del organismo, o de los tejidos de un órgano, que provoca dolor, enrojecimiento, hinchazón y calor y que puede estar provocada por agentes patógenos, sustancias irritantes o lesiones mecánicas). El proceso inflamatorio pone en marcha ciertos elementos que interfieren con el antígeno y que generan señales encaminadas a atraer nuevas células al foco que ayuden a la eliminación de ese antígeno (Bonilla y Oettgen, 2010).

Por su parte, la inmunidad adquirida, adaptativa o específica, se trata de una barrera defensiva adicional formada por una serie de moléculas (anticuerpos) que se caracterizan por unirse por un lado a fagocitos y por otro al microorganismo, independientemente de su naturaleza. A diferencia de lo que ocurre en la inmunidad innata, la especialización de las células que actúan en la inmunidad específica (principalmente linfocitos) tiene lugar después de la etapa de activación desencadenada por el agente patógeno. En ella, los linfocitos “vírgenes” se diferencian hacia distintos “linajes” según sea la señal inducida por el patógeno sobre las células efectoras de la inmunidad innata (Bonilla y Oettgen, 2010; (Naves y Bono, 2002).

Los compuestos inmunotóxicos son capaces de alterar una o más funciones del sistema inmune, provocando un efecto adverso para el huésped que puede ser de dos tipos: inmunosupresión (en cuyo caso favorece la aparición de infecciones y al desarrollo de cáncer) o inmunoestimulación (que puede dar lugar a la aparición de enfermedades autoinmunes) (Corsini et al., 2013).

Para que el sistema inmunitario sea efectivo precisa de una serie de células que viajan de unos órganos a otros a través del torrente sanguíneo y linfático para interactuar con los antígenos y desencadenar la respuesta inmune. Las principales células inmunocompetentes son (Iañez Pareja, 2000):

- a. **Linfocitos:** son las responsables de la respuesta inmune específica. Sufren un complejo proceso de maduración. Pueden ser de dos tipos:

- *Linfocitos B*: en el caso de los seres humanos se diferencian en la médula ósea. Producen inmunoglobulinas que pueden quedar unidas a la membrana, donde actúan como receptores específicos de antígenos o, por el contrario, pueden ser secretadas con objeto de identificar y neutralizar antígenos.
- *Linfocitos T*: en seres humanos maduran en el timo, piel y mucosa intestinal. Poseen un receptor de membrana asociado a moléculas no polimórficas de señalización celular denominadas *cluster* de diferenciación CD3 con el que forma un complejo denominado receptor de células T (TCR). Este complejo reconoce antígenos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) desencadenando una cascada de reacciones intracelulares que ponen en marcha un proceso de activación, proliferación y diferenciación celular. Los linfocitos T forman una población celular muy heterogénea formada por varios tipos celulares con funciones diferenciadas. Entre ellas destacan los linfocitos T colaboradores (Th), que producen citoquinas, los linfocitos T citotóxicos (Tc), que poseen citotoxicidad (es decir, la capacidad de destruir células infectadas, tumorales o dañadas) y los linfocitos T reguladores (Tr), que regulan la activación de otros linfocitos, ordenando así la respuesta inmune.

Dentro del grupo de los linfocitos Th, se distinguen dos tipos según el tipo de citoquinas que producen en respuesta a la estimulación antigénica: los Th1 y los Th2. Los linfocitos Th1 producen interferón (IFN)- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF)- β , los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular (mediada por células). Por el contrario, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, favorecen la inmunidad humoral, inducen la producción de anticuerpos e inhiben algunas de las funciones de los macrófagos. El que la respuesta inmunológica se decante a favor de uno u otro tipo de linfocitos Th se debe a la influencia de ciertas citoquinas. Así, la IL-12 y el TNF- α , producidos por los macrófagos presentadores de antígenos, son fuertes promotores de las respuestas Th1 (Romagnani, 1995).

- b. Células NK (*natural killer*):** se trata de leucocitos activados que reconocen y destruyen principalmente las células cancerígenas o aquellas que no son viables. Además, poseen una acción reguladora gracias a su capacidad de producir citoquinas que desencadenan la respuesta inespecífica. Las células NK se activan por interferones y otras citoquinas como la IL-2, producida por los linfocitos T activados. Sin embargo, y a diferencia de los

linfocitos, las células NK no poseen especificidad ni memoria, por lo que forman parte de la respuesta inmune innata.

- c. **Células NKT (*Natural Killer T cells*):** son un tipo especial de linfocitos que presentan marcadores específicos de células NK y de células T. Desempeñan funciones parecidas a los linfocitos Tc y Th.
- d. **Neutrófilos:** se trata de leucocitos circulantes de gran tamaño producidos en la médula ósea encargados de fagocitar y destruir antígenos. Se encuentran en continua renovación debido a que su vida media es menor a 48 horas. Al inicio de la respuesta inmunológica migran a los tejidos y también pueden intervenir en la citotoxicidad celular. Son los primeros fagocitos que acuden a la zona dañada atraídos por factores quimiotácticos.
- e. **Monocitos y macrófagos:** se trata de un grupo de células con características y funciones similares y cuya vida media (meses o años) es mayor que la de los neutrófilos. Según el tejido en el que se localicen reciben un nombre u otro. Así, si se encuentran circulando por la sangre se denomina monocitos, pero cuando emigran a los tejidos sufren una serie de transformaciones y se denominan de manera genérica macrófagos. Su principal función es fagocitar los antígenos como bacterias o sustancias de desecho de tejidos, actuar como células presentadoras de antígenos y producir citoquinas proinflamatorias.
- f. **Basófilos y mastocitos:** al igual que en el caso anterior, los basófilos se encuentran en el torrente sanguíneo, mientras que los mastocitos son basófilos que han migrado a los tejidos. Ambos participan en la respuesta antiparasitaria, alérgica y antiinflamatoria, ya que poseen receptores para las inmunoglobulinas. Contienen histamina, enzimas proteolíticas, leucotrienos y varias citoquinas. No tiene función fagocítica.
- g. **Eosinófilos:** se encuentran presentes en la sangre pero pueden migrar a los tejidos gracias a la atracción que ejercen los factores quimiotácticos sobre ellos. Su vida media en la sangre es de 3-4 días antes de migrar a los tejidos, donde permanecen durante varios días. Presentan una función fagocítica muy reducida y participan también en la respuesta antiparasitaria, reacciones alérgicas, inflamatorias e incluso homeostáticas. Sus gránulos citoplásmicos contienen diversas enzimas (histaminasas y arilsulfatasas) que contribuyen a neutralizar los efectos de la histamina secretada por mastocitos y de los leucotrienos producidos por basófilos, respectivamente.
- h. **Células dendríticas:** son células presentadoras de antígenos que se encuentran en todos los tejidos. En el torrente sanguíneo circulan como precursores inmaduros hasta que

migran a los tejidos, donde maduran y se diferencian. Poseen la capacidad de transportar los antígenos desde los tejidos hasta los ganglios linfáticos.

Dentro de los elementos que forman parte del sistema inmune destacan las citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, conocidos de una forma genérica como citoquinas (aunque aquí se denominarán como parámetros o biomarcadores inmunológicos para diferenciarlas de las citoquinas inmunocompetentes implicadas en la respuesta inmune). Se trata de un grupo de proteínas solubles de bajo peso molecular (generalmente entre 15-30 kDa) que se producen transitoriamente, después de la activación celular, y actúan como mensajeros en el sistema inmune. Regulan la intensidad y duración de la respuesta inmunológica, modulando los procesos de activación, proliferación y diferenciación de diferentes tipos de células (Filella et al., 2003). Se caracterizan por tener una vida media muy corta y actuar a muy bajas concentraciones. Se liberan en respuesta a un estímulo y actúan uniéndose con alta afinidad a receptores de membrana de las células diana (aunque también se han descrito ciertos receptores en el torrente sanguíneo que contribuyen a la regulación). Esto desencadena una cascada de señalización intracelular que altera la expresión génica y provoca una respuesta biológica. En cualquier caso, su acción individual puede ser de un tipo en unas determinadas circunstancias y totalmente la contraria en otras (Foster, 2001).

Las diferentes citoquinas son producidas por células que no se organizan en glándulas especiales sino que actúan de forma sistémica sobre fenómenos biológicos tales como inflamación, cicatrización de heridas, organogénesis y oncogénesis. Juegan un papel fundamental en la reparación del daño tisular inducido por sustancias químicas, en el desarrollo y progresión de cáncer, en el control de la replicación celular y la apoptosis y en la modulación de las reacciones inmunes (Foster, 2001). Las citoquinas poseen dos importantes características funcionales: el pleiotropismo y la redundancia. La primera hace referencia a la posibilidad de que una misma molécula pueda actuar de una manera diferente en función de si actúa en una u otra célula. Por su parte, la redundancia significa que varias citoquinas pueden tener la misma función en una misma célula. A su vez, la acción de las citoquinas puede ser sinérgica o antagónica. El sinergismo se da cuando el efecto de una de ellas se ve potenciado por otras. Por el contrario, el antagonismo se trata de la inhibición parcial o total de una determinada citoquina por la acción de otras.

Las citoquinas son, por tanto, un grupo de proteínas solubles de naturaleza diversa,

expresadas y secretadas por numerosas células, que regulan la respuesta inmunológica bajo condiciones normales y patológicas, como enfermedades inflamatorias y reacciones alérgicas (Sahlander et al., 2010). Estas proteínas interactúan con sus receptores específicos en las células diana, provocando diversas respuestas fisiológicas, como inflamación, crecimiento celular o hematopoyesis. La desregulación de la producción de estas proteínas constituye un claro indicador de ciertas patologías tales como cáncer, diabetes, infección o enfermedades autoinmunes. Es por esto que, desde un punto de vista toxicológico, se consideran marcadores sensibles de alteraciones funcionales inducidas por agentes químicos. El grupo incluye interleuquinas, interferones y factores estimulantes de colonias. Las citoquinas con actividad antiinflamatoria, entre las que se encuentran la IL-4, IL-13 e IL-10, inhiben la respuesta inflamatoria y la proliferación celular y suprimen la secreción de otras citoquinas. Los interferones tipo I (α y β), también se pueden considerar citoquinas supresoras debido a su capacidad antiproliferativa y a su efecto regulador de la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre las principales citoquinas proinflamatorias destacan la IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y el IFN- γ , producidas por linfocitos activados (Th1 o citotóxicos) en las respuestas inmunes específicas, por células NK activadas, por los monocitos y macrófagos activados durante las respuestas inmunológicas innatas y por otras células no pertenecientes al sistema inmune (Murphy et al., 2007) como fibroblastos y células endoteliales..

Citoquinas inmunorreguladoras: interleuquinas, interferones y factores de necrosis tumoral

Las citoquinas juegan un papel primordial en la respuesta inmune, ya sea innata o específica, así como en la reacción inflamatoria. No obstante, estas moléculas deben verse como un conjunto de proteínas en la que, el efecto de una está regulado por otras que, a su vez, pueden incrementar o inhibir la expresión de sus receptores. En la Tabla 5 se resumen las principales citoquinas inmunorreguladoras, su actividad, células productoras y sus funciones más relevantes.

En primer lugar, las citoquinas son capaces de estimular una respuesta inmune específica mediante mecanismos de acción directa frente al agente invasor (activando las células NK productoras de citoquinas tales como IL-1, IL-6, IL-12 o IL-16 y que son capaces de destruir células infectadas) o produciendo sustancias inmunorreguladoras (tales como IFN- α e IFN- γ que inhiben la replicación viral). A su vez, el IFN- α e IFN- γ tiene la capacidad de potenciar la

actividad destructora de las células NK. Por su parte, las citoquinas también son capaces de intervenir en los mecanismos de señalización que provoca la activación de linfocitos y macrófagos como parte de la respuesta inmune específica.

La respuesta mediada por células implica la activación inicial de macrófagos, linfocitos Th y linfocitos Tc que responden a la estimulación antigénica produciendo citoquinas capaces de estimular o inhibir células efectoras de la respuesta inmune. En una fase posterior, algunas citoquinas como IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 y TNF- α juegan un papel vital en la diferenciación de linfocitos T, los cuales, una vez maduros, producen otras citoquinas en función de la señal que reciban del medio. En este sentido, las células Th1 y Th2 tienen un papel fundamental gracias a su capacidad de regulación cruzada (Figura 19). Ambas derivan de una población Th0 capaces de secretar ambos patrones de citoquinas. Las células Th1 son capaces de producir IL-2, IFN- γ y TNF- α , activan macrófagos y originan reacciones de hipersensibilidad retardada. A su vez las Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Filella et al., 2003), que promueven la activación de las células B, suprimiendo la inmunidad celular. Existe una regulación cruzada entre células Th1 y Th2, de manera que el IFN- γ secretado por las Th1 inhibe la producción de citoquinas secretadas por las Th2. A su vez, la IL-10 secretada por las células Th2 inhibe la secreción de IL-2 e IFN- γ . Además, las citoquinas secretadas por Th2 pueden inhibir la producción de otras citoquinas, la producción de NO por los macrófagos y la secreción por parte de los mismos de IL-1, IL-6 e IL-8 (Iáñez Pareja, 1999).

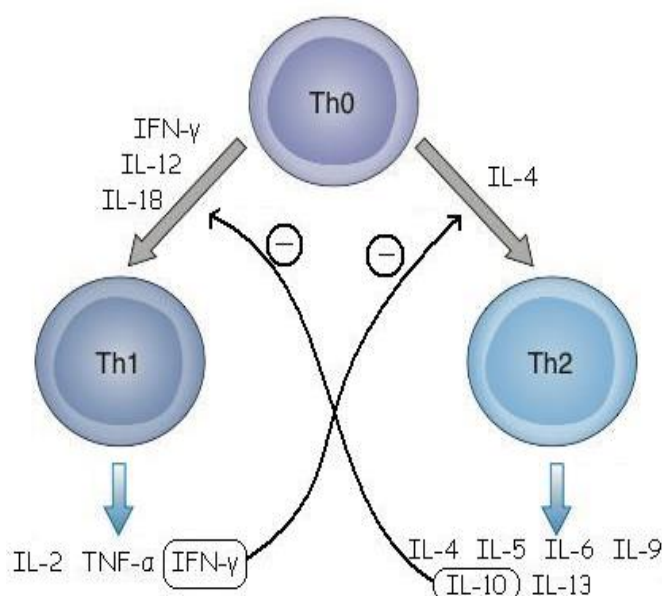


Figura 19. Regulación cruzada de citoquinas producidas por células Th1 y Th2

Por último, las citoquinas desempeñan una función clave en el proceso inflamatorio. Este consiste en una respuesta fisiológica normal al daño, ya sea mecánico o infeccioso, resultado del balance entre citoquinas proinflamatorias (entre las que también se encuentran quimioquinas) y antiinflamatorias (Filella et al., 2003). La ruptura de dicho equilibrio provoca una serie de alteraciones. Cualquier agresión exógena o endógena es interpretada por el sistema inmune como una señal de alerta que activa los receptores de membrana de los macrófagos y mastocitos liberando una serie de mediadores de la inflamación, entre los que se encuentran las citoquinas proinflamatorias que desencadenan una serie de reacciones para neutralizar la agresión. Ciertas citoquinas, como la IL-1 y el TNF- α tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación, que también es promovido por IFN- γ a través de un aumento de TNF- α . Otras citoquinas producidas por otras células o atraídas al lugar de la inflamación también pueden amplificar la respuesta inflamatoria. Las citoquinas producidas en el sitio de la inflamación participan directamente en el reclutamiento de leucocitos para que acudan al mismo, proceso mediado a su vez por quimioquinas (Naves y Bono, 2002). Una vez controlada la agresión, los macrófagos y leucocitos liberan citoquinas antiinflamatorias que inhiben el crecimiento celular y suprimen la secreción de otras citoquinas con objeto de restablecer el equilibrio homeostático.

Entre las señales que desencadenan la respuesta inflamatoria destacan agentes biológicos como virus, bacterias o parásitos, radiaciones, agentes tóxicos, enfermedades inmunitarias, traumatismos, estrés, *etc.* (Naves y Bono, 2002). Por otro lado, IL-1, TNF- α e IL-8 aumentan la permeabilidad vascular y permiten la extravasación de proteínas plasmáticas. La IL-6 induce la producción de proteínas de fase aguda en los hepatocitos y, junto con IL-1 y TNF- α , la respuesta febril.

Tabla 5. Principales citoquinas inmunorreguladoras, células productoras y funciones más relevantes

CITOQUINA	ACTIVIDAD	CÉLULAS PRODUCTORAS	PRINCIPALES FUNCIONES
Interleuquina 1 beta (IL-1 β)	Proinflamatoria	Macrófagos	Es un mediador importante de la respuesta inflamatoria. Está implicado en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis celular
Antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1ra)	Antiinflamatoria	Monocitos, macrófagos, neutrófilos y células hepáticas	Inhibe la acción de la IL-1
Interleuquina 2 (IL-2)	Proinflamatoria	Linfocitos T	Induce la proliferación de células T, B y células NK. Se ha observado una cierta elevación en determinadas enfermedades
Interleuquina 4 (IL-4)	Antiinflamatoria y proinflamatoria	Linfocitos Th2, mastocitos, basófilos y células del estroma de la médula ósea	Favorece la proliferación y diferenciación de linfocitos B y T. Inhibe citoquinas y mediadores proinflamatorios
Interleuquina 5 (IL-5)	Antiinflamatoria y proinflamatoria	Linfocitos Th2, mastocitos y eosinófilos	Interviene en la proliferación, diferenciación y mantenimiento de la actividad de eosinófilos y la activación de la hematopoyesis
Interleuquina 6 (IL-6)	Antiinflamatoria y proinflamatoria	Monocitos, macrófagos, fibroblastos, linfocitos T y B, células del estroma de la médula ósea	Induce la síntesis hepática de proteínas de fase aguda. Promueve la proliferación de linfocitos B hacia células plasmáticas
Interleuquina 7 (IL-7)	Pro-inflamatoria	Células del estroma de la médula ósea, timo y bazo. Fibroblastos	Promueve la proliferación y maduración de progenitores de linfocitos B y T
Interleuquina 9 (IL-9)	Proinflamatoria	Linfocitos T, enfermedad de Hodking	Proliferación de linfocitos T, mastocitos y precursores eritroides. Se considera el regulador de la hematopoyesis
Interleuquina 10 (IL-10)	Antiinflamatoria y proinflamatoria	Linfocitos T, monocitos, macrófagos, linfocitos B	Inhibe la expresión de un gran número de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Es el corregulador del crecimiento de los mastocitos
Interleuquina 12 heterodimérica (IL-12p70)	Proinflamatoria	Células dendríticas, macrófagos	Citoquina heterodímera formada por la unión covalente de subunidades de 40 y 30 KDa. Interviene en la estimulación de la producción del IFN-γ por linfocitos T y células NK
Interleuquina 13 (IL-13)	Antiinflamatoria y proinflamatoria	Linfocitos T	Promueve la diferenciación de linfocitos B
Interleuquina 15 (IL-15)	Proinflamatoria	Células epiteliales y monocitos	Proliferación de linfocitos T. También puede promover la proliferación y diferenciación de linfocitos B
Interleuquina 17 (IL-17)	Proinflamatoria	Linfocitos T o sus precursores.	Induce la proliferación de IL-6, IL-8, G-CSF y PEG2
Interferón gamma (IFN-γ)	Proinflamatoria	Linfocitos T y células NK	Activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, macrófagos y células NK. Resistencia a virus
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)	Proinflamatoria	Monocitos y macrófagos activados	Media en las respuestas inmunes e inflamatorias. Regula la proliferación y diferenciación. Es citotóxico para células tumorales

Mediadores de la hematopoyesis: factores de crecimiento

Algunas citoquinas también son capaces de regular de manera directa o indirecta la producción de células sanguíneas y su maduración (hematopoyesis). La hematopoyesis es un proceso dinámico regulado por células sanguíneas (linfocitos, monocitos, macrófagos,...) y por células que responden a la acción de las citoquinas, gracias a la presencia de receptores en su superficie (Iañez Pareja, 2000). Este es el caso de los factores de crecimiento y algunas citoquinas tipo interleuquinas o factor de necrosis tumoral.

Los factores de crecimiento (Tabla 6) pueden tener efectos estimulantes o supresores, acción que pueden ejercer de manera directa o indirecta. Entre las acciones directas destaca la acción sobre las células madre y progenitoras de hematopoyesis. Las primeras son células multipotenciales con capacidad de autorregenerarse. Dentro de ellas, las más inmaduras tienen mayor capacidad de autorregenerarse y una mayor capacidad de proliferación que las células más maduras; sin embargo, estas últimas tienen mayor capacidad para diferenciarse. Por su parte, las células progenitoras se caracterizan por su capacidad de formar colonias. Entre los factores de crecimiento que estimulan la hematopoyesis por acción directa sobre células madre o progenitoras se encuentran los factores estimuladores de colonias (CSF, por sus siglas en inglés), que son responsables del desarrollo, mantenimiento y activación de las células efectoras de la respuesta inmune. Otras citoquinas y quimioquinas también son capaces de estimular la hematopoyesis, como por ejemplo IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, proteína inflamatoria de macrófagos MIP-1 α o MIP-1 β . Por el contrario, otras son inhibidoras de la hematopoyesis como es el caso del TNF- α o IFN- γ (Naves y Bono, 2002).

Por su parte, los factores de crecimiento (GF, por sus siglas en inglés), o factores tróficos, son un conjunto de moléculas, en su mayoría proteínas, que se encargan de estimular la proliferación celular actuando sobre la regulación del ciclo celular e iniciando la mitosis. Otras de sus funciones son mantener la supervivencia celular, estimular la migración y diferenciación celular e incluso la apoptosis. Además, junto con neurotransmisores y ciertas hormonas, desempeñan un papel fundamental en la comunicación entre células (Iañez Pareja, 2000).

Tabla 6. Principales factores de crecimiento, fuentes de producción y funciones más relevantes

FACTOR DE CRECIMIENTO	PRINCIPALES FUENTES	PRINCIPALES FUNCIONES
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Células del mesénquima y del estroma	Induce la proliferación de células endoteliales, contribuye a la aparición del edema y favorece su reparación
Factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF)	Tejido conectivo	Desarrollo del sistema nervioso y linfático, cicatrización de heridas y crecimiento tumoral
Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB)	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, monocitos, matriz ósea, etc.	Dímero formado por dos cadenas peptídicas tipo B que interviene en el desarrollo embriogénico, proliferación celular, migración celular y angiogénesis. También interviene en la división celular de los fibroblastos
Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)	Linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y monocitos	Induce la proliferación de progenitores hematopoyéticos. Diferenciación y activación de granulocitos y monocitos. Proliferación de endoteliales, eritrocitos, megacariocitos y linfocitos T
Factor estimulante de colonias de granulocito (G-CSF)	Fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y estroma de médula ósea	Desarrollo y diferenciación de granulocitos

Mediadores de la quimiotaxis: quimioquinas

La quimiotaxis es la reacción que exhiben algunas células ante la presencia de ciertas moléculas o agentes químicos y que consiste en inducir la migración de otras células. Las quimioquinas (Tabla 7) son proteínas inmunológicas de bajo peso molecular (8-14 kDa) que regulan el tráfico linfocitario con complejos movimientos celulares durante el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos, por lo que juegan un papel fundamental en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos, fundamentalmente de tipo inmunológico e inflamatorio (Resino-García, 2009). Son producidas por una amplia variedad de células en respuesta a estímulos y a la liberación de una serie de mediadores como IL-1, TNF- α o IFN- γ (Filella et al., 2003). Se encargan de reclutar y activar células inmunocompetentes e inflamatorias en los sitios donde se ha producido un daño tisular (Foster, 2001). Ejercen sus funciones a través de la interacción y activación de receptores acoplados a la familia de proteínas G heterodiméricas. Las quimioquinas se

caracterizan por no ser específicas y ser promiscuas en el uso de receptores, aunque existen algunas muy específicas.

Las quimioquinas se dividen en cuatro familias según sea el número y espaciamiento de las cisteínas localizadas en el extremo amino terminal.

- **Familia α o CXC:** posee dos cisteínas en el extremo amino terminal separadas por un solo aminoácido.
- **Familia β o CC:** posee dos cisteínas adyacentes al extremo amino terminal.
- **Familia γ o C:** posee una sola cisteína en el extremo amino terminal.
- **Familia δ o CX₃C:** posee dos cisteínas en el extremo amino terminal separadas por tres aminoácidos.

Por otro lado, las quimioquinas también pueden clasificarse en dos tipos:

- **Constitutivas u homeostáticas:** responsables del tráfico linfocitario basal y del mantenimiento de la función y estructura de los órganos linfoides.
- **Inducibles o inflamatorias:** que se expresan en respuesta a un estímulo o estrés fisiológico.

En cualquiera de los casos una sobreexpresión a estímulos puede desencadenar una actividad celular descontrolada y provocar un daño tisular o, si el estímulo se prolonga en el tiempo, una enfermedad (esclerosis múltiple, arterioesclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, etc.) (Naves y Bono, 2002).

Tabla 7. Principales quimioquinas, fuentes de producción y funciones más relevantes

QUIMIOQUINA	PRINCIPALES FUENTES	PRINCIPALES FUNCIONES
Interleuquina 8 (IL-8 / CXCL8)	Monocitos, linfocitos, granulocitos, fibroblastos, endoteliales epiteliales, queratinocitos y hepatocitos	Quimiotaxis y activación de neutrófilos
Proteína 10 inducida por IFN-γ (IP-10 / CXCL10)	Monocitos, células endoteliales y fibroblastos	Quimiotaxis de monocitos y los linfocitos inducida por IFN- γ
Proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 / CCL2)	Monocitos, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales, músculo liso y queratinocitos	Quimiotaxis de monocitos y activación de monocitos y basófilos
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1α / CCL3)	Células endoteliales	Quimiotaxis de células NK, monocitos y otras células inmunitarias
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP-1β / CCL4)	Hepatocitos	Quimioatrayente de células NK, monocitos y otras células inmunitarias
Quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES / CCL5)	Plaquetas y linfocitos T activados	Quimiotaxis de eosinófilos, monocitos y linfocitos
Citoquina quimiotáctica de eosinófilos (Eotaxina / CCL11)	Células epiteliales	Quimiotaxis de eosinófilos

De todo lo anterior se desprende que existe un gran número de células que, dependiendo del tipo de agresión que sufran, son capaces de activar y liberar un tipo u otro de quimioquinas. Los estímulos que inducen la producción tanto positiva como negativa de quimioquinas se expresan de forma resumida en la Tabla 8.

Tabla 8. Principales estímulos que inducen la producción de quimioquinas

ESTÍMULOS QUE PROVOCAN LA ACCION	PRINCIPALES QUIMIOQUINAS AFECTADAS	TIPO DE REGULACION
Citoquinas pro-inflamatorias	Quimioquinas de tipo CC y CXC	Inducen la producción de quimioquinas
IFN-γ	RANTES y Eotaxina	
IL-4 e IL-13	Eotaxina	
IL-10	La mayoría de quimioquinas	Disminuyen la producción de quimioquinas
Glucocorticoides	MIP-1 α , RANTES, Eotaxina, MCP-1	

Capítulo 3

ANTECEDENTES

1. BIOMARCADORES PARA EVALUAR LA EXPOSICION A PLAGUICIDAS

1.1. Dialquilfosfatos (DAPs)

La búsqueda de antecedentes sobre DAPs relacionados con los objetivos del presente estudio se llevó a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: ("*dialkyl phosphates*" OR "*alkyl phosphates*" OR DAPs) AND (*pesticide* OR *pesticides*) AND ("*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*"). La búsqueda se restringió a especie (humanos) y fecha de publicación (desde el año 2006 hasta la actualidad). Con estos criterios de selección se obtuvieron un total de 17 artículos, de los cuales se seleccionaron 11 (Tabla 9), descartando aquellos de poco interés o no relacionados con la exposición ocupacional a plaguicidas.

En los últimos años son muchos los grupos de investigación que han estudiado la asociación entre exposición a plaguicidas y la concentración de DAPs. Un claro ejemplo se puede encontrar en el Centro de Ciencia e Investigación Toxicológica de la Escuela de Medicina de Creta. Sus trabajos pretenden establecer una relación entre los niveles de DAPs en muestras de pelo con el grado de exposición a plaguicidas (Kokkinaki et al., 2014; Michalakis et al., 2014; Tsatsakis et al., 2010). Estas investigaciones han encontrado diferencias significativas para cada uno de los DAPs, así como para la sumatoria de los mismos entre una población de trabajadores agrícolas, generalmente aplicadores, con exposición ocupacional a plaguicidas OPs y una población control compuesta por residentes del mismo área rural donde se da la agricultura intensiva y, por tanto, con exposición ambiental a tales compuestos.

En un estudio reciente llevado a cabo en muestras de pelo de una población rural de Sri Lanka, en colaboración con el grupo de Creta, donde se utilizan plaguicidas con fines agrícolas y no agrícolas, se observó que los niveles medios de dietilfosfatos totales (Σ DEs, es decir, la suma de las contribuciones individuales de los niveles de DEP, DETP y DEDTP) era superior en individuos que reconocían estar expuestos a plaguicidas, en concreto agricultores y aplicadores de plaguicidas con respecto a los no agricultores (Knipe et al., 2016). En este estudio, los DEs se detectaron en más del 80% de los individuos, mientras que solo un 42% de ellos tenían niveles detectables de DMP, único metabolito dimetilfosfato (DM) estudiado. Estas diferencias fueron atribuidas al tipo de OPs utilizados en agricultura, preferentemente derivados dietilo.

No obstante, la mayoría de los estudios sobre DAPs se han llevado a cabo en muestras de orina, al igual que en el presente estudio. Este es el caso de una serie de trabajos realizados en Japón (Lee et al., 2007; Ueyama et al., 2010, 2006 y 2012) que estudiaron los niveles urinarios de DAPs en individuos con exposición ocupacional a plaguicidas en dos periodos con diferente grado de exposición. Estos estudios concluyeron que había diferencias estacionales en las concentraciones de DAPs independientemente de la ocupación de los sujetos de estudio. Esto está en la misma línea que otro trabajo llevado a cabo en floricultores mexicanos expuestos a OPs (Aguilar-Garduño et al., 2013), donde se compararon periodos de alta y baja exposición (época húmeda y seca).

En un estudio llevado a cabo en Tailandia en niños de 6 a 8 años que vivían en zonas de cultivo de arroz, en las que se realizaba un uso frecuente de OPs, se encontró más de un metabolito DAPs en todos los participantes del estudio, así como una asociación significativa entre la suma total de DAPs y el uso de plaguicidas OPs (Rohitrattana et al., 2014).

También existen estudios con resultados negativos, como dos llevados a cabo en Sudafrica (Dalvie et al., 2011; Motsoeneng y Dalvie, 2015) en aplicadores y granjeros que no muestran ninguna variación significativa en los niveles de OPs y piretroides en una población con exposición ocupacional en comparación a los controles.

Tabla 9. Resumen de los estudios que relacionan los niveles de DAPs con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Ueyama et al., 2006)	OPs	Orina	Japón	25 / 23	Aplicadores	↑ DMP ↓ DEP ↑ DETP ↑ DMTP	
(Lee et al., 2007)	OPs	Orina	Japón	18 / 18	Aplicadores	↑ ΣDMs ↑ ΣDAPs	Esta tendencia se repite al contrastar AE vs BE
(Ueyama et al., 2010)	OPs	Orina	Japón	42 / 32	Aplicadores	↑ DMP = DMTP ↑ DEP ↑ DETP ↑ ΣDAPs	Los aplicadores se dividen en dos subgrupos: los que habían aplicado en los últimos 3 días y los que no (21 / 21)
(Tsatsakis et al., 2010)	OPs	Pelo	Creta, Grecia	6 / 27	Aplicadores	↑ DMP ↑ DEP ↑ DETP ↑ DEDTP ↑ ΣDEs ↑ ΣDAPs	
(Dalvie et al., 2011)	OPs y PYRs	Orina	Western Cape, Sudáfrica	20 / 20	Aplicadores	= DMP = DMTP = DMDTP = DETP = ΣDAPs	Aparecen diferencias significativas entre AE vs BE en DMTP y DMDTP, no así en el resto
(Ueyama et al., 2012)	OPs	Orina	Japón	175 / 164	Aplicadores y cultivadores	= DMP = DMTP ↑ DEP = DETP ↑ ΣDAPs	Compara tres grupos: distribuidores (164), granjeros (147) y aplicadores (28). La tendencia se repite en los grupos de expuestos (granjeros y aplicadores)

Continua →

Tabla 9 (continuación). Resumen de trabajos que relacionan los niveles de DAPs con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Aguilar-Garduño et al., 2013)	OPs	Orina	Estado de México y Morelos, México	136 / 84	Floricultores	↑ DMP ↑ DMTP ↑ DMDTP ↑ DEP ↑ DETP ↑ DEDTP ↑ ΣDMs ↑ ΣDEs ↑ ΣDAPs	
(Kokkinaki et al., 2014)	OPs	Pelo/Orina	Creta, Grecia	34 / 86	Trabajadores de invernadero	↑ DMP ↑ DEP ↑ DETP ↑ DEDTP ↑ ΣDAPs	DMP significativo solo en pelo
(Rohitrattana et al., 2014)	OPs	Orina	Pathum Thani, Tailandia	24 / 29	Niños expuestos	= DMP = DMTP = DMDTP ↑ DEP ↑ DETP = DEDTP ↑ DAPs	Niños de una zona de cultivo de arroz frente a otros de una zona de piscicultura
(Motsoeneng y Dalvie, 2015)	OPs y PYRs	Orina	Western Cape, Sudáfrica	113 / 98	Granjeros	= DMP = DMTP = DMDTP = DEP = DETP = DEDTP = DAPs	Todos son mujeres
(Knipe et al., 2016)	OPs	Pelo	Sri Lanka	18 / 32	Granjeros	↑ DMP ↑ DEP ↑ DETP ↓ DEDTP ↑ ΣDEs ↑ ΣDAPs*	

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados; PYR: piretroides

1.2. Colinesterasas (AChE y BChE)

Son muchos los estudios que se han llevado a cabo para evaluar la influencia de la exposición a plaguicidas sobre las actividades colinesterasa eritrocitaria y plasmática (AChE y BChE). Al realizar una revisión, que no pretende ser sistemática, se encuentran una gran variedad de estudios al respecto, en algunos casos con conclusiones diferentes. Esta heterogeneidad, unido a la complejidad que representa la interpretación de los resultados, hace que sea difícil establecer protocolos de vigilancia para las personas que presentan una exposición crónica.

La Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, ACHIH) estableció como índice de exposición biológica (BEI, por sus siglas en inglés) el 30% de inhibición de la actividad colinesterasa eritrocitaria, respecto del valor basal individual. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) también establece un 30% como nivel de acción para los trabajadores expuestos a compuestos OPs (Maroni et al., 2000; Obiols Quinto, 2004).

Por su parte, niveles individuales de actividad BChE similares a los basales no excluyen una posible exposición crónica a plaguicidas, debido entre otras cosas a la gran variabilidad interindividual en su actividad enzimática, que obedece sobre todo a polimorfismos genéticos. Por ello, para valorar de una forma más precisa la exposición a plaguicidas, los programas de monitorización ocupacional se basan en la medición de cualquiera de las dos colinesterasas para detectar un descenso de su actividad catalítica (Lozano-Paniagua et al., 2016), aunque lo ideal sería una medida de ambas colinesterasas (AChE y BChE) de manera conjunta.

La búsqueda de antecedentes sobre colinesterasas se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: (*acetylcholinesterase OR pseudocholinesterase OR butyrylcholinesterase OR benzoylcholinesterase OR cholinesterase*) AND (*pesticide OR pesticides*) AND ("*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*"). Los criterios de selección fueron: especie (humanos), idioma (español e inglés) y fecha de publicación (desde el año 2008 a la actualidad). Se obtuvieron un total de 118 artículos, de los que se seleccionaron 67 (Tablas 10 y 11), descartando aquellos de poco interés o que no estaban relacionados con exposición ocupacional a plaguicidas.

Además, se tuvieron en cuenta varios estudios previos llevados a cabo por el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada por el gran interés que presentan

para este trabajo (Tabla 10). Este grupo ha estudiado durante décadas la influencia que tiene la exposición crónica a mezcla de plaguicidas en trabajadores de invernadero de la costa de Andalucía, principalmente Granada y Almería, siendo esta mayor en unas épocas del año que en otras. Los estudios, efectuados en muestras de sangre, muestran una disminución de los niveles de AChE y BChE al con la exposición a plaguicidas (Gómez-Martín et al., 2015; Hernández et al., 2005; López et al., 2007). Sin embargo, en determinadas circunstancias, aunque observaron una tendencia hacia niveles más altos de BChE en individuos expuestos (García-García et al., 2016; Hernández et al., 2013a, 2013b, 2013c; Lozano-Paniagua et al., 2016).

Para el resto de estudios (Tabla 11), en la mayoría de los casos se observó un descenso significativo de la AChE asociado a la exposición a plaguicidas. Tan solo en unos pocos estudios esta asociación no fue significativa (Aroonvilairat et al., 2015; Chia et al., 2009; Crane et al., 2013; Khan et al., 2014; Kimata et al., 2009; Naidoo et al., 2010; Ogut et al., 2011; Payán-Rentería et al., 2012; Rohlman et al., 2014; Thomas et al., 2010).

Por otro lado, de los 35 estudios que evalúan la actividad pseudocolinesterasa en relación a la exposición ocupacional a plaguicidas, la mayor parte de ellos estudiaron la BuChE, que utiliza butirilticolina como sustrato. De todos esos estudios, 26 observaron que la exposición producía una inhibición de la BChE, mientras que 8 no encontraron asociación significativa. No obstante también se encontró un estudio en el que la tendencia es inversa, es decir, en el que la exposición crónica a plaguicidas producía un aumento en la BuChE (Chia et al., 2009).

Tabla 10. Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Hernández et al., 2005)	Mezcla	Sangre	Andalucía, España	135 / 54	Trabajadores invernadero	↓ AChE	El descenso se observa solo en AE. Se observa descenso significativo al comparar aplicadores en AE vs BE
(López et al., 2007)	Mezcla	Sangre	Andalucía, España	118 / 55	Trabajadores invernadero	↓ AChE	Se observa descenso significativo al comparar AE vs BE
(Hernández et al., 2013c)	Mezcla	Sangre / Plasma	Andalucía, España	135 / 55	Trabajadores invernadero	↓ AChE ↑ BeChE	Evaluación conjunta de controles y expuestos en AE vs BE, sin estratificar
(Hernández et al., 2013b)	Mezcla	Sangre / Plasma	Almería, España	81 / 37	Trabajadores invernadero	↓ AChE ↑ BeChE	AChE presenta valores menores para expuestos (en AE vs BE) y en el periodo de AE (en controles vs expuestos). La BeChE es mayor en expuestos al comparar ambos periodos
(Hernández et al., 2013a)	Mezcla	Sangre / Plasma	Andalucía, España	135 / 55	Trabajadores de invernadero	↓ AChE ↑ BeChE	Estudio longitudinal. Evaluación conjunta de controles y expuestos en AE vs BE, sin estratificar
(Gómez-Martín et al., 2015)	Mezcla	Sangre / Plasma	Almería, España	39 / 28	Trabajadores invernadero	↓ AChE ↓ BeChE	Resultados de comparar AE vs BE
(García-García et al., 2016)	Mezcla	Sangre / Plasma	Almería, España	189 / 91	Trabajadores invernadero	↓ AChE ↑ BeChE	Los resultados comparan periodos de AE vs BE, pero la AChE no muestra diferencias significativas
(Lozano-Paniagua et al., 2016)	Mezcla	Sangre / Plasma	Almería, España	175 / 84	Trabajadores invernadero	↓ AChE ↑ BeChE ↑ BuChE	

Tabla 11. Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Cataño et al., 2008)	OPs	Plasma	Perú	213 / 78	Agricultores	↓ BChE	
(Ali et al., 2008)	CBs, PYRs y OPs	Suero	Bhawalpur, Paquistán	69 / 69	Recolectoras	↓ BChE	Estudio en mujeres. Medida con kit comercial
(Abdel Rasoul et al., 2008)	Mezcla	Sangre	Egipto	50 / 50	Aplicadores	↓ AChE	Estudio en niños
(Remor et al., 2009)	Mezcla	Plasma	Rio Grande do Sul, Brasil	37 / 20	Aplicadores	↓ BuChE	
(Kimata et al., 2009)	Mezcla	Sangre	Japón	45 / 17	Aplicadores	= AChE	
(Ntow et al., 2009)	OCs, OPs, PYRs y CBs	Sangre	Akumadan, Gana	63 / 58	Aplicadores	↓ AChE	
(Patil et al., 2009)	Mezcla	Suero	Maharashtra, India	60 / 30	Aplicadores	↓ BuChE	
(Chia et al., 2009)	OPs	Sangre / Suero	Singapur	103 / 91	Controladores de plagas	= AChE ↑ BuChE	
(Jintana et al., 2009)	OPs	Sangre / Plasma	Tailandia	90 / 30	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	Este resultado se repite al comparar AE vs BE
(Khan et al., 2010b)	OPs y CBs	Plasma	Swabi, Paquistán	105 / -	Agricultores	↓ BuChE	No estudia controles. Compara con el nivel de exposición
(Atherton et al., 2009)	OPs	Sangre / Plasma	Almería, España	17 / 39	Trabajadores de invernadero	↓ AChE = BuChE	Controles de España y UK. Se observa un descenso en ambas ChE al comparar AE vs BE
(Shayeghi et al., 2009)	OPs y CBs	Sangre	Teherán, Irán	108 / 34	Aplicadores	↓ AChE	

Continua →

Tabla11 (continuación). Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Chakraborty et al., 2009)	OPs y CBs	Sangre	Bengala, India	376 / 348	Aplicadores	↓ AChE	223 aplicadores ocasionales y 153 habituales. ↓ AChE entre ambos
(Kachaiyaphum et al., 2010)	OPs y CBs	Suero	Chaiyaphum, Tailandia	350 / -	Agricultores	↓ BChE	BChE medida con tira reactiva. No estudian controles. Resultados asociados a la exposición
(Ueyama et al., 2010)	OPs	Suero	Japón	32 / 42	Operadores de control de plagas	= BeChE	Expuestos divididos en los que han aplicado plaguicidas en los últimos 3 días y los que no (21+21)
(Hofmann et al., 2010)	OPs y m-CBs	Suero	Washington, EEUU	154 / -	Manipuladores	↓ BuChE	Resultados asociados a la exposición. No estudian controles
(Simoniello et al., 2010b)	Mezcla	Sangre / Plasma	Santa Fe, Argentina	41 / 82	Aplicadores y agricultores	↓ AChE = BuChE	
(Thomas et al., 2010)	Coumafós (OP)	Sangre / plasma	Texas, EEUU	15 / -	Aplicadores	= AChE = BChE	Estudio en ganaderos. BChE medida con kit. No estudian controles. Miden actividad antes y después de la aplicación de plaguicidas.
(Sosan et al., 2010)	OPs	Sangre	Ondo, Nigeria	76 / -	Agricultores	↓ AChE	No estudian controles. Miden AChE antes y después de la aplicación de plaguicidas
(Naidoo et al., 2010)	n/d	Sangre	Sudáfrica	366 / 437	Aplicadores	= AChE	Los sujetos de estudio son todos mujeres
(Ismail et al., 2010)	Mezcla	Suero	Menoufia, Egipto	50 / 50	Aplicadores	↓ BChE	Niños y adolescentes. BChE medida con Kit

Continua →

Tabla11 (continuación). Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Araoud et al., 2010)	OPs y CBs	Suero	Sahel, Túnez	58 / 89	Agricultores	↓ BuChE	
(Simoniello et al., 2010a)	Mezcla	Sangre / plasma	Argentina	95 / 50	Fumigadores (exposición directa) y agricultores (exposición indirecta)	↓ AChE ↓ BuChE	Miden exposición directa e indirecta a plaguicidas. Para BuChE el descenso no es significativo en uno de los subgrupos indirectos
(Sutuluk et al., 2011)	OPs	Suero	Cukurova, Turquía	50 / 50	Agricultores	↓ BuChE	
(Farahat et al., 2011)	Clorpirifos (OP)	Sangre / plasma	Menoufia, Egipto	14 / 24	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	
(Singh et al., 2011b)	OPs	Sangre	Delhi, India	115 / 115	Aplicadores	↓ AChE	
(Ogut et al., 2011)	OPs, PYRs y CBs	Sangre	Turquía	94 / 45	Aplicadores / Formuladores	= AChE	
(Araoud et al., 2011)	Mezcla	Plasma	Sahel, Túnez	110 / 97	Agricultores	↓ BuChE	
(Pathak et al., 2011)	OPs	Sangre / Plasma	Uttar Pradesh, India	108 / 30	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	40 aplicadores con mochilas y 66 con tractor. En ambos casos los resultados son consistentes
(Bayrami et al., 2012)	OPs	Plasma	Arak, Irán	40 / 40	Horticultores	↓ BChE	
(Singh et al., 2011a)	Mezcla	Sangre	Delhi, India	70 / 70	Aplicadores	↓ AChE	
(Astiz et al., 2011)	n / d	Plasma	Entre Ríos, Argentina	32 / 31	Aplicadores	↓ BuChE	Comparan aquellos que usan EPI y los que no. Los resultados son aplicables a ambos grupos
(Singh et al., 2012)	OPs	Sangre	Delhi India	134 / 134	Aplicadores	↓ AChE	

Continua →

Tabla11 (continuación). Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Payán-Rentería et al., 2012)	Mezcla	Sangre	Nextipac, México	25 / 21	Aplicadores	= AChE	Los expuestos son hombr y los controles mujeres. Observan un aumento no significativo de AChE
(Araoud et al., 2012)	OPs, CBs, S-CBs, PYRs	Suero	Sahel, Túnez	110 / 97	Agricultores	↓ BuChE	
(Xie et al., 2010)	OPs, CBs, S-CBs, PYRs	Plasma	Rio Grande do Sul, Brasil	106 / 53	Agricultores	= BuChE	No observan diferencias significativas entre los periodos de alta y baja exposición
(Ellison et al., 2012)	Clorpirifos (OP)	Sangre / plasma	Menoufia, Egipto	100/ -	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	No estudian controles. La exposición está asociada a la concentración de metabolitos
(Pasiani et al., 2012)	OPs y CBs	Sangre, plasma	Brasil	88 / 64	Agricultores	↓ AChE ↓ BuChE	No comparan AE vs BE a pesar de tener muestras
(Crane et al., 2013)	Clorpirifos (OP)	Sangre / Plasma	Menoufia, Egipto	57 / 38	Aplicadores	= AChE ↓ BuChE	Estudio en adolescentes. AChE y BuChE presentan un descenso significativo respecto a niveles basales. La inhibición de la BuChE duró 4-7 semanas
(Sharma et al., 2013)	OPs, CBs, OCs y PYRs	Sangre	Norte de India	70 / 70	Aplicadores	↓ AChE	
(Miranda-Contreras et al., 2013)	Mezcla	Sangre / Plasma	Mérida, Venezuela	64 / 35	Agricultores	↓ AChE ↓ BuChE	
(Khan et al., 2013)	Mezcla	Plasma	Punjab, Paquistán	88 / 88	Aplicadores y recolectores	↓ BChE	42 expuestos son aplicadores y 46 recolectores. Los resultados son similares para ambos subgrupos

Continua →

Tabla11 (continuación). Resumen de trabajos que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Pathak et al., 2013)	Mezcla	Sangre / Plasma	Uttar Pradesh, India	18 / 50	Aplicadores	↓ AChE = BChE	Comparación pre- vs pos-exposición. Para BChE no indican el sustrato utilizado
(Fareed et al., 2013)	OPs	Sangre / Plasma	Lucknow, India	166 / 77	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	
(Wafa et al., 2013)	Herbicidas fenoxiaceticos	Sangre / Plasma	Mateur, Túnez	95 / 45	Agricultores	↓ AChE ↓ BuChE	
(Sapbamrer y Nata, 2014)	OPs y CBs	Sangre	Ban Tom, Tailandia	182 / 122	Agricultores	↓ AChE	Usan inhibidor de BChE para determinar AChE
(Bernal-Hernández et al., 2014)	Mezcla	Sangre / suero	Nayarit, México	64 / 62	Agricultores	↓ AChE ↓ BuChE	Usan inhibidor de BChE para determinar AChE
(Costa et al., 2014)	Mezcla	Plasma	Oporto, Portugal	121 / 61	Agricultores	= BuChE	Los expuestos son 36 trabajadores de una plantación ecológica y 85 de otra tradicional
(Khan et al., 2014)	Clorpirifos (OP)	Sangre / Plasma	Menoufia, Egipto	57 / 38	Aplicadores	= AChE ↓ BuChE	Estudio en adolescentes. AChE y BuChE presenta un descenso significativo respecto a niveles basales.
(Rohlman et al., 2014)	Clorpirifos (OP)	Sangre / Plasma	Delta del Nilo, Egipto	21 / 20	Aplicadores	= AChE = BuChE	Estudio en adolescentes. Descenso no significativo en ambas ChE
(Da Silva et al., 2014)	OPs, CBs, S-CBs, PYRs	Plasma	Rio Grande do Sul, Brasil	30 / 30	Agricultores	= BuChE	Evalúan tres periodos de exposición con resultados similares: fuera de temporada, aplicación y recolección

Continua →

Tabla11 (continuación). Resumen de estudios que relacionan los niveles de colinesterasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas (fuera de los llevados a cabo en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada)

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Thetkathuek et al., 2014)	OPs y CBs	Sangre	Kandal, Camboya	153 / 153	Agricultores	↓ AChE	Medido con papel reactivo
(Neupane et al., 2014)	OPs y CBs	Sangre	Chitwan, Nepal	90 / 90	Granjeros	↓ AChE	
(Singleton et al., 2015)	Clorpirifos y Profenos (OPs)	Sangre / Plasma	Menoufia, Egipto	14 / 24	Aplicadores	↓ AChE ↓ BuChE	De los controles 12 eran técnicos y 12 ingenieros. Tras la aplicación se observó inhibición de ambas ChE
(Aroonvilairat et al., 2015)	Mezcla	Sangre / Plasma	Nakhonpathom y Samutsakhon, Tailandia	64 / 60	Floricultores	= AChE ↓ BuChE	Observaron diferencias significativas en aquellos que manejaron OPs/CBs, pero no en los que utilizaron PYRs. La AChE mostró un descenso no significativo de su actividad
(Krenz et al., 2015)	OPs y m-CBs	Suero	Washington, EEUU	215 / -	Manipuladores	↓ BuChE	Utilizaron la actividad BuChE basal para establecer grado de exposición
(Sunay et al., 2015)	OPs	Sangre	Turquía	54 / 54	n/d	↓ AChE	
(Quandt et al., 2015)	Mezcla	Sangre	Carolina del Norte, EEUU	210 / 163	Granjeros	↓ AChE ↓ BuChE	Utilizaron un inhibidor específico de BuChE
(Pakravan et al., 2016)	OPs	Plasma	Mazandaran, Irán	36 / -	Aplicadores	↓ BuChE	No evaluaron controles, compararon con actividad basal. Descenso del 50 % 2 días después de aplicación. Recuperaron actividad normal en 8 semanas

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados; OCs: organoclorados; CBs: carbamatos; m- CBs: metilcarbamatos; s- CBs: tiocarbamatos PYR: piretroides

1.3. Paraoxonasa PON1

La búsqueda de antecedentes sobre PON1 se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: *PON1 AND (pesticide OR pesticides) AND ("occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers")*. Los criterios de selección fueron: fecha de publicación (desde el año 2003 hasta la actualidad) e idioma (inglés). Se obtuvieron un total de 50 artículos, de los cuales se seleccionaron 16 (Tabla 12), descartando aquellos de poco interés, que no determinaban la actividad PON1 con alguno de los sustratos utilizados en el presente estudio o que no estaban relacionados con exposición ocupacional a plaguicidas.

En la mayoría de estos estudios la exposición a plaguicidas estaba asociada con una disminución de la actividad PON1 medida con diferentes sustratos. No obstante, se encontraron dos artículos en los que esta tendencia era contraria, es decir, mostraban un aumento de la actividad POasa, ssPOasa y DZOasa (Lacasaña et al., 2010a, 2010b). Además, se ha añadido también el único estudio que determinó la DHCasa en el que se observó también un aumento de la actividad con la exposición (Lozano-Paniagua et al., 2016).

En lo que respecta a la AREasa, la mayoría de los estudios observaron una disminución de su actividad asociada a la exposición ocupacional crónica a plaguicidas. Sin embargo, existe un número importante de estudios que no encontraron una asociación significativa (Aguilar-Garduño et al., 2013; Lacasaña et al., 2010a, 2010b; Samsuddin et al., 2016; Zúñiga-Venegas et al., 2015).

Tabla 12. Resumen de estudios que relacionan la actividad PON1 con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Hernández et al., 2003)	Mezcla	Plasma	Almería y Granada, España	102 / 39	Trabajadores de invernadero	↓ POasa ↓ ssPOasa ↓ AREasa ↓ DZOasa	42 expuestos de la zona de Almería y 60 de la de Granada
(Hernández et al., 2004)	Mezcla	Plasma	Granada, España	108 /42	Trabajadores de invernadero	↓ POasa ↓ ssPOasa ↓ AREasa	Mismo estudio que el anterior pero con otros objetivos y biomarcadores
(Araoud et al., 2010)	n/d	Suero	Sahel, Túnez	58 /89	Agricultores	↓ POasa	
(Lacasaña et al., 2010a)	OPs	Plasma	Estado de México y Morelos, México	136 / 84	Floricultores	↑ POasa ↑ ssPOasa = AREasa ↑ DZOasa	Se determinaron en temporada húmeda (AE) vs temporada seca (BE)
(Lacasaña et al., 2010b)	OPs	Suero	Estado de Mexico y Morelos, México	136 / 84	Floricultores	↑ POasa ↑ ssPOasa = AREasa ↑ DZOasa	Se determinaron en temporada húmeda (AE) vs temporada seca (BE)
(Singh et al., 2011b)	OPs	Suero	India	115 /115	Aplicadores	↓ POasa ↓ AREasa	
(Ellison et al., 2012)	Clorpirifos	Suero	Menoufia, Egipto	120 / -	Aplicadores	↓ POasa	No comparan frente a controles sino que determinaron metabolitos
(Singh et al., 2011c)	OPs	Suero	India	150 /134	Aplicadores	↓ POasa	
(Hernández et al., 2013a)	Mezcla	Plasma	Andalucía, España	135 / 55	Trabajadores de invernadero	↓ POasa ↓ ssPOasa ↓ AREasa = DZOasa	

Continua →

Tabla 12 (continuación). Resumen de estudios que relacionan la actividad PON1 con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Aguilar-Garduño et al., 2013)	OPs	Suero	Estado de México y Morelos, México	136 / 84	Floricultores	↑ POasa ↑ ssPOasa = AREasa ↑ DZOasa	Se determinaron en temporada húmeda (AE) vs temporada seca (BE)
(Sunay et al., 2015)	OPs	Plasma	Turquia	54 / 54	Agricultores	↓ POasa	
(X. Zhang et al., 2014)	OPs	Suero	China	180 / 220	Trabajadores fábrica insecticidas	↓ POasa ↓ AREasa	
(Bernal-Hernández et al., 2014)	Mezcla	Plasma	Nayarit, México	64 / 62	Jornaleros	↓ AREasa	
(Zúñiga-Venegas et al., 2015)	n/d	Plasma	Coquimbo, Chile	85 / 97	Agricultores	= POasa = AREasa = DZOasa	Observaron un aumento no significativo de POasa y una disminución de AREasa y DZOasa
(Samsuddin et al., 2016)	Mezcla	Sangre	Malasia	198 / 195	Fumigadores de mosquitos	= ssPOasa = AREasa ↓ DZOasa	
(Lozano-Paniagua et al., 2016)	Mezcla	Suero	Almería	175 / 84	Trabajadores de invernadero	↓ POasa = ssPOasa ↓ AREasa ↑ DHCasa ↓ DZOasa	Al comparar AE vs BE observaron niveles mayores de todas las actividades, con diferencias significativas para DZOasa y DHCasa

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados

2. BIOMARCADORES PARA LA EVALUACIÓN DEL DAÑO ORGANO-ESPECIFICO DERIVADO DE LA EXPOSICION A PLAGUICIDAS

2.1. Biomarcadores de estrés oxidativo

La búsqueda de antecedentes que relacionan el uso de plaguicidas con el estrés oxidativo se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* empleando la siguiente estrategia de búsqueda: "*oxidative stress*" AND (*pesticide OR pesticides*) AND ("*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*"), estableciendo como criterios de selección la fecha de publicación (desde el año 2001 hasta la actualidad) y el idioma (inglés y español). Se han obtenido un total de 49 artículos, de los cuales, tras descartar aquellos no relacionados con exposición ocupacional a plaguicidas, han quedado 19 artículos (Tabla 13).

Entre los parámetros de estrés oxidativo estudiados, el primero es la cantidad de grupos tiólicos totales presentes en el plasma (SHT). Estudios epidemiológicos previos han mostrado que la exposición crónica a plaguicidas da lugar a una disminución en los niveles de grupos tiólicos presentes en la sangre (Mecdad et al., 2011; Ranjbar et al., 2002a, 2002b). No obstante también hay estudios contradictorios como el de Bayrami et al. (2012), llevado a cabo sobre un grupo de 400 agricultores, en el que la exposición a plaguicidas, y más concretamente a OPs, no produce efectos significativos sobre los niveles de SHT.

Con respecto al FRAP, un parámetro que mide la capacidad antioxidante total en sangre y, por tanto, un indicador del nivel de estrés oxidativo generalizado del individuo, los estudios muestran de manera generalizada que sus niveles disminuyen con la exposición a plaguicidas (Astiz et al., 2011; Bayrami et al., 2012; Ranjbar et al., 2002b; Sharma et al., 2013).

En relación al tercer biomarcador estudiado, el TBARS, la mayoría de los estudios epidemiológicos identificados concluyen que la exposición a distintos tipos de plaguicidas produce un aumento de la peroxidación lipídica, aunque sin estar claro su mecanismo. Sin embargo, al igual que ocurría con el SHT, algunos estudios no observan variaciones significativas en sus niveles (Khan et al., 2010a; Shadnia et al., 2005).

Por último, la GGT también es un biomarcador de estrés oxidativo, aunque infrecuentemente utilizado con esos fines. Sin embargo, algunos estudios epidemiológicos han encontrado una

disminución de la actividad GGT asociada con la exposición ocupacional a plaguicidas y en relación con estrés oxidativo (Khan et al., 2010a; Ranjbar et al., 2002a). De igual modo, también hay estudios que no encuentran aumentos significativos de GGT (Araoud et al., 2010).

Tabla 13. Resumen de estudios que relacionan estrés oxidativo con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Prakasam et al., 2001)	Mezcla	Plasma	Tamil Nadu, India	41 / 21	Aplicadores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Ranjbar et al., 2002a)	OPs	Plasma	n/d	45 / 45	Fábrica de plaguicidas	↑ MDA ↓ GGT ↓ SHT	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Ranjbar et al., 2002b)	Paraquat	Plasma	Teherán, Irán	30 / 30	Formuladores de plaguicidas	↑ MDA ↓ FRAP ↓ SHT	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Shadnia et al., 2005)	OPs	Eritrocitos	Irán	21 / 21	Formuladores de plaguicidas	= MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Muniz et al., 2008)	OPs	Suero	Oregón, EE. UU.	22 / 9	Aplicadores y granjeros	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría con Kit comercial. Los expuestos se dividían en granjeros y aplicadores siendo el aumento significativo en ambos
(Kisby et al., 2009)	OPs	Suero	Oregón, EEUU	133 / 56	Aplicadores / Granjeros	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría mediante kits comerciales. Los expuestos se dividían en aplicadores y granjeros, obteniendo resultados similares
(Rastogi et al., 2009)	OPs	Sangre	Lucknow, India	61 / 18	Aplicadores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Araoud et al., 2010)	Mezcla	Suero	Sahel, Túnez	58 / 89	Agricultores	= GGT	
(Khan et al., 2010a)	n/d	Plasma	Paquistán	184 / 54	Fábrica de plaguicidas	↓ GGT ↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS. Compara pequeña, mediana y gran industria, siendo significativo solo en la pequeña.
(Astiz et al., 2011)	Mezcla	n/d	Entre Ríos, Argentina	31 / 32	Aplicadores	↑ MDA ↓ FRAP	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS

Continua →

Tabla 13. Resumen de trabajos que relacionan estrés oxidativo con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Meccad et al., 2011)	OPs, CBs, y fungicidas	Suero	Al-Salheya, Egipto	65 / 30	Aplicadores	↑ MDA ↓ SHT	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS. Los expuestos se dividieron en los expuestos a fungicidas o a plaguicidas. Los resultados fueron similares en ambos casos.
(Ogut et al., 2011)	OPs, CBs y PYRs	Lisado de eritrocitos	n/d	94 / 45	Formuladores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Bayrami et al., 2012)	OPs	Plasma	Arak, Irán	40 / 40	Cultivadores	↑ MDA = SHT ↓ FRAP	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Haque et al., 2012)	OPs	Sangre	India	150 / 50	Formuladores y aplicadores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Da Silva et al., 2012)	n/d	Sangre	Santa Cruz de Sul, Brasil	111 / 56	Cultivadores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Sharma et al., 2013)	Mezcla	Eritrocitos (MDA) y plasma (FRAP)	Norte de India	70 / 70	Aplicadores	↑ MDA ↓ FRAP	Estudio llevado a cabo solo en hombres. MDA medido por espectrofotometría con Kit comercial
(Wafa et al., 2013)	Mezcla	Plasma	Túnez	95 / 45	Granjeros	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Madani et al., 2016)	Mezcla	Plasma	Tlemcen, Argelia	50 / 60	Agricultores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Kahl et al., 2016)	OPs y PYRs	Suero	Santa Cruz de Sul, Brasil	62 / 62	Cultivadores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría a través de la formación de TBARS
(Zepeda-Arce et al., 2017)	OPs y PYRs	Plasma	México	192 / 22	Agricultores	↑ MDA	MDA medido por espectrofotometría con kit comercial. Los expuestos se dividieron en exposición moderada y alta. No encontraron diferencias significativas entre exposición moderada y controles

OPs: organofosforados, CBs: carbamatos; PYRs: piretroides

2.2. Biomarcadores de nefrotoxicidad

2.2.1. Biomarcadores clásicos (creatinina e IFG)

La búsqueda de antecedentes sobre creatinina sérica se llevó a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: *Creatinine AND (pesticide OR pesticides) AND ("occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers")*. Los criterios de selección fueron: idioma (español e inglés), especie (humanos) y fecha de publicación (desde el año 2000 hasta la actualidad). Se encontraron un total de 67 artículos, de los cuales se seleccionaron 13 (Tabla 14), descartando aquellos que no estaban relacionados con exposición ocupacional a plaguicidas o que determinaban los niveles de creatinina en muestras biológicas diferentes al suero.

Los estudios evaluados sobre el efecto de la exposición crónica de tipo ocupacional a plaguicidas muestran resultados contradictorios. Así, en algunos estudios la exposición a plaguicidas se asocia a un aumento de los niveles de creatinina (Arnal et al., 2011; García-García et al., 2016; Hernández et al., 2006a; Patil et al., 2009; Singh et al., 2011a). Sin embargo, también se encuentran otros que muestran la tendencia contraria (Araoud et al., 2012; Malekirad et al., 2013). No obstante, en la mayoría de los casos la variación no es significativa (Al-Sarar et al., 2009; Aroonvilairat et al., 2015; Gaikwad et al., 2015; Hsiao et al., 2009; Khan et al., 2010a; Verplanke et al., 2000) como ocurre con la exposición a *cis*-1,3-dicloropropeno o al 1,4-diclorobenceno.

Con respecto al índice de filtración glomerular (IFG), la estrategia de búsqueda utilizada fue: *("Glomerular filtration rate" OR GFR) AND ("occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers" OR pesticide OR pesticides)*. Los criterios de selección fueron: fecha de publicación (desde 2005 a la actualidad), idioma (español e inglés) y especie (humanos). De los 84 artículos encontrados se seleccionaron aquellos de mayor interés, aunque ninguno estaba relacionado con la exposición ocupacional a plaguicidas (Tabla 15).

De los estudios seleccionados uno se llevó a cabo en pacientes con enfermedad renal crónica (Siddharth et al., 2012) en el que el uso de insecticidas OCs se asoció con una disminución del IFG.

Al no encontrar más estudios sobre plaguicidas, se buscaron estudios con otros tóxicos para evaluar el comportamiento del biomarcador en cuestión. Así, varias publicaciones estudiaron la relación entre el IFG y la exposición ocupacional a metales. Dos de ellos (Orisakwe et al., 2007; Weaver et al., 2005) no encontraron asociación significativa del IFG con la exposición a Pb, mientras que otro (Khan et al., 2008) observó una disminución significativa del IFG. Otros estudios mostraron que la exposición a Cd se asociaba a un aumento del IFG (Weaver et al., 2011). Otro estudio sobre exposición a diversos metales también encontró un aumento relacionado con la exposición a Tl (Shelley et al., 2012).

Por último, un estudio llevado a cabo en Suecia sobre mujeres con exposición ambiental a Cd mostró una disminución del IFG con respecto a la población control (Åkesson et al., 2005).

Tabla 14. Resumen de estudios que relacionan los niveles de creatinina sérica con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Verplanke et al., 2000)	cis-1,3-dicloropropeno	Suero	n/d	13 / 22	Aplicadores	= CREAT	
(Hernández et al., 2006a)	Mezcla	Suero	Granada, España	106 / -	Trabajadores de invernadero	↑ CREAT	Evaluaron AE vs BE. No hay controles
(Al-Sarar et al., 2009)	n/d	Suero	Riyadh, Arabia Saudí	43 / 10	Aplicadores	= CREAT	
(Hsiao et al., 2009)	1,4-diclorobenzeno	Suero	Taiwán	46 / 29	Fábrica de bolas de naftalina	= CREAT	
(Patil et al., 2009)	n/d	Suero	Maharashtra, India	60 / 30	Aplicadores	↑ CREAT	
(Khan et al., 2010a)	n/d	Suero	Paquistán	184 / 54	Trabajadores fabrica plaguicidas	= CREAT	Dividieron los expuestos en pequeña, mediana y gran industria, los resultados fueron similares en los tres casos (aumento no significativo)
(Arnal et al., 2011)	Plaguicidas basados en Cu	Plasma	Entre Ríos, Argentina	31 / 32	Aplicadores	↑ CREAT	
(Singh et al., 2011a)	OPs	Suero	India	70 / 70	Aplicadores	↑ CREAT	
(Araoud et al., 2012)	OPs, CBs, PYRs y S-CBs	Suero	Sahel, Túnez	110 / 97	Agricultores	↓ CREAT	
(Malekirad et al., 2013)	OPs	Suero	Irán	187 / 187	Horticultores	↓ CREAT	
(Gaikwad et al., 2015)	n/d	Suero	India	27 / 27	Aplicadores	= CREAT	Todos los individuos eran hombres
(Aroonvilairat et al., 2015)	Mezcla	Suero	Tailandia	64 / 60	Floricultores	= CREAT	
(García-García et al., 2016)	Mezcla	Suero	Almería, España	189 / 91	Trabajadores de invernadero	↑ CREAT	Utilizaron modelos lineales mixtos con el término de interacción [AE vs BE]* [expuestos vs controles]

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados; CBs: metil-carbamatos; S-BBs: tiocarbamatos; PYR: piretroides; CREAT: creatinina sérica

Tabla 15. Resumen de estudios que relacionan el IFG con la exposición crónica ocupacional a compuestos distintos de plaguicidas (sobre todo metales pesados)

REFERENCIA	TOXICO (METAL)	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Åkesson et al., 2005)	Cd	Lund, Suecia	816 / -	Población expuesta	↓ IFG	No hay controles. Estudiaron mujeres con exposición ambiental y determinaron Cd en sangre y orina.
(Weaver et al., 2005)	Pb	República de Corea	803 / -	Trabajadores industrias	= IFG	Compararon el IFG con los niveles de Cd. No controles
(Orisakwe et al., 2007)	Pb, Cd y Ni	Anambra, Nigeria	25 / 25	Trabajadores fabrica pinturas	= IFG	
(Khan et al., 2008)	Pb	Wah Cantt, Paquistán	87 / 61	Trabajadores	↓ IFG	
(Weaver et al., 2011)	Cd	República de Corea	712 / -	Trabajadores industrias	↑ IFG	Compararon el IFG con los niveles de Cd. No hay controles
(Siddharth et al., 2012)	OCs	Delhi, India	150	Pacientes con enfermedad renal crónica	↓ IFG	No es un estudio ocupacional
(Shelley et al., 2012)	Varios metales (Tl, Sb, Cd y Pb)	República de Corea	684 / -	Trabajadores industrias	↑ IFG	Compararon el IFG con los niveles de los diferentes metales. Solo encuentra asociación significativa para Tl. No hay controles

2.2.2. Nuevos biomarcadores (albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, OPN, TFF3)

La búsqueda de antecedentes estos otros biomarcadores de nefrotoxicidad en orina se llevó a cabo en la base de datos *PubMed* con las siguientes estrategias de búsqueda:

- (*"Urinary albumin" OR "Serum albumin"*) AND (*"occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*)
- (β 2M OR *"beta-2-microglobulin" OR "beta 2 microglobulin" OR "beta-2 microglobulin"*) AND (*"occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*)
- *"Cystatin C"* AND (*(pesticide OR pesticides) OR ("occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers")*)
- (*NGAL OR "neutrophil gelatinase-associated lipocalin"*) AND (*(pesticide OR pesticides OR "occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*)
- (*Osteopontin OR OPN*) AND (*pesticide OR pesticides OR "occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*)
- (*"Trefoil Factor 3" OR TFF3 OR "Intestinal Trefoil Factor"*) AND (*pesticide OR pesticides OR (nephrotoxicity OR toxicity OR toxic)*)

De todos ellos se seleccionaron los de mayor interés priorizando los estudios ocupacionales (a plaguicidas u otras sustancias químicas) frente a otros estudios en humanos o en animales. Se obtuvieron un total de 17 artículos realizados en orina (Tabla 16). No obstante también se han incluido 8 llevados a cabo en sangre debido a los pocos estudios que se han encontrado para la cistatina C y la osteopontina (Tabla 17).

De los estudios que relacionan los niveles urinarios de albúmina con exposiciones ocupacionales, tan solo uno llevado a cabo sobre floricultores en los Países Bajos encuentra asociación con la exposición a plaguicidas (Brouwer et al., 1991). En él se observa que la exposición a 1,3-dicloropropeno produce un aumento de la excreción de albúmina a través de la orina. También se encontraron otros estudios relacionados con la exposición ocupacional a metales. Así, trabajadores de una fábrica de dicromato sódico (Wang et al., 2011) y soldados expuestos a Cd (Mortada et al., 2015) mostraron un aumento de los niveles de albúmina en orina. Por su

parte, dos estudios llevado a cabo con policías de tráfico (Mortada et al., 2001) y trabajadores de acero (Wrońska-Nofer et al., 2015) relacionaron la exposición a Pb con un aumento de la albúmina urinaria. También se han encontrado resultados contradictorios, pues un estudio llevado a cabo en trabajadores de fundición no observó una asociación significativa entre la exposición a Pb y los niveles urinarios de albúmina (Alasia et al., 2010).

En relación a la β -2-micriglobulina (β 2M) urinaria, dos estudios evaluaron su asociación con el 1,3-dicloropropeno, uno llevado a cabo en floricultores (Brouwer et al., 1991) y el otro en aplicadores (Verplanke et al., 2000). Sin embargo, ninguno de ellos mostró asociaciones significativas con la β 2M. Otros estudios llevados a cabo en soldadores, trabajadores de una fábrica de batería o de fábricas de acero expuestos a Pb, Cd o, en general, a humos de soldaduras tampoco observaron asociaciones significativas (Aminian et al., 2011; Bulat et al., 2009; Nawrot et al., 2010; Wrońska-Nofer et al., 2015). Sin embargo, trabajadores expuestos a diversos metales (As, Pb, Cu, Cd, Cr,...) y a estireno sí presentaron un aumento de la excreción urinaria de β 2M (Ding et al., 2011; Halatek et al., 2009; Helal y Elshafy, 2012; Mortada et al., 2015; Wang et al., 2011).

Dos estudios relacionaron la exposición aguda de paraquat con un aumento de cistatina C en orina y plasma (Mohamed et al., 2015; Roberts et al., 2011). La búsqueda bibliográfica efectuada no encontró más estudios ocupacionales que hagan referencia a la cistatina C en orina. En cuanto a los niveles de cistatina C en sangre, diversos estudios llevados a cabo en trabajadores de fundiciones, de fábricas de dicromato y en soldadores mostraron un aumento significativo de cistatina C en sangre asociado con la exposición ocupacional a Pb, Cd, As, dicromato sódico y vapores de la soldadura (Harisa et al., 2014; Mortada et al., 2015; Poręba et al., 2011; Wang et al., 2011).

Tan solo se encontró un estudio ocupacional que evaluó la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en orina (Chuang et al., 2015). En él, soldadores expuestos durante su jornada laboral a humos de la soldadura mostraron un aumento de los niveles urinarios de NGAL. Asimismo, otro estudio realizado en pacientes con exposición aguda a paraquat mostró un aumento de NGAL a partir de la intoxicación (Mohamed et al., 2015).

En relación a la osteopontina (OPN), no se encontraron estudios recientes que la relacionen con exposiciones ocupacionales. En cambio sí hay trabajos que determinan OPN en sangre, dos de ellos en plasma de trabajadores de una fábrica de asbesto (Felten et al., 2014; Mastrangelo et al.,

2011) y otro en muestras de suero de trabajadores de una fábrica de nanotubos de carbono monocapa (Fatkhutdinova et al., 2016). En ninguno de ellos se encontró asociación significativa entre la exposición y los niveles de OPN.

En relación al último de los biomarcadores estudiados, el factor trébol 3 (TFF3), no se encontraron estudios en humanos con exposición ocupacional. Sin embargo, se han identificado dos estudios en ratas. En el primero (Yu et al., 2010), la administración de diferentes tóxicos dio lugar a un descenso de los niveles de TFF3. En el segundo estudio (Wadey et al., 2013), la exposición a cisplatino, un fármaco usado en quimioterapia para tratar diferentes tipos de cáncer y que presenta un efecto nefrotóxico, se observó un descenso en los niveles urinarios de TFF3.

Tabla 16. Resumen de estudios que relacionan diversos biomarcadores urinarios de nefrotoxicidad con exposiciones ocupacionales

REFERENCIA	TOXICO	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Brouwer et al., 1991)	1,3-dicloropropeno	Bollenstreek, Países Bajos	14 / -	Floricultores	↑ ALB, = β2M	Compararon los niveles antes y después de la aplicación
(Verplanke et al., 2000)	1,3-dicloropropeno	n/d	13 / 22	Aplicadores	= β2M	
(Mortada et al., 2001)	Plomo	Egipto	43 / 52	Policías de tráfico	↑ ALB	
(Bulat et al., 2009)	Cd	Serbia	32 / 15	Fábrica de baterías	= β2M	
(Halatek et al., 2009)	As, Pb y Cu	Polonia	39 / 16	Trabajadores de fundición	↑ β2M	
(Alasia et al., 2010)	Pb	Port Harcourt, Nigeria	190 / 80	Trabajadores	= ALB	
(Nawrot et al., 2010)	Humo de soldadura	Bélgica	415 / -	Soldadores	= β2M	Determinó niveles de metales y clasificó la exposición baja, media y alta. No mide controles
(Wang et al., 2011)	Na ₂ Cr ₂ O ₇	Shandong, China	115 / 60	Fábrica de dicromato	↑ βB2M ↑ ALB	
(Ding et al., 2011)	Humo de soldadura	China	103 / -	Soldadores	↑ β2M	Determinó niveles de metales. No mide controles
(Aminian et al., 2011)	Humo de soldadura	Teherán, Irán	50 / 50	Soldadores	= β2M	

Continua →

Tabla 16 (continuación). Resumen de estudios que relacionan diversos biomarcadores urinarios de nefrotoxicidad con exposiciones ocupacionales

REFERENCIA	TOXICO	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Helal y Elshafy, 2012)	Estireno	El Oboor, Egipto	40 / 50	Fábrica de plástico	↑ β2M	
(Mortada et al., 2015)	Cd	Egipto	49 / 32	Soldadores	↑ β2M, ↑ ALB	
(Wrońska-Nofer et al., 2015)	Pb y Cd	Polonia	53 / 40	Trabajadores de acero	= β2M ↑ ALB	
(Mohamed et al., 2015)	Paraquat	Sri Lanka	85 / -	Pacientes con exposición aguda	↑ CYS-C ↑ NGAL	No es un estudio ocupacional. La exposición es aguda
(Chuang et al., 2015)	Humo de soldadura	Taiwán	66 / 12	Soldadores	↑ NGAL	

CYS-C: cistatina C; ALB: albúmina

Tabla 17. Resumen de estudios que relacionan biomarcadores de nefrotoxicidad en sangre con exposiciones ocupacionales

REFERENCIA	TÓXICO	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACIÓN	RESULTADO	OBSERVACIONES
(Mastrangelo et al., 2011)	Asbesto	Plasma	Venecia, Italia	193 / -	Trabajadores	= OPN	Todos los individuos estaban expuestos. Compararon aquellos con placas pleurales con los que no las presentaban (50 / 143)
(Poręba et al., 2011)	Pb, Cd y As	Plasma	Polonia	282 / -	Trabajadores de fundición	↑ CYS-C	Determinaron niveles de metales. No hay grupo control
(Roberts et al., 2011)	Paraquat	Suero	Anuradhapura y Polonnaruwa, Sri Lanka	20 / -	Pacientes con exposición aguda	↑ CYS-C	No es un estudio ocupacional. La exposición es aguda
(Wang et al., 2011)	Na ₂ Cr ₂ O ₇	Suero	Jinan, Shandong (China)	115 / 60	Fábrica de cromato	↑ CYS-C	
(Harisa et al., 2014)	Humo de soldadura	Plasma	n/d	40 / 10	Soldadores	↑ CYS-C	Los expuestos se dividieron en soldadores, soldadores diabéticos, soldadores fumadores y soldadores fumadores diabéticos
(Felten et al., 2014)	Asbesto	Plasma	Alemania	2160 / 120	Extrabajadores de fábrica asbesto	= OPN	De los expuestos, 1894 presentaban una exposición clara y el resto una exposición ocasional
(Mortada et al., 2015)	Cd	Suero	Egipto	49 / 32	Soldadores	↑ CYS-C	
(Fatkhutdinova et al., 2016)	Nanotubos de carbono multicapa	Suero	Tambov, Rusia	10 / 12	Fábrica de nanotubos	= OPN	

CYS-C: *cistatina C*

2.3. Biomarcadores de hepatotoxicidad

2.3.1. Aminotransferasas (ALT y AST)

Entre las pruebas funcionales hepáticas, las transaminasas (ALT y AST), junto a la GGT y ALP, son las más habituales. Estos biomarcadores se han utilizado de una manera rutinaria para evaluar el daño hepático producido por diferentes factores, por lo que también pueden ser útiles como biomarcadores de hepatotoxicidad producida por la exposición crónica a plaguicidas. Por eso se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: ("*alanine aminotransferase*" OR "*alanine transaminase*" OR ALT OR GOT OR "*aspartate transaminase*" OR "*aspartate aminotransferase*" OR AST OR GPT) AND (*pesticide OR pesticides*) AND ("*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*"). De los 32 artículos encontrados se seleccionaron aquellos más relevantes, dando prioridad a los más recientes (año 2006 en adelante). Además se añadieron algunos estudios incluidos previamente por otros motivos y que determinaron también alguna de estas dos enzimas (Tabla 18).

Varios estudios llevados a cabo en trabajadores de invernadero de la zona del Poniente de Almería con exposición ocupacional crónica a plaguicidas mostraron un aumento de ambas transaminasas (Hernández et al., 2013b, 2006a). Estos resultados son consistentes con otros observados en aplicadores de plaguicidas (Awad et al., 2014; Patil et al., 2009; Singh et al., 2011a), trabajadores de industrias de producción y comercialización de plaguicidas (Fahimul-Haq et al., 2013; Joshaghani et al., 2007; Khan et al., 2010a) y agricultores en general (Ali et al., 2008; Araoud et al., 2012, 2010), todos ellos expuestos a plaguicidas OPs aislados o en combinación con otros tipos de plaguicidas.

A pesar de que en todos los casos se observa un incremento significativo de AST y ALT con la exposición a plaguicidas, existen varios estudios en los que estas diferencias no son significativas (Al-Sarar et al., 2009; Aroonvilairat et al., 2015; Verplanke et al., 2000). Esto también ocurre en algunos casos solo con la ALT (Rojas-García et al., 2011) o AST (Gaikwad et al., 2015; García-García et al., 2016; Hsiao et al., 2009).

Tabla 18. Resumen de estudios que relacionan las transaminasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTR A	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Verplanke et al., 2000)	cis-DCP	Suero	n/d	22 / 22	Aplicadores	= AST = ALT	
(Hernández et al., 2006)	Mezclas	Suero	Granada, España	106 / -	Trabajadores invernadero	↑ AST = ALT	Determinaron BChE para establecer la exposición y establecieron dos grupos: inhibición superior o inferior al 25 %. No estudiaron controles
(Bhalli et al., 2006)	OPs y PYRs	Suero	Punjab, Paquistán	29 / 35	Fábrica plaguicidas	↑ AST ↑ ALT	
(Joshaghani et al., 2007)	OPs y CBs	Suero	Irán	63 / -	Fábrica plaguicidas	↑ AST ↑ ALT	Compararon los biomarcadores en el momento de la contratación y a los tres meses de trabajar. No estudiaron controles.
(Ali et al., 2008)	OPs, PYRs y CBs	Suero	Bhawalpur, Paquistán	69 / 69	Recolectores	↑ AST ↑ ALT	Todos los individuos eran mujeres
(Hsiao et al., 2009)	1,4-diclorobenzeno	Suero	Taiwán	46 / 29	Fábrica de insecticida	= AST ↑ ALT	
(Al-Sarar et al., 2009)	n/d	Suero	Riyadh, Arabia Saudí	43 / 10	Aplicadores	= AST = ALT	
(Patil et al., 2009)	n/d	Suero	Tasgaon Taluka, India	60 / 30	Aplicadores	↑ AST ↑ ALT	
(Araoud et al., 2010)	Mezclas	Suero	Sahel, Túnez	58 / 89	Agricultores	↑ AST ↑ ALT	
(Khan et al., 2010a)	n/d	Suero	Paquistán	184 / 54	Fábrica de plaguicidas	↑ AST ↑ ALT	Dividieron el estudio en pequeñas, medianas y grandes industrias (56/61/67). Los resultados fueron significativamente mayores en la pequeña y mediana industria con respecto a la gran empresa
(Rojas-García et al., 2011)	Mezclas	Plasma	Nayarit, México	83 / 98	Almacén plaguicidas	↑ AST = ALT	

Continua →

Tabla 18 (continuación). Resumen de estudios que relacionan las transaminasas con la exposición crónica ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Singh et al., 2011a)	OPs	Suero	Norte de la India	70 / 70	Aplicadores	↑ AST ↑ ALT	
(Araoud et al., 2012)	OPs, PYR, CBs y S-CBs	Suero	Sahel, Túnez	110 / 97	Agricultores	↑ AST ↑ ALT	
(Malekirad et al., 2013)	OPs	Suero	Irán	187 / 187	Horticultores	↓ AST ↓ ALT	
(Hernández, et al., 2013)	Mezclas	Suero	Almería, España	135 / 55	Trabajadores invernadero	↑ AST ↑ ALT	
(Fahimul-Haq et al., 2013)	n/d	Suero	Paquistán	100 / 100	Fábrica plaguicidas	↑ AST ↑ ALT	
(Awad et al., 2014)	OPs y CBs	Suero	Banger El-Soukar, Egipto	100 / 100	Aplicadores	↑ AST ↑ ALT	Todos los individuos eran hombres
(Gaikwad et al., 2015)	n/d	Suero	India	27 / 27	Aplicadores	= AST	Todos los individuos eran hombres
(Aroonvilairat et al., 2015)	Mezclas	Suero	Nakhonpathom y Samutsakhon, Tailandia	64 / 60	Horticultores	= AST = ALT	
(García-García et al., 2016)	Mezclas	Suero	Almería, España	189 / 91	Trabajadores invernadero	= AST = ALT	Evaluaron en dos periodos: AE y BE. El cambio en ALT se produce al comparar ambos periodos

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados; CBs: carbamatos; S-CBs: tiocarbamatos; PYR: piretroides

2.3.2. Enzimas de colestasis (ALP y GGT)

Para las dos enzimas de colestasis estudiadas se realizó una búsqueda bibliográfica en *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: ("alkaline phosphatase" OR alp OR "gamma-glutamyltransferase" OR "gamma glutamyltransferase" OR "gammaglutamyltransferase" OR "gamma glutamyl transferase" OR "gamma-glutamyltransferase" OR "gamma glutamyltransferase" OR "gammaglutamyltransferase" OR "gamma glutamyl transferase" OR GGT) AND (pesticide OR pesticides) AND ("occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"). A los estudios encontrados se añadieron otros identificados revisando otros parámetros y se seleccionaron aquellos de mayor interés para el presente estudio (Tabla 19).

En el caso de la fosfatasa alcalina (ALP) se observó un aumento en todos los estudios. La única diferencia radica en que en algunos este incremento es significativo (Ali et al., 2008; Araoud et al., 2010, 2012; Awad et al., 2014; Bhalli et al., 2006; Fahimul-Haq et al., 2013; Hernández et al., 2013; Malekirad et al., 2013; Patil et al., 2009), mientras que en otros no (Al-Sarar et al., 2009; Aroonvilairat et al., 2015; Gaikwad et al., 2015; Khan et al., 2010a; Singh et al., 2011a). En algunos casos se encontró un descenso de la actividad ALP (García-García et al., 2016).

En relación a la γ -glutamyltransferasa (GGT), la discrepancia de resultados encontrada es aún mayor. Hay estudios que muestran un aumento de la actividad enzimática asociada con la exposición (Hernández et al., 2013b; Rojas-García et al., 2011) y otros donde se observan la tendencia inversa (Baharuddin et al., 2011; Khan et al., 2010a; Singh et al., 2011a). En cualquiera de los casos, la mayoría de los estudios muestran que la variación de la GGT, ya sea por aumento o por descenso, asociada con la exposición no es significativa (Araoud et al., 2012, 2010; García-García et al., 2016; Patil et al., 2009; Verplanke et al., 2000).

Tabla 19. Resumen de estudios que relacionan las enzimas de colestasis con la exposición ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Verplanke et al., 2000)	cis-DCP	Suero	n/d	22 / 22	Aplicadores	= ALP = GGT	
(Bhalli et al., 2006)	OPs y PYRs	Suero	Punjab, Paquistán	29 / 35	Fábrica de plaguicidas	↑ ALP	
(Ali et al., 2008)	OPs, CBs y PYRs	Suero	Bhawalpur, Paquistán	69/ 69	Recolectores	↑ ALP	Todos los individuos eran mujeres
(Al-Sarar et al., 2009)	n/d	Suero	Riyadh, Arabia Saudí	43 / 10	Aplicadores	= ALP	
(Patil et al., 2009)	n/d	Suero	Tasgaon Taluka, India	60 / 30	Aplicadores	↑ ALP = GGT	
(Khan et al., 2010a)	n/d	Suero (plasma para GGT)	Paquistán	184 / 54	Fábrica de plaguicidas	= ALP ↓ GGT	Dividieron el estudio en pequeñas, medianas y grandes industrias (56/61/67). Los resultados fueron significativamente mayores en la pequeña y mediana industria con respecto a la gran empresa
(Araoud et al., 2010)	Mezcla	Suero	Sahel, Túnez	58 / 89	Agricultores	↑ ALP = GGT	
(Baharuddin et al., 2011)	Paraquat y 2,4- diclorofenoxiacetico	Plasma	Perak, Malasia	140 / 80	Granjeros	↓ GGT	
(Rojas-Garcia et al., 2011)	n/d	Plasma	Nayarit,, México	83 / 98	Almacén de plaguicidas	↑ GGT	
(Singh et al., 2011a)	OPs	Suero	Norte de la India	70 / 70	Aplicadores	= ALP ↓ GGT	

Continua →

Tabla 19 (continuación). Resumen de estudios que relacionan las enzimas de colestasis con la exposición ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Araoud et al., 2012)	OPs, CBs, PYRs y S-CRBs	Suero	Sahel, Túnez	110 / 97	Agricultores	↑ ALP = GGT	
(Malekirad et al., 2013)	OPs	Suero	Sureste de Irán	187 / 187	Horticultores	↑ ALP	
(Hernández et al., 2013)	Mezclas	Suero	Almería, España	135 / 55	Trabajadores invernadero	↑ ALP ↑ GGT	
(Fahimul-Haq et al., 2013)	Mezclas	Suero	Paquistán	100 / 100	Trabajadores industria	↑ ALP	
(Awad et al., 2014)	OPs y CBs	Suero	Banger El-Soukar, Egipto	100 / 100	Aplicadores	↑ ALP	Todos los individuos eran hombres
(Gaikwad et al., 2015)	n/d	Suero	India	27 / 27	Aplicadores	= ALP	Todos los individuos eran hombres
(Aroonvilairat et al., 2015)	Mezclas	Suero	Nakhonpathom y Samutsakhon, Tailandia	64 / 60	Horticultores	= ALP	
(García-García et al., 2016)	Mezclas	Suero	Almería, España	189 / 91	Trabajadores invernadero	↓ ALP = GGT	Evaluaron AE vs. BE. El cambio en ALP en los trabajadores se produce al comparar AE vs. BE

AE: alta exposición; BE: baja exposición; OPs: organofosforados; CBs: carbamatos; PYR: piretroides; DCP: 1,3 dicloropropeno

2.3.3. Enzimas del ciclo de la urea (OTC y arginasa I)

La búsqueda de antecedentes de las enzimas que intervienen en el ciclo de la urea se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: ("*type-I arginase*" OR "*L-arginase*" OR "*liver-type arginase*" OR "*arginase-1*" OR "*arginase-I*" OR "*arginase 1*" OR "*arginase I*" OR "*ornithine carbamoyltransferase*" OR "*ornithine carbamoyl transferase*" OR "*ornithine carbamyltransferase*" OR "*ornithine carbamyl transferase*" OR "*ornithine transcarbamylase*" OR "*ornithine trans carbamylase*") AND (*pesticide* OR *pesticides* OR "*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*").

Al realizar esta búsqueda pocos artículos evaluaron la asociación entre enzimas del ciclo de la urea y la exposición a plaguicidas. Uno de ellos evalúa el efecto de la exposición ambiental a plaguicidas sobre mujeres embarazadas en una zona rural (Bulgaroni et al., 2013), encontrando que la exposición a plaguicidas OPs aumenta la actividad de ambas enzimas en la placenta. Por otro lado, un estudio ocupacional sobre trabajadores de una industria de poliéster expuestos a estireno (Hotz et al., 1980) mostró un aumento de la actividad ornitinatranscarbamilasa (OTC) en plasma, lo que indicaba que podría ser un potencial biomarcador de hepatotoxicidad.

Ante la ausencia de estudios en humanos, se buscaron estudios efectuados en ratas. Varios de ellos, llevados a cabo en Japón (Murayama et al., 2009, 2008, 2007), administraron dosis variables de diversos tóxicos como etanol, tioacetamida, tetraclorometano, alcohol alílico, D-galactosamina, lipopolisacarido y concaavalina A. En todos los casos se observó un aumento de la actividad de arginasa I y OTC, tanto en exposiciones agudas como crónicas. Este hallazgo se corroboró con otro estudio, también en ratas, que evaluó la actividad de la arginasa I tras exponerlas a dosis variables de diferentes tóxicos, encontrando resultados similares a los del estudio de Japón (Bailey et al., 2012). Un último estudio llevado a cabo en suero de ratas (Kanda et al., 2008) mostró que la exposición a metilmercurio también producía un aumento de la arginasa I.

2.3.4. Glutathion S-Transferasa (GST- α)

La búsqueda de antecedentes sobre GST- α se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* con la siguiente estrategia de búsqueda: ("*alpha GST*" OR "*alpha-GST*" OR "*glutathione s-transferase alpha*" OR "*alpha-glutathione s-transferase*") AND (*pesticide* OR *pesticides* OR "*occupational exposure*" OR "*agriculture workers*" OR "*agricultural workers*").

De todos los estudios encontrados, ninguno se efectuó en sangre de trabajadores expuestos a cualquier tipo de tóxico, incluyendo plaguicidas. Sin embargo, un estudio efectuado en Escocia mostró que el autoconsumo de paracetamol produce un aumento significativo de los niveles de GST- α en sangre de estos pacientes (Beckett et al., 1989).

Por otro lado, se encontraron dos estudios en ratas que habían sido expuestas a ácido valproico. El primero, llevado a cabo en muestras de hepatocitos, muestran un aumento de los niveles de GST- α tras la exposición (Tong, 2005). El segundo estudio, realizado en muestras de suero, también observó un aumento de la actividad GST- α en sangre (D. Lee y Jacobs, 2009).

Por último, se encontró un estudio efectuado en células hepáticas HepG2 tratadas con metilparatión y clorpirifos que mostró un aumento significativo de la actividad de la GST- α tras la exposición a estos plaguicidas (Medina-Díaz et al., 2011).

2.4. Biomarcadores de neurotoxicidad

Las búsquedas de antecedentes sobre neurotoxicidad se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* empleando las siguientes estrategias de búsqueda: (*S100B OR S100-B OR "S100 B" OR "S100 beta" OR "S100 calcium binding protein beta subunit"*) AND ((*pesticide OR pesticides*) OR (*"occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*)) y (*"phosphorylated neurofilament heavy chain" OR pNFH OR "pNF-H" OR "pNF H"*) AND (*neurotoxicity OR toxicity OR toxic*). De todos ellos se han seleccionado aquellos que se consideran relevantes para el presente estudio (Tabla 20). No obstante, no se ha encontrado ningún estudio que evalúe la influencia de la exposición ocupacional a plaguicidas sobre las alteraciones de la proteína S100B. Sin embargo, hay varios estudios llevados a cabo en individuos con intoxicación aguda por CO (Brvar et al., 2004; Cakir et al., 2010; Yardan et al., 2009) y que muestran una asociación del nivel de daño cerebral con los niveles de S100B en sangre. Así, niveles elevados de S100B están asociados con los casos más graves de intoxicación y que el tratamiento de la misma disminuye los niveles de este biomarcador en suero de los pacientes.

Algunos estudios han evaluado la influencia de diversos metales sobre la proteína S100B. Así, la exposición crónica a una mezcla de metales (principalmente plomo, cadmio y manganeso) en una zona de reciclado ilegal se asoció con un aumento de S100B (Liu et al., 2014). Asimismo, la

exposición aguda a mercurio procedente de los termómetros también se asoció con un aumento de la S100B (Yilmaz et al., 2014).

Otros estudios que merecen ser reseñados están relacionados con la exposición a drogas o fármacos. Uno de ellos evaluó los niveles séricos de la proteína S100B en consumidores crónicos de cocaína (Kessler et al., 2007); sin embargo, no observó diferencias significativas en los niveles de S100B entre los sujetos dependientes y los controles. Por otro lado, un estudio efectuado en niños expuestos a quetamina, un anestésico habitual, antes y después de una intervención quirúrgica mostró una asociación significativa con un aumento de los niveles séricos de S100B en el post-operatorio (Yan et al., 2014).

Los compuestos OPs constituyen uno de los grupos de plaguicidas más estudiados y que presentan efectos neurotóxicos típicos. Una de las dianas donde actúan es en el citoesqueleto neuronal, en concreto sobre los neurofilamentos, afectando el desarrollo neurológico. Entre ellos caben destacar los neurofilamentos de cadenas pesadas (NF-H), que contienen numerosos residuos de serina susceptibles de fosforilarse por acción de los insecticidas OPs de forma análoga a la AChE, lo cual interfiere con el neurodesarrollo (Flaskos, 2014).

Al igual que con la proteína S100B, no se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio sobre neurofilamento de cadena pesada fosforilado (pNF-H) realizado en individuos con exposición ocupacional a plaguicidas. Sin embargo, se han encontrado dos estudios efectuados en ratas (RamaRao et al., 2011; Sanna et al., 2016) en los que se pone de manifiesto que la exposición a didesoxicitidina así como a sarín y soman aumenta la expresión del pNF-H.

Tabla20. Resumen de estudios de biomarcadores de neurotoxicidad (S100B) relacionados con la exposición a agentes tóxicos

REFERENCIA	TOXICO	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
(Brvar et al., 2004)	CO	Suero	Lujbiana, Eslovenia	38 / -	Pacientes con intoxicación aguda	↑ S100B	Estudió por separado pacientes conscientes e inconscientes encontrando mayores valores en los segundos. Compararon con valores estándar
(Kessler et al., 2007)	Cocaína	Suero	Brasil	20 / 20	Consumidores crónicos	= S100B	
(Yardan et al., 2009)	CO	Suero	Ankara, Turquía	70 / 20	Pacientes con intoxicación aguda	↑ S100B	Estudió por separado pacientes conscientes e inconscientes encontrando mayores valores en los segundos
(Cakir et al., 2010)	CO	Suero	Turquía	30 / -	Pacientes con intoxicación aguda	↑ S100B	Estudiaron la evolución a las 3 y 6 h (disminuye). Compararon con valores estándar
(Yan et al., 2014)	Ketamina	Suero	Shanghai, China	49 / -	Pacientes cirugía	↑ S100B	Estudio realizado en niños. No hay grupo control. Compararon estado preoperatorio vs. postoperatorio. Dividieron los niños en tres grupos según los ciclos de exposición. Los resultados fueron similares en los tres grupos
(Liu et al., 2014)	Metales	Suero	Guiyu, China	240 / -	Exposición ambiental	↑ S100B	Niños que vivían en un vertedero incontrolado. El nivel de exposición se estableció midiendo niveles de Pb, Cd y Mn
(Yilmaz et al., 2014)	Hg	Suero	Turquía	169 / 45	Alumnos con exposición aguda	↑ S100B	El grupo de expuestos se dividió en 39 con síntomas neurológicos, 52 con pupilas dilatadas y 78 asintomáticos. Encontraron capacidad de discriminar por sintomatología

2.5. Biomarcadores para la evaluación del daño inmunológico

La búsqueda de estudios que evalúen la asociación entre exposición ocupacional a plaguicidas y alteraciones en parámetros inmunológicos se ha llevado a cabo en la base de datos *PubMed* utilizando la siguiente estrategia de búsqueda: (*cytokines OR interleukins OR "growth factors" OR "colony stimulating factors" OR chemokines OR "immunotoxicity" OR "immune system"*) AND (*pesticide OR pesticides*) AND (*"occupational exposure" OR "agriculture workers" OR "agricultural workers"*). Los criterios de selección aplicados fueron: idioma (español e inglés) y especie (humanos), sin restricción temporal. Se obtuvieron 42 artículos de que se seleccionaron 9. Salvo alguna excepción, estos artículos estudian el comportamiento de las interleuquinas, IFN- γ y TNF- α , no habiéndose encontrado estudios que evalúen si la exposición ocupacional a plaguicidas afecta los niveles de quimioquinas, factores de crecimiento o factores formadores de colonias (Tabla 21).

De todos los parámetros inmunológicos examinados en los estudios seleccionados, no se han encontrado variaciones significativas de IL-5 (Costa et al., 2013), IL-17 (Fenga et al., 2014) o GM-CSF (Daniel et al., 1995). Sin embargo, algunos estudios encontraron variaciones significativas de la IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 relacionados con la exposición a plaguicidas. Otro estudio observó una disminución significativa de IL-1 β e IL-10 asociada a la exposición a mancozeb (Colosio et al., 1996). Por su parte, los resultados con la IL-2, IL-4 e IL-6 son contradictorios (Colosio et al., 1996; Corsini et al., 2007, 2005; Costa et al., 2013; Daniel et al., 2002, 2001, 1995; Seldén et al., 2008). Un estudio mostró un descenso significativo de la IL-2 con la exposición a cipermetrina (Costa et al., 2013), mientras que en otros tres la exposición a mancozeb, DDT y diclorodifenildicloroetileno (DDE) se asoció con un aumento de la expresión de IL-2 (Colosio et al., 1996; Daniel et al., 2002). Por su parte, la IL-4 mostró un aumento con la exposición a DDT y DDE y ninguna variación con la exposición a bifenilos policlorados (PCBs) (Seldén et al., 2008). En cuanto a la IL-6, dos estudios observaron una mayor expresión con la exposición a propanil, DDT y DDE (Corsini et al., 2007; Daniel et al., 2002), mientras que otro no encontró ninguna variación significativa con la exposición a PCBs (Seldén et al., 2008).

En el estudio de Costa et al. (2013), la IL-12p70 mostró un descenso asociado a la exposición a cipermetrina. En cuanto al receptor IL-1ra, Daniel et al. (2002) encontraron un aumento significativo asociado con la exposición a DDT y DDE, mientras que en un estudio previo observaron un aumento no significativo con la exposición a mancozeb (Daniel et al., 2001).

En cuanto al IFN- γ y TNF- α , dos parámetros inmunológicos muy estudiados, se encontraron siete estudios en humanos que analizaron el IFN- γ . En uno de ellos se observó un aumento significativo con la exposición de DDT y DDE (Daniel et al., 2002) mientras que en tres no se observó variación significativa con la exposición a pentaclorofenol y mancozeb y PCBs (Corsini et al., 2005; Daniel et al., 1995; Seldén et al., 2008). Tres estudios mostraron un descenso significativo de IFN- γ tras la exposición a pentaclorofenol, hexaclorociclohexano (HCH), propanil y cipermetrina (Corsini et al., 2007; Costa et al., 2013; Daniel et al., 2001). El TNF- α , por el contrario, mostró un descenso asociado con la exposición a mancozeb en un estudio (Corsini et al., 2005), mientras que en otros estudios no se observó variación significativa (Corsini et al., 2007; Costa et al., 2013; Daniel et al., 2001 y 2002; Seldén et al., 2008) con la exposición ocupacional a pentaclorofenol, HCH, PCBs, hexaclorobenceno (HCB), DDT y DDE, propanil y cipermetrina.

Por último, la quimioquina IL-8, al igual que ocurría con IL-2, IL-4 e IL-6, tampoco mostró resultados concluyentes, pues hay estudios en los que la exposición a pentaclorofenol, HCH, PCBs, HCB, DDT y DDE no produjo variaciones significativas (Daniel et al., 2002, 2001) mientras que, por el contrario, un estudio observó un aumento con la exposición a pentaclorofenol (Daniel et al., 1995) y en otro una disminución tras la exposición a cipermetrina (Costa et al., 2013).

Tabla 21. Resumen de los estudios que relacionan los parámetros inmunológicos con la exposición ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADO	REFERENCIA
(Daniel et al., 1995)	Pentaclorofenol (fungicida)	Plasma	Alemania	188 / -	Población expuesta	= IL-2 = IL-4 = IL-6 ↑ IL-8 = IFN-γ = GM-CSF	Estudio no ocupacional. Compararon con pacientes que tenían defectos de estimulación
(Colosio et al., 1996)	Mancozeb (s-CBs)	Plasma	Italia	14 / 13	Trabajadores planta de s-CBs	↓ IL-1β ↑ IL-2	
(Daniel et al., 2001)	Pentaclorofenol, HCH, HCB, PCBs	Plasma	Alemania	141 / -	Población expuesta	= IL-1β = IL-2 = IL-4 = IL-6 = IL-10 = IL-1ra ↓ IFN-γ = TNF-α = IL-8	No estudiaron controles. Cuantificaron la exposición en sangre. El IFN-γ sólo se asoció con el HCB
(Daniel et al., 2002)	DDT, DDE, Pentaclorofenol, HCH, HCB, PCBs	Plasma	Alemania	49 / -	Granjeros	= IL-1β ↑ IL-2 ↑ IL-4 ↑ IL-6 = IL-10 ↑ IL-1ra ↑ IFN-γ = TNF-α = IL-8	No estudiaron controles. Cuantificaron la exposición en sangre. La IL-4 se asoció con DDT y DDE, el resto de marcadores con pentaclorofenol, HCH, HCB, PCBs

Continua →

Tabla 21 (continuación). Resumen de los estudios que relacionan los parámetros inmunológicos con la exposición ocupacional a plaguicidas

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	LUGAR	n	POBLACION	RESULTADO	REFERENCIA
(Corsini et al., 2005)	Mancozeb (s-CBs)	Sangre	Italia	13 / 13	Agricultores	= IL-4 = IFN- γ \downarrow TNF- α	Aumento no significativo de IFN- γ e IL-4. Evaluaron controles y exposición basal con resultados similares
(Corsini et al., 2007)	Propanil	Sangre	Italia	7 / 7	Agricultores	= IL-1 β = IL-4 \uparrow IL-6 \downarrow IL-10 \downarrow IFN- γ = TNF- α	
(Seldén et al., 2008)	PCBs	Plasma	Suecia	36 / 33	Trabajadores de construcción	= IL-2 = IL-4 = IL-6 = IL-10 = IFN- γ = TNF- α	Los niveles de PCBs no se relacionan de manera significativa con los de citoquinas. Los niveles basales y tras exposición son similares
(Costa et al., 2013)	Cipermetrina (PYRs)	Plasma	Ragusa (Italia)	30 / 30	Trabajadores de invernadero	= IL-1 \downarrow IL-2 = IL-4 = IL-5 = IL-6 = IL-10 \downarrow IL-12p70 \downarrow IFN- γ = TNF- α \downarrow IL-8	
(Fenga et al., 2014)	Mezcla	Suero	Sicilia (Italia)	64 / 30	Trabajadores de invernadero	= IL-17	

s-CBs: tiocarbamatos; PYR: piretroides; PCB: policlorobifenilo; HCB: hexaclorobenzeno; HCH: hexaclorociclohexano; DDT: diclorodifeniltricloroetano; DDE: diclorodifenilodictloroetileno

Debido a los pocos estudios que existen sobre exposición ocupacional a plaguicidas y parámetros inmunológicos, se amplió la búsqueda a estudios en animales de experimentación, especialmente roedores, que hayan utilizado una metodología similar a la del presente estudio (*multiplex*) (Tabla 22). Moser et al. (2015) evaluaron el comportamiento de parámetros inmunológicos en ratas tras la administración de piretroides (permetrina y deltametrina), neonicotinoides (imidacloprid), *N*-metilcarbamatos (carbaril), triazoles (triadimefon) y fenilpirazoles (fipronil). Sin embargo, no observaron efectos significativos, o los niveles fueron no detectables, de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , RANTES, b-FGF y GM-CSF. Por el contrario, la administración de dosis altas de carbaril dio lugar a una disminución de IP-10, MCP-1, eotaxina y VEGF. Dosis altas de triadimefon produjeron una disminución de MIP-1 β y dosis altas de deltametrin una disminución de VEGF. La administración de dosis únicas de fipronil se siguió de una disminución de MIP-1 β , pero solo con la dosis más alta; por el contrario, la administración de dosis repetidas de este compuesto dio lugar a un aumento de IP-10 y eotaxina con dosis bajas y de IP-10 con dosis altas. Estos resultados parecen indicar que los plaguicidas producen ciertas alteraciones en la respuesta inflamatoria que podrían afectar también la neuroinmunomodulación (Moser et al., 2015).

Los parámetros inmunológicos también se han utilizado para evaluar los efectos neurotóxicos. Así, Gordon y Ward (2009) administraron clorpirifos o carbaril de forma aguda a ratas por vía oral y después determinaron los niveles de citoquinas y quimioquinas circulantes. A las 24 horas de la dosificación de clorpirifos se produjo una disminución significativa de IP-10, mientras que el carbaril dio lugar a un aumento de IL-10, IP-10 y VEGF. En cambio, a los 7 días de la dosificación ninguno de los biomarcadores mostró cambios significativos. Tampoco encontraron alteraciones significativas en los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12p70, IL-17, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y eotaxina, b-FGF y GM-CSF.

Un estudio del Instituto de Toxicología Ambiental de Japón (Nishino et al., 2013) administró paratión, metoxicloro y el sinergista butóxido de piperonilo por vía oral a ratones y evaluó los niveles de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ y TNF- α) en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos y los de quimioquinas (MIP-1 β y RANTES) en el líquido de lavado broncoalveolar. En todas las muestras de líquido de lavado broncoalveolar de los animales tratados observaron un incremento en los niveles de MIP-1 β y RANTES, lo que sugiere que la exposición a estos compuestos modula el número de eosinófilos y los niveles de quimioquinas, por lo que pueden desempeñar un papel en el desarrollo y gravedad de la inflamación. Por su parte, la exposición previa a compuestos inmunosupresores aumentó la

producción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) por los ganglios linfáticos de forma dependiente de la dosis. La producción de citoquinas Th1 (IFN- γ y TNF- α) también aumentó en los grupos tratados con paratión, metoxicloro y butóxido de piperonilo. Por último, la administración de dosis altas de estos agentes también aumentaron los niveles de IL-10 e IL-17 en ganglios linfáticos, lo que sugiere que la respuesta inmunitaria de células T cooperadoras mejora con la administración de estos compuestos.

Tabla 22. Resumen de los estudios que relacionan los parámetros inmunológicos con la exposición a plaguicidas en animales de experimentación

REFERENCIA	PLAGUICIDA	MUESTRA	RESULTADO		
(Gordon y Ward, 2009)	Clorpirifos, carbaril	Ratas <i>Long-Evans</i> macho adultas	<p>Clorpirifos (24 h) *</p> <p>↓ IP-10</p> <p>Carbaril (24 h) *</p> <p>↑ IL-10</p> <p>↑ IP-10</p> <p>↑ VEGF</p> <p>(*) Tras 24 horas el resto de parámetros permanecen inalterados para ambos</p>	<p>Clorpirifos / carbaril (7 días)</p> <p>= IL-1β</p> <p>= IL-2</p> <p>= IL-4</p> <p>= IL-5</p> <p>= IL-6</p> <p>= IL-7</p> <p>= IL-12p70</p> <p>= IL-17</p> <p>= IFN-γ</p>	<p>= TNF-α</p> <p>= MCP-1</p> <p>= MIP-1α</p> <p>= MIP-1β</p> <p>= RANTES</p> <p>= Eotaxina</p> <p>= b-FGF</p> <p>= GM-CSF</p>
(Nishino et al., 2013)	Paratión, metoxicloro butóxido de piperonilo	Ratones NC/Nga hembra	<p>Lavado broncoalveolar</p> <p>↑ MIP-1β</p> <p>↑ RANTES</p>	<p>Ganglios linfático</p> <p>↑ IL-4</p> <p>↑ IL-5</p> <p>↑ IL-6</p> <p>↑ IFN-γ</p> <p>↑ TNF-α</p>	<p>Ganglios linfático (dosis altas)</p> <p>↑ IL-10</p> <p>↑ IL-17</p>
(Moser et al., 2015)	Permetrina, deltametrina, imidacloprid, carbaril, triadimefon y fipronil	Ratas <i>Long-Evans</i> macho adultas	<p>= IL-1β</p> <p>= IL-2</p> <p>= IL-4</p> <p>= IL-5</p> <p>= IL-6</p> <p>= IL-7</p> <p>= IL-10</p> <p>= IL-12p70</p> <p>= IL-13</p> <p>= IL-17</p> <p>= IFN-γ</p> <p>= TNF-α</p>	<p>= RANTES</p> <p>= MIP-1α</p> <p>= b-FGF</p> <p>= GM-CSF</p> <p>Carbaril</p> <p>↓ IP-10</p> <p>↓ MCP-1</p> <p>↓ Eotaxina</p> <p>↓ VEGF</p> <p>Triadimefon (dosis altas)</p> <p>↓ MIP-1β</p>	<p>Deltametrina (dosis altas)</p> <p>↓ VEGF</p> <p>Fipronil (dosis única, alta)</p> <p>↓ MIP-1β</p> <p>Fipronil (dosis repetida, baja)</p> <p>↑ IP-10</p> <p>↑ Eotaxina</p> <p>Fipronil (dosis repetida, alta)</p> <p>↑ IP-10</p>

Capítulo 4

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

El litoral almeriense, debido a sus características geográficas y climatológicas, se ha convertido en el lugar con mayor densidad de invernaderos a nivel mundial (Pérez-Parra y Céspedes, 2009). El incremento experimentado en las últimas décadas de la superficie invernada en la provincia de Almería (Figura 20) ha conllevado un mayor uso de productos fitosanitarios. Estas circunstancias hacen de la provincia de Almería un “laboratorio natural” idóneo para el estudio de los efectos de los plaguicidas sobre la salud de trabajadores expuestos a lo largo de su vida laboral.



Figura 20. Imagen de satélite de la bahía de Almería donde se puede apreciar la superficie de invernaderos bajo plástico en color verde turquesa (Arriba). *Evolución de la superficie de invernaderos de Almería (tomado del Diario digital de actividad hortofrutícola, de 7-12-2016. Fuente: <http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias-3/noticias/2780-superf-alm-071216>*

El aumento de la superficie dedicada a invernaderos agrícolas se ha observado también en otras localizaciones geográficas a nivel mundial y con el mismo objetivo, alcanzar un mayor rendimiento agrícola, lo que convierte el uso de plaguicidas en un problema global.

La agricultura intensiva de invernadero proporciona unas condiciones ambientales muy particulares de humedad, temperatura y ventilación. Esto origina un microclima en su interior que aumenta el rendimiento de los cultivos pero que, al mismo tiempo, favorece la aparición de plagas. Por esta razón, y para evitar pérdidas económicas, es frecuente el uso de plaguicidas u otros métodos de control de plagas. No obstante, en los últimos años se ha observado en la provincia de Almería un aumento de la superficie de cultivos hortofrutícolas en la que se aplican métodos de control biológico de plagas, lo que contribuye a preservar la salud humana y ambiental.

El uso de plaguicidas, en algunos casos no acorde con las buenas prácticas agrícolas, así como la aparición continua de nuevas formulaciones comerciales ha provocado que cualquier persona pueda estar expuesta a estos compuestos debido a su presencia en el medio ambiente, alimentos y agua de consumo. Al margen de las intoxicaciones agudas, que presentan unos efectos claros y bien definidos, la exposición crónica se ha asociado al desarrollo de ciertas enfermedades de tipo hepático, renal, inmunológico y del sistema nervioso, entre otras. Sin embargo, antes de la manifestación clínica de la enfermedad, los plaguicidas deben alcanzar una concentración determinada en sus órganos diana, produciendo inicialmente alteraciones bioquímicas seguidas de alteraciones funcionales y eventualmente estructurales que desembocan en una enfermedad y, en muchos casos, en un daño irreversible. Las alteraciones fisiopatológicas que se producen en la vía patogénica de estas enfermedades pueden dar lugar a variaciones de una serie de biomarcadores que ayudan a predecir y prevenir la aparición de una enfermedad antes de que se manifieste clínicamente.

Los trabajadores de invernadero, por tanto, presentan una mayor exposición crónica a plaguicidas que otros trabajadores agrícolas y que la población general, razón por la cual los invernaderos constituyen un escenario óptimo para el estudio de los efectos tóxicos en humanos por exposición crónica a plaguicidas. Los resultados obtenidos podrían ser posteriormente extrapolados a otros trabajadores también expuestos a plaguicidas o a la población general siguiendo el criterio toxicológico clásico de relación dosis-respuesta.

La evaluación de los efectos en salud de la exposición crónica a plaguicidas por trabajadores de agricultura intensiva puede llevarse a cabo mediante la determinación de una serie de biomarcadores específicos de órgano que tendrían capacidad predictiva y se alterarían antes de que la afectación se manifieste clínicamente, es decir, a nivel subclínico o preclínico. Uno de los problemas más importantes en este sentido es la evaluación cuantitativa de la exposición a plaguicidas, debido al gran número de sustancias activas presentes en el mercado y que se utilizan con diferentes fines. El uso de biomarcadores de exposición permitiría relacionarlos con indicadores bioquímicos de efecto tóxico precoz en órganos diana (hígado, riñón, sistema nervioso e inmunológico) así como de efecto tóxico inespecífico, como por ejemplo marcadores de estrés oxidativo, esterasas que interaccionan con los plaguicidas (colinesterasas y paraoxonasa-1), etc.

Esto permitiría establecer una relación directa causa-efecto entre la exposición crónica a plaguicidas y determinadas alteraciones funcionales y orgánicas (moleculares, bioquímicas o celulares), antes de que aparezcan los síntomas de enfermedad, tal y como plantea la *National Academy of Sciences* en 2007 (Krewski et al., 2010) sobre el interés de centrarse más en mecanismos patogénicos de toxicidad que en indicadores finales (enfermedades o síntomas).

En caso de obtener resultados significativos y válidos, los biomarcadores podrían aplicarse a programas de vigilancia de la salud de trabajadores expuestos a plaguicidas, cuya finalidad sería la prevención de riesgos tóxicos y evitar el desarrollo de enfermedades durante su vida laboral.

2. HIPÓTESIS

La exposición crónica (continua o discontinua) a plaguicidas en trabajadores de agricultura intensiva de invernadero aumenta el riesgo de sufrir alteraciones de la salud a largo plazo. No obstante, estos efectos adversos van precedidos de una afectación a nivel bioquímico de los órganos diana (hígado, riñón, sistema nervioso y sistema inmunológico, entre otros). Por eso, la eventual afectación orgánica puede evaluarse precozmente mediante la determinación de biomarcadores de respuesta tóxica específica de órganos así como a través de cambios no específicos en las actividades de enzimas que interaccionan con plaguicidas (esterasas) o de biomarcadores de estrés oxidativo que suelen producir muchos plaguicidas. Por tanto, el estudio de determinados biomarcadores, tanto órgano-específicos como inespecíficos, permite evaluar la afectación que los plaguicidas producen sobre la salud a nivel bioquímico en el marco del paradigma de la evaluación de la toxicidad en el siglo XXI propiciado por la *National Academy of Sciences*.

3. OBJETIVOS

En base a lo expuesto en los dos apartados anteriores, los objetivos que se persiguen con este estudio son:

General:

- Determinar en qué grado la exposición a plaguicidas en un entorno de agricultura intensiva de invernadero produce alteraciones de la salud capaces de determinarse mediante biomarcadores de efecto o respuesta tóxica.

Específicos:

- Identificar dos grupos de población bien definidos: uno formado por trabajadores de invernadero del litoral de Almería expuestos a plaguicidas y otro por trabajadores no expuestos que sirva de control procedente de la misma zona geográfica.
- Evaluar el nivel de exposición mediante la determinación de metabolitos de plaguicidas OPs (DAPs), piretroides (3-PBA) y neonicotinoides (6-CNA) en orina y la actividad colinesterasa plasmática (BeChE y BuChE) y eritrocitaria (AChE) en muestras de sangre de ambos grupos de población.
- Determinar biomarcadores de estrés oxidativo (FRAS, TBARS, SHT y GGT) y paraoxonasa-1 (PON1) así como otros biomarcadores específicos de órgano en fluidos biológicos de la población de estudio. Dentro de estos últimos se estudiarán biomarcadores de daño hepático (ALT, AST, ALP, GGT, arginasa I, OTC y GST- α en suero), renal (creatinina y cistatina C en suero y albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, OPN y TFF3 en orina), neurológico (S100B y pNF-H en suero) e inmunológico (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en suero).
- Evaluar si los biomarcadores de exposición y de respuesta tóxica seleccionados muestran diferencias en las dos poblaciones de estudio (trabajadores de invernadero y controles).

Capítulo 5

MATERIALES Y METODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

1.1. Diseño del estudio

En este estudio se ha utilizado un diseño mixto correspondiente a un estudio transversal (observacional de carácter analítico) con un componente longitudinal, ya que la población de estudio se evaluó en dos periodos de tiempo diferentes.

1.2. Reclutamiento de individuos

Este estudio se ha llevado a cabo en dos grupos de trabajadores de la provincia de Almería, reclutados en entre abril y noviembre de 2011. El primer grupo está formado por trabajadores de agricultura intensiva de la zona de El Poniente (El Ejido) que desempeñan su actividad laboral en el interior de invernaderos bajo plástico en los que con frecuencia se realizan aplicaciones con plaguicidas. El segundo grupo corresponde a los controles y está constituido por trabajadores de empresas de Almería que no presentan exposición ocupacional a fitosanitarios ni a ningún otro agente químico. Del estudio se excluyeron aquellos individuos enfermedades graves y/o crónicas del hígado, riñón, sistema nervioso, procesos inflamatorios o tumores, diagnosticadas clínicamente antes de comenzar el estudio.

Los participantes fueron reclutados por el personal sanitario de la Delegación Provincial de Salud de Almería. Inicialmente se contactó con los trabajadores agrícolas a través de cooperativas agrarias con objeto de explicarles los objetivos del estudio. Los controles, en cambio, se reclutaron en el momento de acudir a su evaluación anual de salud laboral en el Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Almería. Todos los participantes, tras ser informados sobre las características del estudio, se ofrecieron voluntariamente a participar en el mismo y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

El grupo de expuestos estaba formado por 189 trabajadores de invernadero (106 hombres y 83 mujeres) de la zona del Poniente Almeriense, donde unas 18 mil hectáreas se dedican a la agricultura intensiva en invernaderos de plástico. La actividad laboral de estos trabajadores consiste en la poda, deshierbe, aclareo y aplicación de plaguicidas. Durante el periodo de estudio los cultivos que se llevaron a cabo en los invernaderos fueron tomate, pepino y calabacín. De los

189 trabajadores reclutados, 77 participaron en ambos periodos de estudio (alta y baja exposición), 39 solamente en el de baja exposición y 73 en el de alta exposición.

El grupo control estaba compuesto por 91 sujetos sanos (25 hombres y 66 mujeres), pertenecientes a la población general no agricultora de las mismas zonas de estudio y con similares características socioeconómicas, culturales y educativas pero que no presentaban exposición ocupacional a plaguicidas ni a ningún otro agente químico. Con ello se pretendía que la exposición basal a plaguicidas (de origen ambiental o nutricional) fuese lo más similar posible con la de los expuestos. De los 91 controles, 66 participaron en ambos periodos de estudio (alta y baja exposición) y 25 en el de baja exposición.

En función de otros estudios llevados a cabo en la misma zona de estudio, y siguiendo el asesoramiento de ingenieros agrónomos, se escogieron dos periodos de estudio con diferente grado de exposición a plaguicidas: uno de baja exposición, correspondiente a abril/mayo de 2011 y otro de alta exposición, correspondiente a noviembre/diciembre de 2011. No fue posible escoger un periodo con ausencia total de exposición ya que en agricultura intensiva se realiza un uso frecuente aunque discontinuo de plaguicidas con objeto de obtener varias cosechas al año. Los plaguicidas más utilizados para los cultivos descritos y la fecha del estudio se enumeran en la Tabla 23 (García-García et al., 2016).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Granada (referencia 29/2009). Todos los participantes firmaron la hoja de consentimiento informado una vez se les explicaron los objetivos del estudio.

Tabla 23. Plaguicidas utilizados con mayor frecuencia en los invernaderos de la zona de estudio bajo un sistema de producción integrada de plagas

Sustancia activa	Acción específica	Grupo Químico	Cosecha
Abamectina	Insecticida	Lactona Macroclícica	Calabacín
Spinosad	Insecticida	Lactona Macroclícica	Calabacín, Tomate
Spiromesifen	Insecticida	Ácido Tetrónico	Tomate
Bacillus Thuringiensis	Insecticida	Biológico	Tomate
Metomilo	Insecticida	Metil-Carbamato	Tomate
Imidacloprid	Insecticida	Neonicotinoides	Tomate
Acetamiprid	Insecticida	Neonicotinoides	Calabacín
Cipermetrina	Insecticida	Piretroides	Tomate
Deltametrina	Insecticida	Piretroides	Tomate, Calabacín
Indoxacarb	Insecticida	Oxadiazón	Tomate, Calabacín
Azadiractina	Insecticida	Tetranortriterpenoide	Calabacín
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	Calabacín
Triadimenol	Fungicida	Triazol	Calabacín
Miclobutanil	Fungicida	Triazol	Pepino, Tomate
Ciprodinil	Fungicida	Anilino-Pirimidina	Pepino, Tomate
Mepanipirim	Fungicida	Anilino-Pirimidina	Tomate
Pirimetanil	Fungicida	Anilino-Pirimidina	Tomate
Fludioxinil	Fungicida	Fenil Pirrol	Pepino
Clortalonil	Fungicida	Benzonitrilo Halogenado	Pepino
Fluopicolida	Fungicida	Benzamida	Pepino
Propamocarb	Fungicida	Carbamato	Pepino
Oxicloruro de Cobre	Fungicida	Sales de Cobre	Tomate
Dimetomorf	Fungicida	Morfolina	Tomate, Calabacín
Azoxistrobin	Fungicida	Metoxiacrilato de estrobilurina	Tomate
Metil-Tiofanato	Fungicida	Benzimidazol	Tomate

A toda la población de estudio se les realizó un examen médico laboral por parte del personal sanitario, acompañado de una anamnesis y exploración física dirigidas específicamente a detectar síntomas o signos derivados de la exposición crónica a plaguicidas. Para ello se les administró un cuestionario estructurado (Anexo 1), usado previamente en otros estudios y basado en el protocolo de plaguicidas del Consejo Interterritorial de la Salud de 1999. Dicho cuestionario incluye variables de tipo ocupacional (años de exposición, plaguicidas con los que trabaja, utilización de equipos de protección individual,...), variables de tipo sociodemográficas

(edad, sexo, talla, peso,...) y variables de estilo de vida (consumo de alcohol o tabaco, hábitos dietéticos,...).

El tamaño de la muestra se calculó en estos términos con el fin de poder alcanzar una potencia estadística del 80% para un error α de 0,05, lo que detectaría diferencias entre controles y expuestos de 25 U/l de actividad paraoxonasa-1 basal.

1.3. Recogida y tratamiento de muestra

En el mismo momento en que se realizaba la historia clínico-laboral y el examen físico a la población de estudio, se procedió a la toma de muestras biológicas. Para ello, en el caso de los trabajadores, el personal responsable se desplazó a primera hora de la mañana, entre las 8:30 y las 11:00, a los invernaderos. Por otro lado, con los controles se procedió de manera similar pero en el Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Almería. En ambos grupos de población, las muestras de sangre fueron tomadas por venopunción tras un periodo de ayuno de 10 horas previas al examen médico. Las muestras recogidas fueron:

- Un tubo de hemograma con EDTA donde, tras realizar el hemograma, se tomó una alícuota de sangre total y el resto se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener 2 alícuotas de plasma de 0.75 ml.
- Un tubo de bioquímica en el que, tras centrifugar 10 minutos a 3500 rpm, se tomaron 5 alícuotas de 1 ml suero.
- Una muestra de orina, de las cuales se tomaron 2 alícuotas de 10 ml en tubos *Falcon* y otras 2 alícuotas de 1 ml en tubos *Eppendorf*.

En la población expuesta, una vez tomadas las muestras, se dispusieron en neveras portátiles sumergidas en hielo, para su posterior traslado al laboratorio Avivar, en Almería, donde se les realizó un análisis bioquímico estándar (glucosa, urea, creatinina, triglicéridos, colesterol, AST, ALT, GGT y fosfatasa alcalina en suero y creatinina en orina). Al mismo tiempo se dividieron en alícuotas y se trasladaron a la Universidad de Almería en neveras portátiles sumergidas en hielo, donde permanecieron almacenadas a una temperatura de -40 °C hasta el traslado al laboratorio de Toxicología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, donde se almacenaron a -20 °C hasta el momento en de su análisis, un tiempo siempre inferior a 1-2 semanas. En el caso de los controles, las muestras se recogieron y alicuotaron en el mismo Centro de Prevención de Riesgos

Laborales de Almería, trasladándose a continuación a la Universidad de Almería donde quedaron almacenados en las condiciones descritas anteriormente para los trabajadores.

Según el tipo de muestra, los ensayos que se realizaron fueron (Tabla 24):

Tabla 24. Biomarcadores analizados en este trabajo según el tipo de muestra y la técnica empleada

Tipo de muestra	Técnica	Biomarcador
Sangre total	Espectrofotometría UV-VIS	Hemoglobina y AChE
	Autoanalizador	Hemograma completo
Plasma	Espectrofotometría UV-VIS	BeChE y OTC
	UHPLC-QqQ-MS/MS	DAPs
	ELISA	Cistatina C, GST- α , arginasa I, pNF-H y proteína S100B
Suero	Multiplex	Parámetros inmunológicos
	Autoanalizador ILAB 600	Creatinina, ALT, AST, GGT y ALP
	Espectrofotometría UV-VIS	SHT, FRAS, BuChE y PON1
	HPLC-FD	TBARS
Orina	Autoanalizador	Creatinina y sedimento
	Multiplex	Albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, osteopontina y TFF3

2. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Todas las determinaciones espectrofotométricas se han llevado a cabo con un espectrofotómetro para UV/VIS Perkin Elmer Lambda 2 (*Norwalk, EE.UU.*) con un rango de longitud de onda de medida entre 190 nm y 1100 nm y provisto con un carrusel de seis cubetas termostatzado. Además, el equipo está conectado a un equipo informático y controlado por un software informático, UV WinLab, que permite no solo la automatización del proceso de lectura, sino también la monitorización a lo largo del tiempo que dure el ensayo enzimático.

El resultado de la determinación de la actividad catalítica (Z) de un enzima se expresa en unidades de actividad referida al peso o al volumen. Una unidad internacional de actividad enzimática (U) se define como la actividad enzimática que convierte 1 μ mol de sustrato en un minuto en las condiciones óptimas indicadas de ensayo. Para medir la velocidad de conversión

del sustrato o la acumulación del producto generalmente se usa el cambio en la concentración por unidad de tiempo (min).

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$c (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times b}$$

La actividad catalítica (Z) de un enzima, por su parte, en un volumen de ensayo (V) estará de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Z (U/ml) = \frac{\Delta c \times V}{\Delta t} = \frac{\Delta DO \times V}{\epsilon \times b \times \Delta t} = \frac{(\Delta DO / \Delta t) \times V}{\epsilon \times b}$$

donde,

$\Delta DO / \Delta t$ = variación de absorbancia (densidad óptica) por minuto.

V = Volumen del ensayo (ml).

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$).

b = Paso óptico de la cubeta (10 mm).

t = tiempo (min).

Para la determinación de la actividad enzimática en una muestra problema hay que tener en cuenta que el volumen de ensayo es la relación entre el volumen final de la determinación (v_f) y el volumen de la muestra problema (v_m) expresado en ml. Además, puesto que las cubetas usadas han sido de 1 cm de paso óptico, la ecuación anterior resulta finalmente:

$$Z (U/ml) = \frac{(\Delta DO / \Delta t) \times v_f}{\epsilon \times 10 \times v_m}$$

3. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN POR HPLC

Las técnicas cromatográficas son un grupo de técnicas analíticas instrumentales basadas en la separación del analito previamente a su cuantificación. En ellas, los componentes de una mezcla, entre los que se encuentra el analito, se distribuyen de manera diferente entre dos fases inmiscibles, una fija (estacionaria) y otra móvil. Dentro de este grupo de técnicas se encuentra

la cromatografía líquida, que se caracteriza porque la fase móvil es un líquido.

La cromatografía líquida más representativa es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se basa en las interacciones específicas de los componentes de la muestra entre dos fases: una fase estacionaria (formada por lo general por gel de sílice finamente dividido) empaquetada en una columna de acero inoxidable y una fase móvil líquida que, además, se encarga de eluir la muestra. Para conseguir una velocidad de flujo adecuada, la fase móvil se somete a una presión elevada mediante un sistema de bombas, de ahí que también se denomine cromatografía líquida de alta presión, utilizando el mismo acrónimo.

Un equipo de HPLC (Figura 21) consiste en uno o varios reservorios de disolventes de diferente polaridad (fase móvil) que se mezclan en la proporción deseada, una bomba que mueve la fase móvil y la muestra a través del sistema, un inyector de muestra, una columna que contiene la fase estacionaria, un detector que nos permite visualizar la separación de los componentes y un recipiente de residuos. De un modo esquemático:

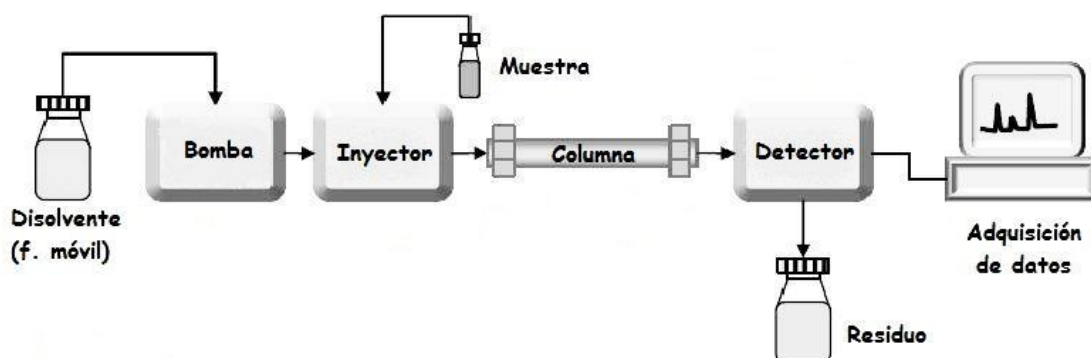


Figura 21. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Fuente: (Skoog et al., 2001) (editada)

La muestra se inyecta a través de un inyector, generalmente en bucle que evita pulsos en el flujo y, gracias a la fase móvil, es transportada hasta la columna que contiene el gel de sílice. La fase móvil (eluyente) puede estar constituido por uno o varios disolventes que se mezclan automáticamente en una cierta proporción previamente programada y se mueve a través del sistema gracias a una bomba que le proporciona una presión y un flujo adecuado para la separación, que se programa previamente. Además los equipos de HPLC suelen incorporar un sistema de desgasificación y de purga para eliminar las burbujas de aire del sistema.

El elemento diferencial de los equipos de HPLC es el detector. La utilización de un detector u

otro dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar y del límite de detección que este posea. En la tabla 25 se expresan los detectores más habituales que suelen acoplarse a los equipos de HPLC, así como sus límites de detección característicos (orientativos, ya que dependen del compuesto, el instrumento y las condiciones cromatográficas).

Tabla 25. Detectores más habituales en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Fuente: (Skoog et al., 2001)

Absorbancia	10 pg
Fluorescencia	10 fg
Electroquímicos	100 pg
Conductividad	100 pg – 1 ng
Espectrometría de masas	< 1 pg

Para el presente estudio se han utilizado dos equipos de HPLC diferentes. El primero, con el que se han determinado las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), emplea un detector de fluorescencia. El segundo, con detector de masas en tándem con triple cuadrupolo, ha sido el empleado para el análisis de metabolitos de plaguicidas.

4. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN POR ELISA

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) son un tipo de inmunoensayos basados en la reacción específica entre un antígeno (que generalmente es el analito) y su anticuerpo (que suele estar marcado enzimáticamente), los cuales son inmovilizados sobre un soporte. El hecho de que sean adsorbidos sobre una superficie facilita la separación entre el antígeno unido al anticuerpo, de forma, que cuando añadamos el sustrato específico de la enzima que hemos utilizado para marcar nuestro anticuerpo o antígeno, producirá un color cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

En la actualidad nos encontramos con diferentes tipos de ensayos ELISA: directos, indirectos, tipo sándwich, competitivo,... De todos ellos los ensayos que hemos llevado a cabo aquí han sido ELISA tipo sándwich (Figuras 22 y 23). De una manera genérica, los pocillos se recubren con un primer anticuerpo llamado de anticuerpo de captura o anticuerpo primario. Posteriormente se

aplica la muestra problema, en la que se encuentra el antígeno (analito), que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el anticuerpo de captura. Tras un lavado que elimina el material no retenido, se añade una solución con un segundo anticuerpo llamado en este caso de detección o secundario, el cual se une de manera específica al antígeno retenido en el pocillo. En el paso siguiente, se añade un conjugado de estreptavidina con la enzima HRP (peroxidasa de rábano), el cual se une al anticuerpo de detección, gracias a la unión entre la estreptavidina y la biotina que lleva unida el anticuerpo secundario (reacción de biotinación).

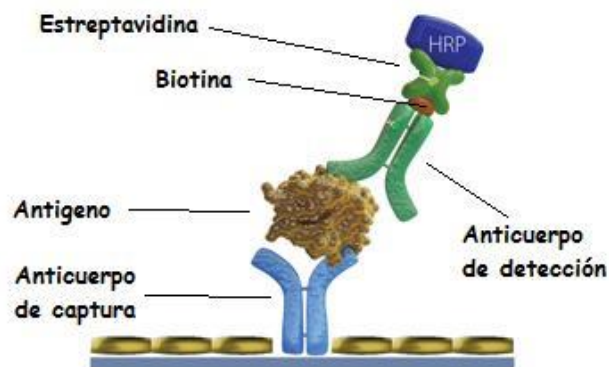


Figura 22. Reacción de biotinación típica de los ensayos tipo ELISA, donde el anticuerpo de detección que lleva acoplado una molécula de biotina se une al antígeno para, posteriormente en una segunda etapa, unirse con la estreptavidina que lleva unida la enzima HRP. Fuente: Affymetrix e Bioscience (editada)

En algunos casos nos encontramos que el anticuerpo de detección está ya unido al conjugado en lo que se denomina disolución de conjugado o simplemente conjugado.

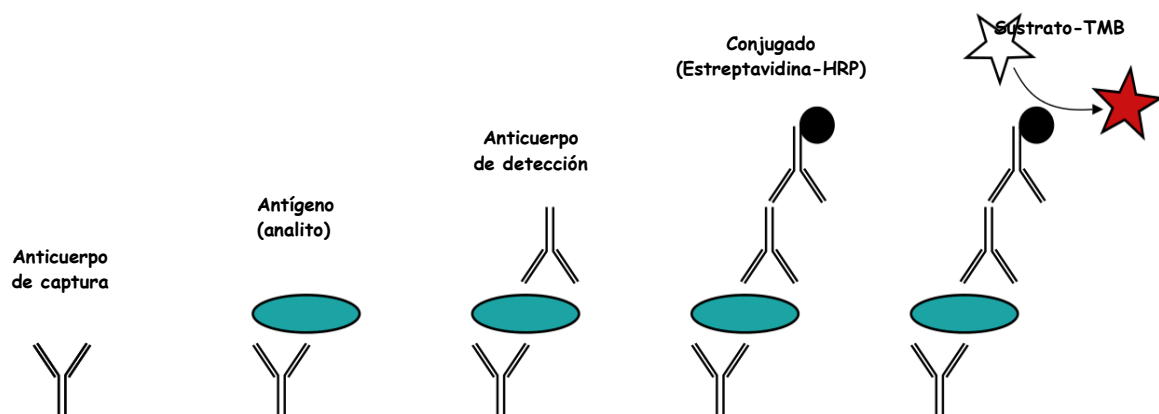


Figura 23. Principios del ensayo ELISA tipo sándwich. En él cada pocillo se recubre de un anticuerpo. Después, tras dispensar la muestra en la que se encuentra el antígeno (analito), se adiciona el anticuerpo de detección marcado, que se unirá al complejo previamente formado antígeno-anticuerpo para finalmente ser detectado por espectrofotometría UV-VIS. Fuente: Wikipedia (editada).

Por último, la enzima que se usa como marcador (HRP) se convierte en medible (mediante espectrofotometría UV-VIS) por adición de su sustrato H_2O_2 - TMB (H_2O_2 - Tetrametilbencidina

según se indica en la reacción siguiente (Figura 24):

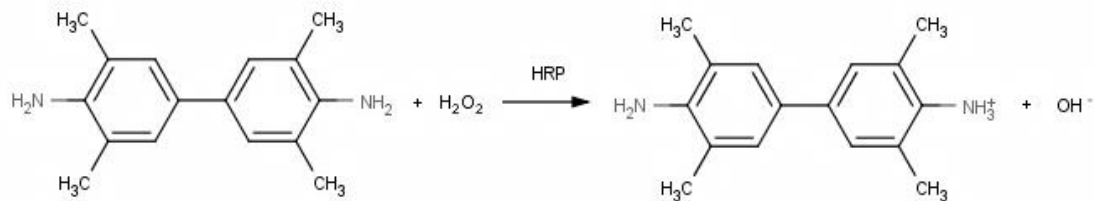


Figura 24. Reacción de revelado en un ensayo ELISA tipo sándwich

Para llevar a cabo las determinaciones ELISA hemos empleado una estación de trabajo Triturus (*Grifols, Barcelona, España*) totalmente automatizada para el desarrollo y detección de inmunoensayos, con capacidad multianálisis (diferentes análisis sobre una misma muestra) y multiserie (diferentes ensayos independientes consecutivos). Este equipo consta de una incubadora con capacidad para cuatro placas y una temperatura programable que puede alcanzar los 50 °C, una estación automática de lavado con ocho canales y un lector de placas con un rango dinámico de dispersión óptica entre 0 y 3 con longitudes de onda preestablecidas de 405, 450, 492 550, 600, 620 nm más una longitud de onda a elección del operador. Todo esto se controla a través de un software *Triturus Analyzer*.

5. PRINCIPIOS DE LA DETERMINACIÓN MULTIPLEX

La técnica *Multiplex* es un tipo de inmunoensayo múltiple basada en la tecnología xMAP, que se centra en el uso de microesferas de poliestireno (5-6 micras), magnéticas o no, y que mezcla fundamentos de la citometría de flujo y de las técnicas de ELISA tipo sándwich, a la vez que aprovecha las bondades del uso de laser o del procesamiento digital de la imagen (Zhang et al., 2014).

El elemento fundamental de la tecnología xMAP son las microesferas, en nuestro caso microesferas magnéticas (Figura 25). Cada conjunto de microesferas está marcada internamente con distintas proporciones de dos fluoróforos diferentes (tintes fluorescentes), creando así un código de colores único (a lo que se denomina región). En función del ratio entre ambos fluoróforos, las esferas pueden ser discriminadas unas de otras.

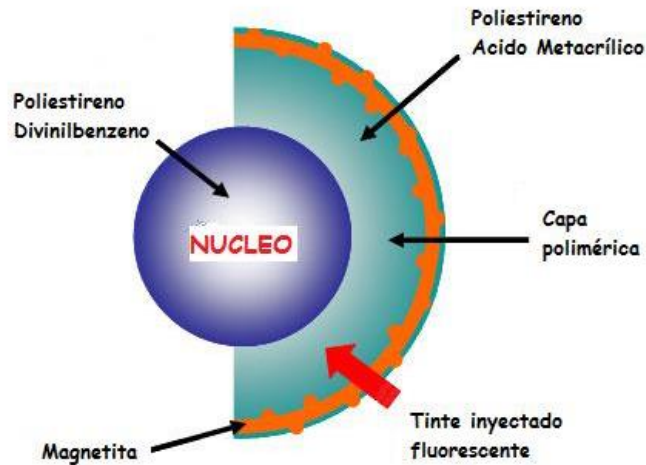


Figura 25. Esquema de la estructura interna de una microesfera magnética empleada para los ensayos Multiplex. Fuente: Bio-Rad (editada)

A su vez, cada microesfera se encuentra cubierta de un anticuerpo de captura específico diferente para cada región, de tal forma que, cuando añadimos la muestra a las microesferas, estas capturan el analito de interés (Figura 26). A continuación, al introducir el anticuerpo de detección marcado con estreptavidina-ficoeritrina, se une al analito en cuestión (biomarcador de interés).

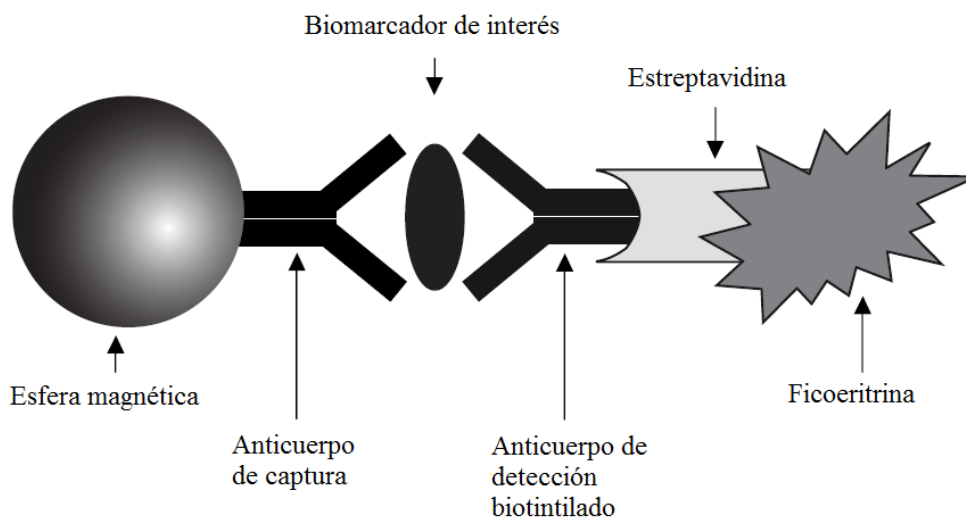


Figura 26. Esquema de un inmunoensayo Multiplex tipo Sandwich mediante el uso de microesferas magnéticas. Fuente: Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays. Instruction Manual. Bio-Rad (editada).

Para la determinación de las microesferas se ha utilizado un citómetro de placas Luminex 200, (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) controlado por el software Xponent 3.1. Este equipo (Figura 27) consta de una parte informática que controla el proceso de análisis, un sistema de

suministro continuo de fluido y un analizador, donde se encuentra tanto la plataforma de placas, como los láseres de excitación (532 nm que excita la ficoeritrina y 635 nm que excita los tintes de las esferas magnéticas), la célula de flujo y los diferentes detectores.

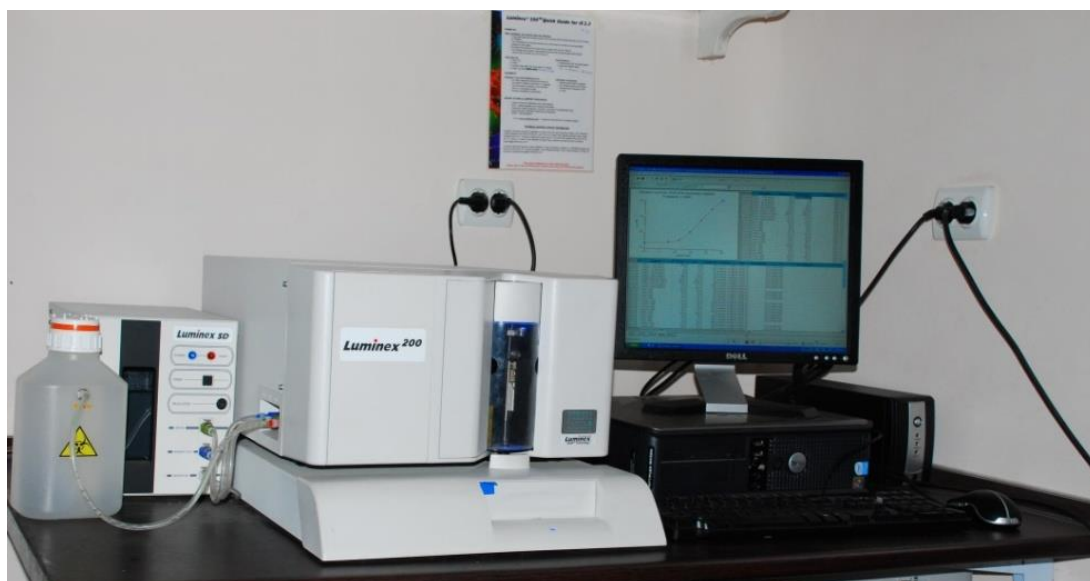


Figura 27. Equipo Luminex 200 utilizado para la determinación Multiplex. El sistema está constituido por el analizador, el soporte informático (software y PC) y un sistema de suministro de fluido

Las muestras, una vez procesadas de manera similar a como se hace para las técnicas ELISA y en las que encontramos las microesferas unidas al antígeno correspondiente según la región, se llevan al analizador Multiplex. Allí se hacen pasar por un capilar denominado célula de flujo (Figura 28), que hace que las microesferas pasen de una en una.

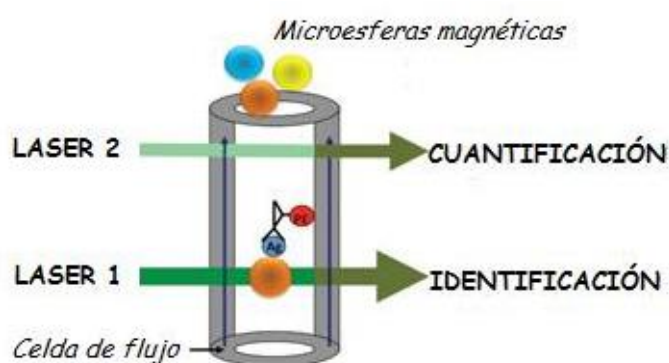


Figura 28. Esquema de una célula de flujo de un equipo Multiplex. En él se pueden identificar los dos laser: el primer que permite identificar el tipo de microesfera según el código de colores asignado (y por tanto saber de qué biomarcador estamos hablando) y el segundo laser, que nos indica en cada esfera la proporción de analito unido al anticuerpo, gracias a la unión del trazador (ST-PE). Fuente: American Association for Clinical Chemistry (editada).

Al mismo tiempo, las esferas son excitadas por dos láseres (Figura 29) con distinta longitud de onda, y detectadas por una serie de cuatro detectores: uno que mide la intensidad de fluorescencia del ensayo, otros dos que determinan el tipo de microesfera (su región) y el último que permite discriminar si la esfera es única o se encuentra en forma de agregados. De esta forma se detectan, en una sola lectura, tanto el tipo de microesfera (cada una de ellas clasificada de acuerdo al ratio de su marcaje interno como se ha mencionado anteriormente) como la cantidad de anticuerpo de detección marcado unido a la misma.

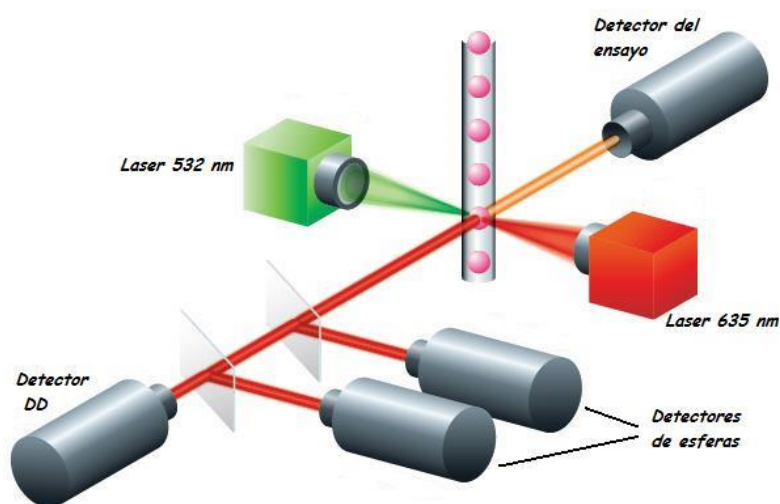


Figura 29. Sistema de excitación y detección de un equipo Multiplex. Fuente: Affymetrix Panomics (editada)

Por último, para el lavado de las placas, se ha utilizado una estación de lavado magnética (Figura 30). Esta se caracteriza porque permite vaciar el contenido de cada uno de los pocillos de la placa sin que se pierdan las bolas magnéticas, ya que quedan atraídas en su interior gracias a los potentes imanes de los que consta.



Figura 30. Estación de lavado empleada en la técnica Multiplex con esferas magnéticas. Fuente: Bio-Rad

En la actualidad, el uso de esta técnica se extiende desde perfiles de expresión de proteínas (cáncer y marcadores metabólicos, citoquinas, factores de crecimiento, metaloproteínas, factores de transcripción y receptores nucleares,...) investigación en genómica (perfiles de expresión de genes, genotipos y *array* de microRNA), enfermedades genéticas (fibrosis quística y variantes de citocromos P450) e inmunodiagnóstico (alergia y pruebas de vacunas, enfermedades autoinmunes, test para HLA, enfermedades infecciosas y *screening* neonatal).

6. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS OPs

Los residuos de plaguicidas OPs se pueden determinar en muestras puntuales de orina. Estas constituyen un “sustituto” apropiado de muestras de orina de 24 horas debido a su alta correlación, según el estudio de validación realizado previamente por (Scher et al., 2007). La Tabla 26 muestra los plaguicidas OPs registrados por la EPA y sus seis metabolitos dialquil fosfatos (DAPs).

Tabla 26. Plaguicidas OPs registrados por la EPA y sus potenciales metabolitos dialquil fosfatos (DAPs). Fuente: http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_01_02/l26pp_b_met_organophosphates.pdf. (DMP: dimetil fosfato; DMTP: dimetil tiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietil fosfato; DETP: dietil tiofosfato; DEDTP: dietil ditiofosfato)

Plaguicida	DMT	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
<i>Azinfos-metilo</i>	X	X	X			
<i>Cloretoxifos</i>				X	X	
<i>Clorpirifós</i>				X	X	
<i>Clorpirifós metilo</i>	X	X				
<i>Cumafos</i>				X	X	
<i>Diclorvos (DDVP)</i>	X					
<i>Diazinon</i>				X	X	
<i>Dicrotofos</i>	X					
<i>Dimetoato</i>	X	X	X			
<i>Disulfoton</i>				X	X	X
<i>Etion</i>				X	X	X
<i>Fenitrotion</i>	X	X				
<i>Fention</i>	X	X				
<i>Isazafos metilo</i>	X	X				
<i>Malation</i>	X	X	X			
<i>Metidation</i>	X	X	X			
<i>Metil-paration</i>	X	X				
<i>Naled</i>	X					
<i>Oxidemeton metilo</i>	X	X				
<i>Paration</i>				X	X	
<i>Forato</i>				X	X	X
<i>Fosmet</i>	X	X	X			
<i>Piridimifos metilo</i>	X	X				
<i>Sulfotep</i>				X	X	
<i>Temefos</i>	X	X				
<i>Terbufos</i>				X	X	X
<i>Tetraclorvinfos</i>	X					
<i>Triclorfon</i>	X					

Las muestras de orina, tras su recogida, fueron almacenadas en frío (2-3° C) y transportadas hasta el Laboratorio del área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Almería. A partir de tales muestras se prepararon alícuotas de 5 ml y se almacenaron a -40 °C hasta el momento de su análisis. Posteriormente se remitieron estas muestras al Laboratorio Analítico Bioclínico (LAB, una *spin-off* de la Universidad de Almería) que está acreditado con número de expediente AC0153ACTA y reconocido como laboratorio autorizado (A.359/I) y acreditado (AC.463/III) por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía.

En LAB se analizaron las concentraciones urinarias de dialquil fosfatos (metabolitos de plaguicidas organofosforados) y una serie de metabolitos ácidos (ácido 3-fenoxibenzoico – 3PBA–, metabolito común de piretroides y ácido 6-cloronicotínico –6CNA– metabolito común de los neonicotinoides de primera generación, entre ellos imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid). Los metabolitos analizados en el presente estudio se resumen en la tabla 27.

Se utilizó un procedimiento optimizado para la extracción simultánea de plaguicidas polares y no polares en muestras de orina (Cazorla-Reyes et al., 2011). Para ello se utilizaron cartuchos Sep-Pak C18 (500 mg), previamente acondicionados con 4 ml de diclorometano, seguido de 4 ml de agua Milli-Q, evitando que el cartucho se seque. A continuación se añadieron 5 ml de agua Milli-Q a un volumen de 5 ml de orina, el cual se hizo pasar por los cartuchos acondicionados sin aplicar vacío. Los cartuchos se dejaron secar al vacío durante dos horas. Posteriormente, los analitos retenidos se eluyeron con 5 ml de diclorometano y los extractos se evaporaron al vacío mediante un rotavapor a 40 °C. El residuo obtenido se disolvió en 2 ml de solución de acetato de etilo que contenía el estándar interno (0.5 mg/l). Se tomó 1 ml directamente para el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem con trampa de iones (GC-IT-MS/MS), mientras que otro mililitro se tomó y se evaporó bajo una ligera corriente de nitrógeno. Por último, el extracto concentrado se redisolvió en 1 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de metanol y una solución acuosa de ácido fórmico (0.01%, v/v), antes del análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución asociada a un tándem de masas con triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).

El límite de detección fue de 1 µg/L para la totalidad de compuestos estudiados. Asimismo, las concentraciones de creatinina en las muestras de orina correspondientes a ambos periodos de estudio se determinaron método de Jaffe en el laboratorio AVIVAR S.L. de Almería y sus resultados se expresaron en mg/dL.

Tabla 27. Resumen de metabolitos analizados en el estudio

PLAGUICIDAS	METABOLITOS
OPs	Dialquil fosfatos (DAPs): Dimetil fosfato (DMP); Dietil fosfato (DEP); Dimetil tiofosfato (DMTP); Dietil tiofosfato (DETP); Dimetil ditionfosfato (DMDTP) y Dietil ditionfosfato (DEDTP) Malation ácido monocarboxílico Malation ácido dicarboxílico
Piretroides	Ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) Ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxílico
Neonicotinoides	Ácido 6-Cloronicotínico

Las concentraciones de metabolitos en orina se expresaron en nmol/L, µg/L y µg/g creatinina. En muchas ocasiones, y con fines prácticos, los niveles de DAPs se expresan no de manera individual sino como una sumatoria de las concentraciones de los 6 metabolitos analizados, indicándose como Σ DAPs, o sumatoria de los metabolitos metilos (Σ DMs) o etilos (Σ DEs). Para ello es necesario expresar las concentraciones individuales en nmol/l, siendo esta la unidad de expresión de Σ DAPs, Σ DMs y Σ DEs.

7. DETERMINACIÓN DE ESTERASAS

Las esterasas son un grupo de enzimas hidrolasas, que hidrolizan enlaces de tipo éster para dar lugar a un alcohol y un ácido. Poseen una especificidad muy baja y tiene un papel importante en los procesos de detoxificación.

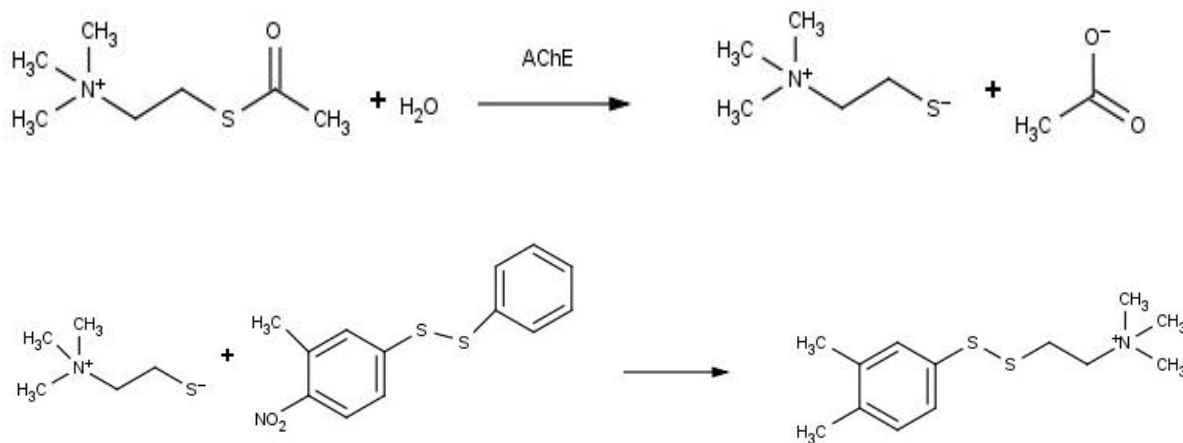
Desde un punto de vista toxicológico, las esterasas se pueden clasificar en dos grandes grupos: A-esterasas y las B-esterasas (Aldridge, 1953). Las A-esterasas son un grupo de enzimas que son capaces de hidrolizar una gran variedad de ésteres con grupos arilo, incluyendo a los organofosforados, por lo que desempeñan un papel muy importante en su proceso de detoxificación. Se caracterizan por tener un residuo de cisteína en su centro activo, que al unirse al plaguicida OP genera un enlace reversible P-S que se puede hidrolizar con facilidad, recuperando de este modo la enzima. El ejemplo más representativo de este tipo de esterasas es la enzima paraoxonasa-1 (PON1).

Por otro lado, las B-esterasas son enzimas que hidrolizan ésteres con radicales alquilo. Poseen un residuo de serina en su centro activo que da lugar a enlaces P-O al unirse con compuestos organofosforados, enlaces que no se hidrolizan y que por tanto generan una inhibición irreversible. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas colinesterasas y las carboxilesterasas.

7.1. Determinación de actividades B-Esterasas (Colinesterasas, ChE)

7.1.1. Acetilcolinesterasa (AChE). EC 3.1.1.7

La actividad AChE se determinó según el método propuesto por Worek (Worek et al., 1999) basándose en el método de Ellman (Ellman et al., 1961). Este método consiste en la determinación de la actividad de la enzima colinesterasa eritrocitaria en sangre lisada por congelación, usando etopropazina como inhibidor específico de la colinesterasa plasmática. La reacción colorimétrica monitoriza la tasa de formación de tiocolina que se produce como consecuencia de la hidrólisis de la acetiltiocolina, que posteriormente reacciona con el DTNB generando un anión amarillo, el 5-tio-2-nitrobenzoato, que se puede medir a 410 nm.



Reactivos

- Tampón fosfato 100 mM, pH 7,0: Na₂HPO₄·12H₂O (Merck, p.a.) y NaH₂PO₄·2H₂O (Merck, p.a.).
- Tampón fosfato 100 mM, pH 8,0: Na₂HPO₄·12H₂O (Merck, p.a.) y NaH₂PO₄·2H₂O (Merck, p.a.).
- Solución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma, p.a.) 10 mM en tampón fosfato 100 mM y pH 7.0. Estable un mes en botella ámbar a 4 °C.

- Solución de yoduro de acetiltiocolina (Sigma, p.a.) 75 mM en agua destilada. Estable 1 semana a 4 °C.
- Solución de ácido clorhídrico (37 %, Panreac; p.a.) 12 mM. en agua destilada.
- Solución de etopropazina (Sigma, p.a.) 6 mM en HCl 12 mM. Estable tres meses a -20 °C.

La estabilidad de los tampones en una botella de color ámbar son tres meses si se conservan a 4 °C.

Metodología

La reacción se inicia agregando la muestra diluida a la cubeta de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Tampón fosfato 100 mM pH 8,0	2,850 ml	90 mM
DTNB 10 mM	0,100 ml	0,32 mM
Acetiltiocolina 75 mM	0,020 ml	0,48 mM
Etopropazina 6 mM	0,010 ml	0,02 mM
Incubar a 25 °C durante 5 minutos		
Muestra (sangre diluida 1/100 en tampón pH 7,0)	0,170 ml	

Las lecturas se realizan frente al aire a partir de los 15 segundos de la adición de la muestra, con intervalos de 30 segundos y durante 2 minutos. La temperatura de la cubeta se mantuvo constante a 25 °C ± 0.1 durante el curso de la reacción. La actividad enzimática así determinada se expresa en función del contenido de hemoglobina como:

$$\text{Actividad AChE (U/g hemoglobina)} = \frac{13625 \times (\Delta DO / \text{min})}{10 \times \text{Hemoglobina (g/dL)}}$$

Determinación de la Hemoglobina

Como se ha mencionado, la actividad AChE se expresa ajustada por la cantidad de hemoglobina de la muestra de sangre. Su determinación se realizó aprovechando el punto isobéptico correspondiente al sistema de dos componentes oxihemoglobina-metahemoglobina (Siek y Rieders, 1984), y que se encuentra a una longitud de onda de 584 nm. Para ello se utilizó sangre

total recogida en tubos con EDTA.

Reactivos

- NH₃ al 0,4% (V/V) en agua destilada: NH₃ al 30 % (V/V) (Panreac, p.a.)

Metodología

Para la determinación de la hemoglobina se siguieron los pasos indicados en la siguiente tabla:

Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Disolución de amoniaco 0,4 % (V/V)	2,5 ml	0,4 % (V/V)
Muestra (sangre total con EDTA)	0,020 ml	

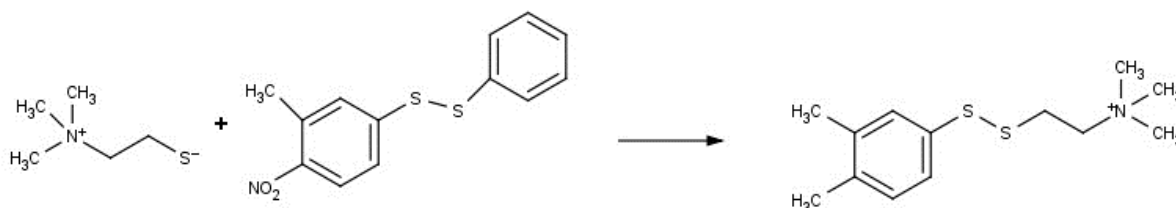
Las lecturas se realizan frente al aire en cubetas para luz visible y se mide la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda indicada, pasado un minuto de la adición de la muestra. A partir de la absorbancia obtenida se puede calcular la concentración de hemoglobina total a través de la ecuación propuesta por Siek y Rieders sin más que tener en cuenta la dilución de la muestra de sangre:

$$Hb \text{ (g/100 ml)} = \frac{A_{584} \times 2520}{5,25 \times 20} = 24 \times A_{584}$$

7.1.2. Butirilcolinesterasa (BuChE). EC 3.1.1.8

La actividad colinesterasa plasmática se determina usando como sustrato la Butiriltiocolina (BuSCh) según el método propuesto por *Ellman* (Ellman et al., 1961) que se basa en la formación de tiocolina (SCh). Esta se forma tras la reacción de su grupo tiol con DTNB, que da lugar a la aparición de 5-tio-2-nitrobenzoato, un anión amarillo, que puede medirse mediante espectrofotometría visible. La secuencia de reacciones es la siguiente:





Reactivos

- Tampón Sorensen 67 mM, pH 7,4: Na₂HPO₄·12H₂O (Merck, p.a.) y KH₂PO₄ anhidro (Merck, p.a.). Estable tres meses si se conserva a 4 °C en botella de color ámbar.
- Solución de butiriltiocolina iodada (Sigma, p.a.) 90 mM en agua destilada. Estable durante una semana si se conserva a 4 °C en botella de color ámbar.
- Solución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma, p.a.) 0,270 mM en tampón Sorensen 67 mM, pH 7,4. Estable un mes en botella ámbar a 4 °C.

Metodología

El ensayo se lleva a cabo de acuerdo a la siguiente tabla:

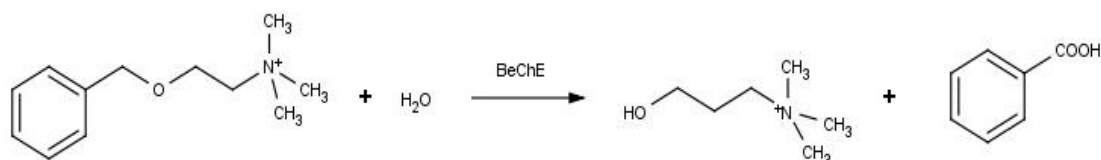
Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
DTNB en tampón Sorensen:	2,9 ml	
DTNB 0,27 mM		0,26 mM
Na ₂ HPO ₄ 67 mM		64,3 mM
KH ₂ PO ₄ 67 mM		64,3 mM
BuSCh 90 mM	0,100 ml	2,98 mM
Incubar a 25 °C durante 5 minutos		
Muestra (plasma sin diluir)	0,020 ml	

La reacción se inicia agregando el plasma a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire monitorizando el aumento de extinción a 410 nm a intervalos de 20 segundos durante 2 minutos. La temperatura de la cubeta se mantuvo a 25 °C ± 0.1 durante el curso de la reacción. De esta forma:

$$\text{Actividad BuChE (U/l)} = 11100 \times (\Delta DO/\text{min})$$

7.1.3. Benzoilcolinesterasa (BeChE). EC 3.1.1.8.

La actividad benzoilcolinesterasa se determina usando benzoilcolina (BeChE) como sustrato. La BeChE hidroliza la benzoilcolina y da lugar a una molécula de tiocolina y otra de ácido benzoico. Su actividad catalítica se determina monitorizando espectrofotométricamente la tasa de desaparición del sustrato benzoilcolina a 240 nm según la siguiente reacción (Whittaker, 1983):



El uso de diversos inhibidores (dibucaína y fluoruro sódico) permite, a su vez, poder adscribir un determinado fenotipo a un individuo en concreto.

Reactivos

- Tampón Sorensen 67 mM, pH 7,4: Na₂HPO₄·12H₂O (Merck, p.a.) y KH₂PO₄ anhidro (Merck, p.a.). Estable tres meses si se conserva a 4 °C en botella de color ámbar.
- Solución de cloruro de benzoilcolina (Sigma, p.a.) 0.2 mM en tampón Sorensen. Esta disolución es estable a 4 °C durante 24 horas.

Metología

La actividad BeChE se determina siguiendo el siguiente esquema:

Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Tampón Sorensen 67 mM pH 7,4	1,0 ml	67 mM
Benzoilcolina 0,2 mM	1,0 ml	0,05 mM
Incubar a 37 °C durante 5 minutos		
Muestra (plasma diluido 1/100 en tampón Sorensen)	2,0 ml	

La reacción se inicia agregando el plasma a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire, monitorizando la tasa de hidrólisis de benzoilcolina a 240 nm a partir de 30 segundos del inicio de la reacción, con intervalos de 30 segundos y durante 4 minutos. La temperatura de la cubeta se mantuvo a 37 °C ± 0.1 durante el curso de la reacción. La actividad catalítica se obtuvo como:

$$\text{Actividad BeChE (U/l)} = 30300 \times (\Delta DO/\text{min})_B$$

Estas actividades se pueden corregir para una temperatura de 25 °C sin más que multiplicar el valor obtenido para la misma por un factor de corrección de 0.545 (Whittaker, 1983).

7.2. Determinación de actividades A-Esterasas (paraoxonasa-1, PON1)

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, las esterasas poseen muy poca especificidad de sustrato. Esta característica se puede aprovechar para determinar la actividad PON1 utilizando diferentes sustratos (paraoxón, diazoxón, dihidrocoumarina,...).

7.2.1. PON1 usando paraoxón como sustrato (POasa). EC 3.1.8.1.

El paraoxón (dietil-*p*-nitrofenil fosfato) es hidrolizado a *p*-nitrofenol y ácido *O,O*-dietilfosfórico. El anión *p*-nitrofenol tiene un color amarillo y se mide selectivamente a 405 nm (Reiner y Radic, 1985).



Esta actividad se determinó también en presencia de NaCl 1M (actividad paraoxonasa estimulada con sal, ssPOasa), que permite establecer el fenotipo sérico de PON1 según el procedimiento de Eckerson (Eckerson et al., 1983), para el cual se tiene en cuenta el cálculo del porcentaje de estimulación con sal (% E.S.):

$$\% \text{ E.S.} = 100 \times \frac{\text{ssPOasa} - \text{POasa}}{\text{ssPOasa}}$$

Reactivos

- Tampón glicina-NaOH 100 mM, pH 10, CaCl₂ 1 mM: glicina (Sigma, p.a.), NaOH (Panreac, p.a.) y CaCl₂ (Merk, p.a.).
- Tampón glicina-NaOH 100 mM, pH 10, CaCl₂ 1 mM, estimulado con NaCl 1 M: glicina (Sigma,

p.a.), NaOH (Panreac, p.a) y NaCl (Panreac, p.a.).

- Soluciones de paraoxón (dietil *p*-nitrofenil fosfato, Sigma, p.a; riqueza 90%) 1,5 mM en cada uno de los tampones anteriores.

Metodología

En cada cubeta se dispusieron los siguientes reactivos en las cantidades y concentraciones que se indican:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración final en cubeta</i>
Solución de paraoxón 1 mM en tampón	0,950 ml	
Glicina 100 mM		95 mM
CaCl ₂ 1 mM		0,95 mM
NaCl 1M (solo para estimulada)		0,95 M
Paraoxón 1,5 mM		1,425 mM
Incubar a 25 °C durante 3 minutos		
Muestra (suero)	0,050 ml	

La reacción se inició agregando la muestra de suero a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas desechables monitorizando el aumento de la extinción a 405 nm a intervalos de 30 segundos durante 2 minutos. La actividad catalítica se expresa como:

$$\text{Actividad POasa (U/l)} = 1250 \times \Delta DO / \text{min}$$

7.2.2. Arilesterasa (AREasa). EC 3.1.1.2

La actividad AREasa se determinó mediante la hidrólisis de fenilacetato a fenol y ácido acético (Junge y Klees, 1983). La tasa de formación de fenol se monitoriza espectrofotométricamente a 270 nm.



Reactivos

- Tampón tris-acetato 100 mM, pH 7,4, CaCl₂ 10 mM: tris (hidroximetil) amino metano (Sigma, p.a.), CaCl₂ (Merck, p.a) y ácido acético glacial (Merck, p.a.). Estable en botellas color ámbar a 4 °C durante tres meses.
- Tampón tris-acetato 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 5 mM: tris (hidroximetil amino metano) (Sigma, p.a.), CaCl₂ (Merck, p.a.) y ácido acético glacial (Merck, p.a.). Estable en botellas color ámbar a 4 °C durante tres meses.
- Solución de fenilacetato (Sigma, p.a) 8,08 mM. Estable 5 días a 4 °C.

Metodología

En cada cubeta se dispusieron los siguientes reactivos en las cantidades y concentraciones que se indican:

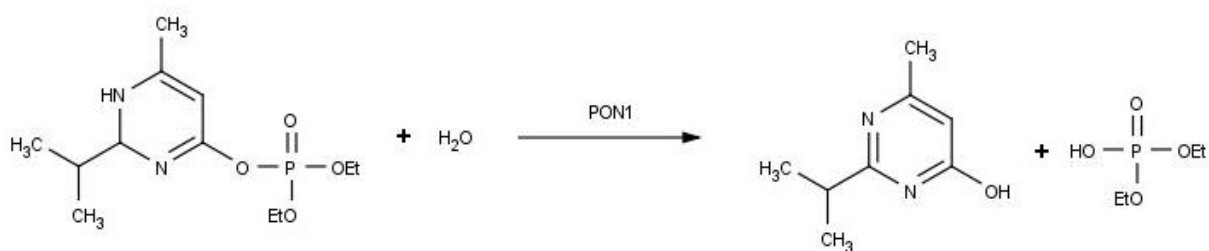
<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración final en cubeta</i>
Tampón tris-acetato:	1 ml	
Tris 100 mM		47,6 mM
CaCl ₂ 10 mM		4,76 mM
Fenilacetato 8.08 mM	1 ml	3,85 mM
Incubar a 25 °C durante 3 minutos		
Muestra (suero 1/50 en tampón 50 mM)	0,100 ml	

La reacción se inició agregando la muestra de suero a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo, monitorizando el aumento de extinción a 270 nm por la aparición de fenol a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 2 minutos.

$$\text{Actividad AREasa (kU/l)} = 35472,5 \times \Delta DO/\text{min}$$

7.2.3. PON1 usando diazoxón como sustrato (DZOasa). EC 3.1.8.1

La determinación de diazoxonasa se realizó monitorizando el aumento de la absorbancia a 270 nm producido por la formación del 2-isopropil-4-metil-6-hidroxi pirimidina (IHMP) como consecuencia de la hidrólisis del diazoxón (2-isopropil-4-metil-6-dietil fosfato pirimidina) (Richter y Furlong, 1999).



Reactivos

- Tampón tris-HCl 1M, pH 8,0 con NaCl 2 M y CaCl₂ 2 mM: tris (hidroximetil) aminometano (Sigma, p.a.), HCl (37 %, Panreac; p.a.), NaCl (Merck, p.a.) y CaCl₂ (Merck, p.a.). Estable tres meses en botella ámbar a 4 °C.
- Diazoxón (2-isopropil-4-metil-6-dietil fosfato pirimidina, Chem Service, p.a.) 500 μM en tampón tris-HCl 1M, pH 8.0 con NaCl 2 M y CaCl₂ 2 mM. Mantener en agitación en campana durante 30 minutos para facilitar la disolución del diazoxón. Preparado *in situ*.

Metodología

El ensayo se inicia añadiendo la muestra de suero según el siguiente esquema:

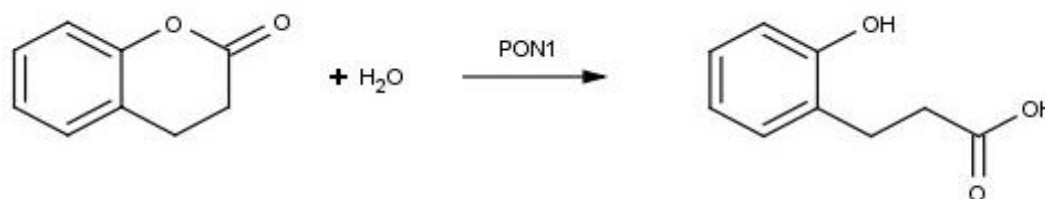
Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Tampón con diazoxón:	1 ml	
Tris-HCl 100 mM		0,099 M
NaCl 2 M		1,99 M
CaCl ₂ 2 mM		1,99 mM
Incubar a 25 °C durante 3 minutos		
Muestra (suero sin diluir)	0,005 ml	

Las lecturas, se realizan frente al aire en microcubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad, monitorizando el aumento de absorbancia por la aparición de IMHP a intervalos de 30 segundos durante un tiempo total de 2 minutos y medio.

$$\text{Actividad DZOasa (U/l)} = 6,6 \times \Delta DO / \text{min}$$

7.2.4. PON1 usando dihidrocoumarina como sustrato (DHCasa). EC 3.1.8.1

Para la determinación de la actividad lactonasa (que engloba tanto la actividad PON1 como la PON3) se siguió el método descrito por (Draganov et al., 2000), donde la dihidrocoumarina, un tipo de latona, es hidrolizada a melilotato. La tasa de formación de melilotato se monitoriza espectrofotométricamente midiendo el aumento de la absorbancia a 270 nm. Para corregir la hidrólisis no enzimática del sustrato, hay que introducir un blanco al principio de cada serie de medidas.



Reactivos

- Tampón tris-HCl 50 mM, pH 7,0; CaCl₂ 1 mM: tris (hidroximetil) aminometano (Sigma, p.a.), HCl (37 %, Panreac; p.a.), NaCl (Merck, p.a.) y CaCl₂ (Merck, p.a.). Estable tres meses conservándola a 4 °C en botella de color ámbar.
- Solución de dihidrocoumarina (Sigma, 99 %, GC) 100 mM en metanol (Merck, p.a.). La solución de dihidrocoumarina en metanol se debe preparar justo antes de iniciar las medidas y mantenerla en un baño de hielo durante el mismo para evitar la hidrólisis del sustrato. Además debe agitarse bien antes de cada adición.

Metodología

En cada cubeta se dispusieron los siguientes reactivos en las cantidades y concentraciones que se indican:

Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Tampón tris-HCl :	0,965 ml	
Tris 50 mM		48,25 mM
CaCl ₂ 1 mM		0,96 mM
Muestra (suero diluido 1/5 en tampón)	0,025 ml	
Incubar a 37 °C durante 3 minutos		
Dihidrocoumarina 100 mM en metanol	0,010 ml	1,0 mM

La reacción se inicia al añadir el sustrato a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo, monitorizando el aumento de extinción a 270 nm por la aparición del melilotato a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 2,5 minutos. Al valor obtenido en cada determinación se le debe restar el blanco que se realiza al principio de cada serie.

$$\text{Actividad DHCasa (U/ml)} = 154,4 \times \Delta DO / \text{min}$$

8. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

8.1. Tioles totales (SHT)

La concentración de grupos tiólicos totales alifáticos (SHT) presentes en las distintas muestras de suero se determinó según el método de Ellman (1959) midiendo la tasa de formación del anión amarillo 5-tio-2-nitrobenzoato a 410 nm a partir del sustrato DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoato)), de acuerdo con la siguiente reacción:

Reactivos

- Tampón fosfato 100 mM, pH 7,0: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.). Estable durante tres meses a 4 °C en botellas de color ámbar.
- Tampón fosfato 100 mM, pH 8,0: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, p.a.). Estable durante tres meses a 4 °C en botellas de color ámbar.
- Solución de 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma, p.a.) 10 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7.0. Estable durante un mes en botella ámbar conservándolo a 4 °C.

Metodología

La reacción se inició agregando el DTNB a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire (aunque siempre hay que restar el blanco conteniendo agua en lugar de muestra). Las medidas se realizan a 410 nm tras 15 minutos incubando las muestras a 25 °C ± 0.1. La temperatura de la cubeta se mantuvo a durante el curso de la reacción.

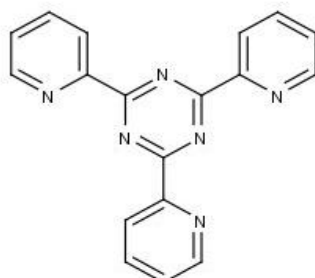
Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Tampón fosfato 100 mM pH 8.0	0,940 ml	94 mM
Muestra (suero sin diluir)	0,050 ml	
Incubar a 25 °C durante 15 minutos		
DTNB 10 mM	0,010 ml	0,1 mM

El contenido total de tioles (grupos sulfhidrilo) se puede calcular de la siguiente forma:

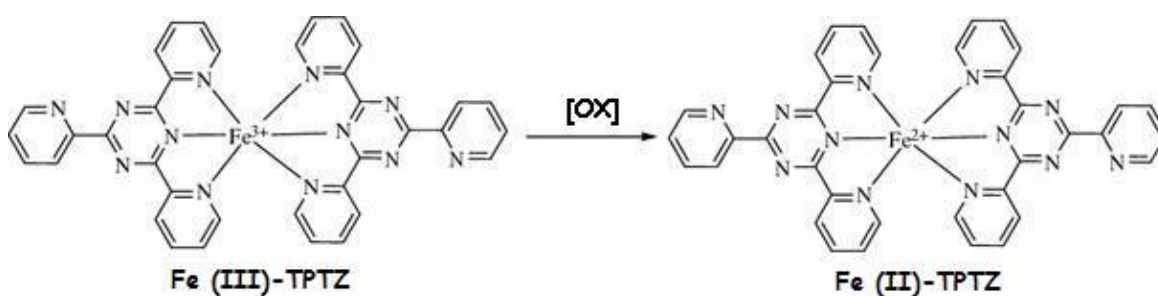
$$SHT (\mu\text{mol de SH/ml suero}) = 1,47 \times A$$

8.2. Capacidad antioxidante total (FRAS)

La capacidad antioxidante total del suero, FRAS (Ferric Reducing Ability of Serum), se basa en el método propuesto por Benzie y Strain (1996), basado en el uso de 2,4,6-(2-tripiridil)-1,3,5-triacina o TPTZ, cuya estructura es la siguiente:



En este método lo que se mide es la capacidad que tiene el suero de reducir el catión Fe (III) del complejo que forma con el TPTZ a Fe (II) en condiciones de pH ácido, según se deduce de las siguientes reacciones:



Reactivos

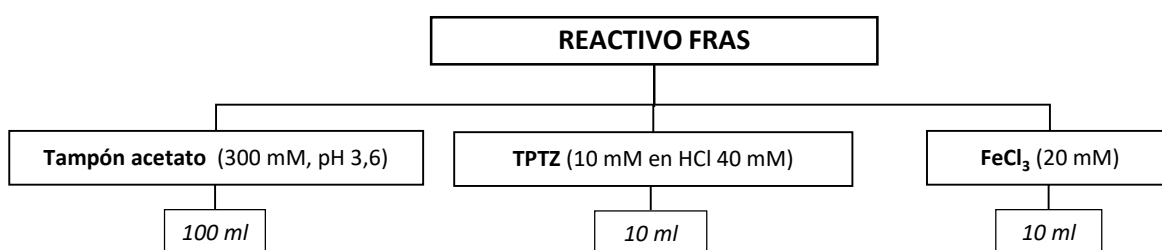
- Tampón acetato 300 mM, pH 3.6: CH₃COONa (Merck, p.a.) y CH₃COOH (Merck, p.a.). Estable durante tres meses a 4 °C en botellas de color ámbar.
- Solución de ácido clorhídrico 40 mM: HCl 37% (37 %, Panreac; p.a.)
- Disolución de TPTZ 10 mM, en ácido clorhídrico 40 mM: 2,4,6-(2-tripiridil)-1,3,5-triacina (Merk, p.a.)
- Solución de cloruro férrico 20 mM: FeCl₃·6H₂O (Panreac, p.a.)
- Disolución patrón de sulfato ferroso 2 mM: FeSO₄·7H₂O (Panreac, p.a.)

La estabilidad de las soluciones (a 4 °C en botellas de color ámbar) es de un día para la solución de Fe (II), Fe (III) y TPTZ, por lo que el reactivo FRAS hay que prepararlas diariamente. Para las disoluciones del tampón y del ácido clorhídrico la estabilidad es de un mes en botellas de ámbar.

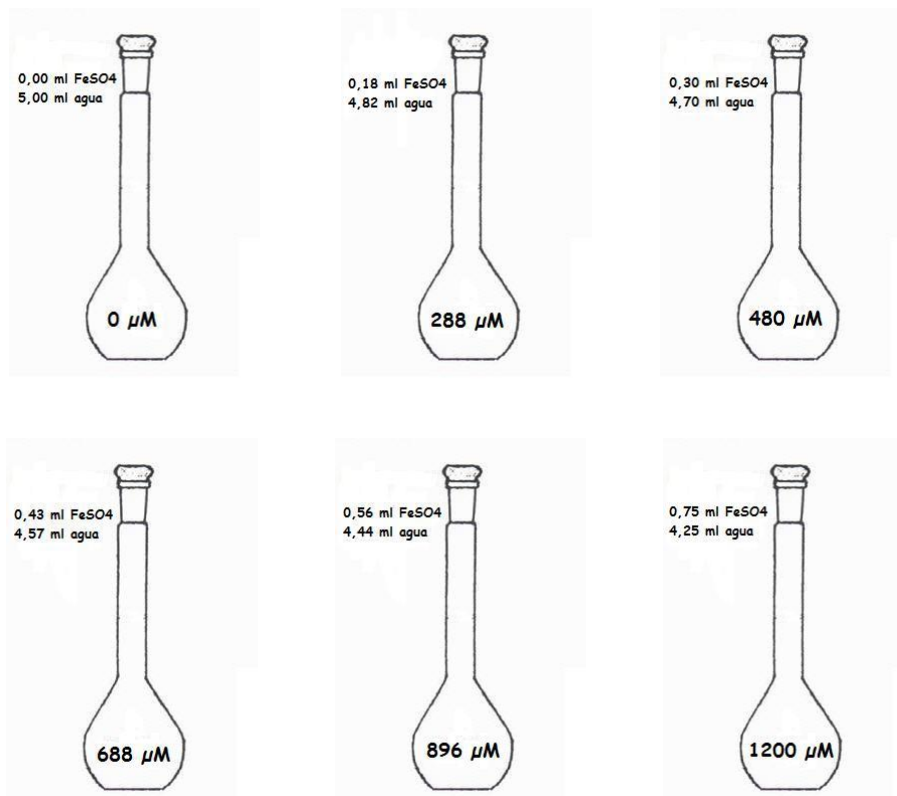
Metodología

El complejo Fe (II) - TPTZ se puede medir por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 593 nm. La ventaja radica en que el potencial de reducción del par Fe (III)/Fe (II) es bastante más elevado que el de las mayoría de las especies antioxidantes presentes en el suero sanguíneo por lo que esta es capaz de oxidarlas. Por tanto, el método es válido para la mayor parte de antioxidantes, pero no determina los grupos tiólicos.

Para ello, lo primero es preparar la disolución del reactivo FRAS, que debe conservarse protegido de la luz hasta el momento del ensayo. El reactivo FRAS se prepara con una mezcla de tampón acetato (300 mM, pH 3,6), TPTZ (10 mM, HCl 40 mM) y FeCl₃ (20 mM) en proporción 10:1:1.



Una vez esto, es necesario establecer una recta patrón, la cual se establece midiendo la absorbancia para disoluciones patrones de sulfato ferroso preparadas por dilución a partir de disoluciones de FeSO_4 2 mM tal y como se indica en el siguiente esquema:



El ensayo se inicia agregando el suero diluido a la cubeta e incubándolo a 37°C durante 10 minutos. Para la curva patrón la metódica es la misma, salvo que en lugar de realizar la adición de la muestra, se añaden las distintas disoluciones patrones de FeSO_4 , con las concentraciones anteriormente indicadas.

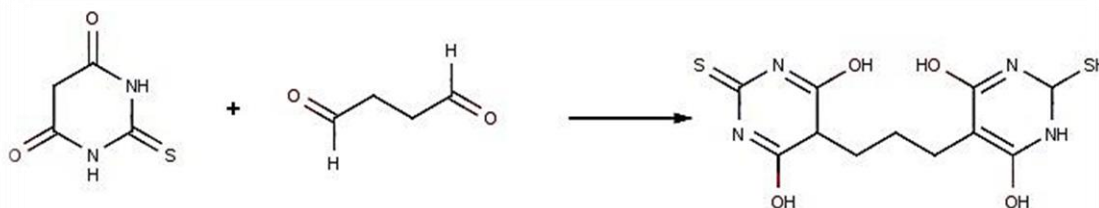
Reactivos	Volumen en cubeta	Concentración final en cubeta
Reactivo FRAS:	0,830 ml	
Tampón acetato 300 mM pH 3,6		250 mM
TPTZ 10 mM		0,8 mM
HCl 40 mM		3,2 mM
FeCl_3 20 mM		1,7 mM
Muestra (Suero diluido 1/4 en agua)	0,110 ml	
Incubar a 37°C durante 10 minutos		

Las lecturas se realizan frente al aire y se extrapolan en la curva patrón obtenida con las disoluciones de sulfato ferroso. La capacidad antioxidante total (FRAS) se expresa como:

$$FRAS = \frac{\mu\text{moles de Fe}^{2+}}{V(l) \text{ de suero}}$$

8.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los radicales libres son capaces de generar también daño oxidativo en los lípidos, siendo de gran importancia el causado a aquellos que se encuentran en las membranas celulares, debido a los cambios que pueden inducir en su estructura y permeabilidad. Para determinar este daño oxidativo se han diseñado diferentes métodos basados en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con uno de los principales subproductos de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA), lo cual produce un complejo MDA-TBA₂ que se determina por cromatografía según la reacción:



El método elegido para la determinación de la peroxidación lipídica se basa en esta reacción y la posterior determinación del complejo mediante HPLC-FD. El equipo empleado (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.) consta de una bomba serie 200 y un detector de fluorescencia programable serie 200a unido a través de una interfase NCI 900 y controlado por el software *TotalChrom Navigator* versión 6.3.1.0504.

Reactivos

- Disolución de etanol al 40 %: etanol al 95 % (Merk, p.a.).
- Disolución de BHT 0,05 % (m/v) en etanol al 40 %: 2,6-di-tertbutil-4-metilfenol (Flucka, p.a.). Estabilidad un mes en frío.
- Disolución de H₃PO₄ 0,44 M en agua miliQ: H₃PO₄ 85 % (Panreac, p.a.). Estabilidad tres meses a 4°C y en botellas de color ámbar.

- Disolución de TBA 42 mM en agua miliQ: ácido 2-tiobarbiturico (Merk, p.a.) Estabilidad 7 días en frío y en botellas de color ámbar.
- Disolución madre de TEP 10 μ M en etanol al 40 %: 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Aldrich, p.a). Se debe preparar diariamente.
- 1-butanol (Panreac, p.a.).
- Fase móvil K_2HPO_4 / KOH 50 mM; pH 6,8: K_2HPO_4 (Merk, p.a.) y KOH (Merk, p.a.). Estable 2-3 días.

Metodología

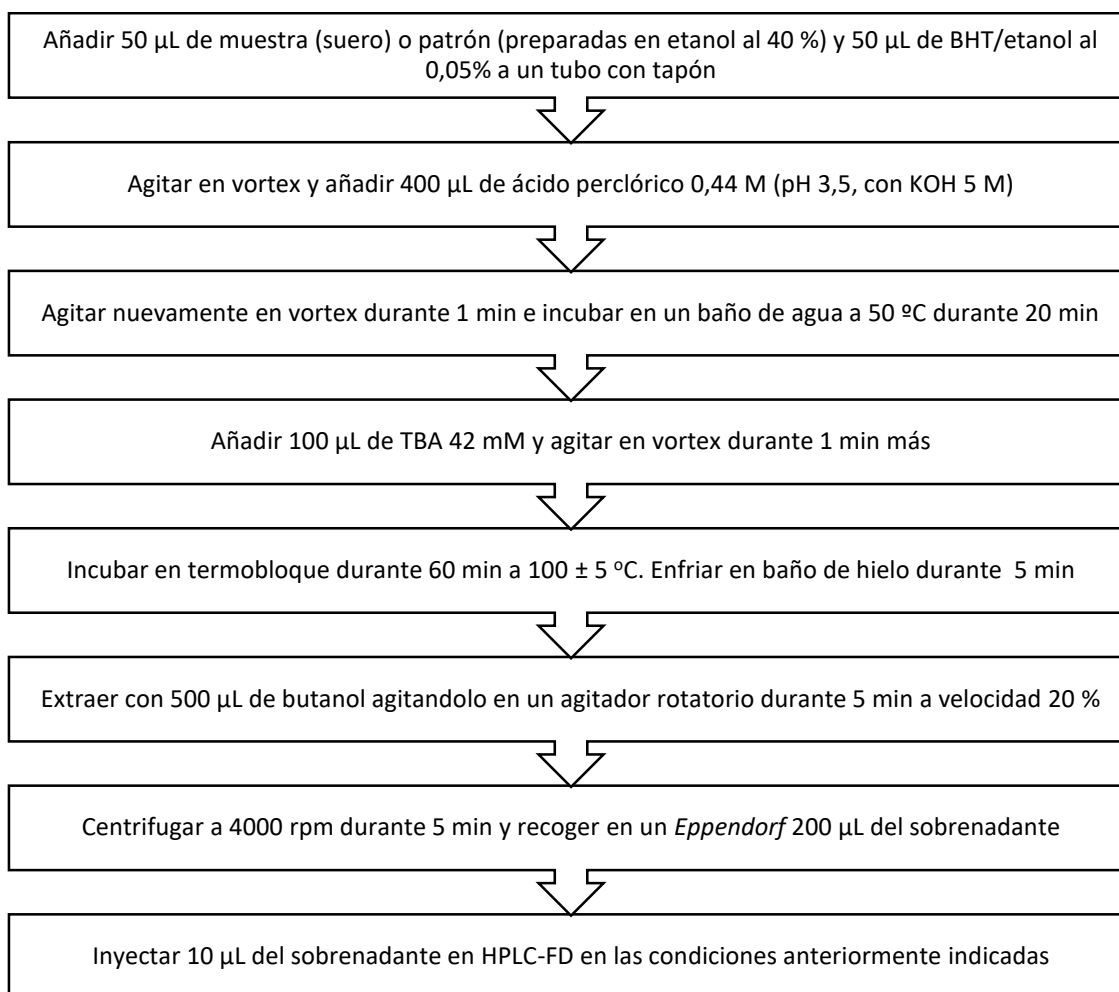
Las condiciones experimentales (Agarwal y Chase, 2002) son las siguientes:

- Longitudes de onda: 515 nm para la excitación y 553 nm para la emisión.
- Fase móvil: 40 % MeOH y 60% K_2HPO_4 /KOH (50 mM; pH 6,8). Flujo: 1,0 ml/min.
- Columna C-18.
- Tiempo de retención aproximado: 2,20 minutos.
- LOD (para extracción con 250 μ L de 1-butanol): 0,128 μ M.

Diariamente se prepara una curva patrón a partir de una disolución madre 10 μ M de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) según lo indicado a continuación:

<i>Concentración</i>	<i>TEP 10 μM</i>	<i>Etanol 40 %</i>
3.0 μ M	300 μ L	700 μ L
2.0 μ M	200 μ L	800 μ L
1,2 μ M	120 μ L	880 μ L
0,5 μ M	50 μ L	950 μ L
0,0 μ M	0 μ L	1000 μ L

El diagrama de flujo de todo este proceso se puede resumir en la siguiente tabla:



9. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE DAÑO ÓRGANO-ESPECÍFICO

9.1. Biomarcadores de nefrotoxicidad

9.1.1. Albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, osteopontina y TFF3 en orina

Mediante la técnica *Multiplex* se han determinado simultáneamente seis biomarcadores de daño renal en orina usando kits comerciales de análisis *Bio-Plex Pro RBM Human Kidney* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU*).

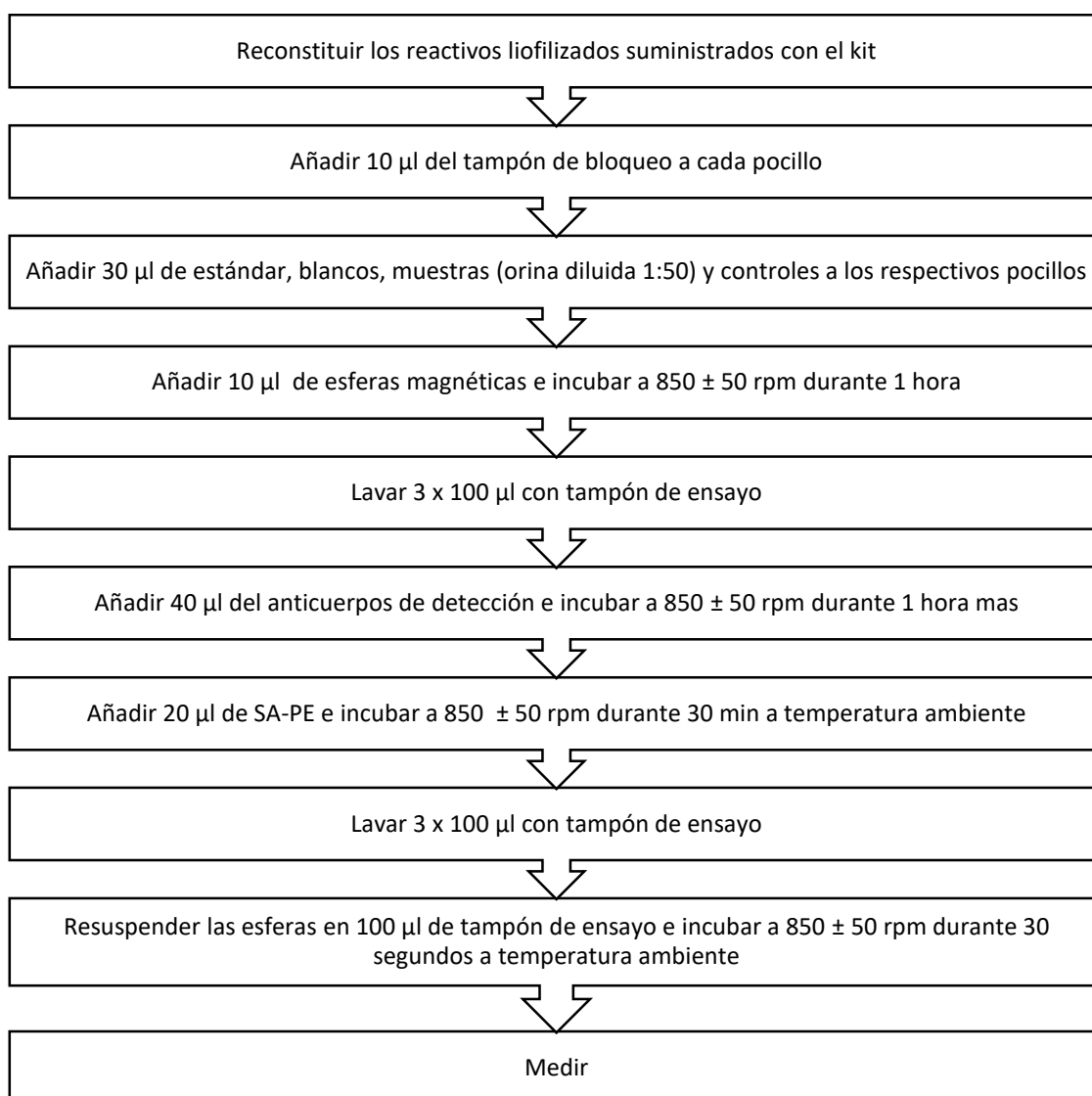
Los kits de ensayo de toxicidad renal *Bio-Plex*, engloban a un amplio conjunto de biomarcadores de toxicidad y daño renal. En el mercado se encuentran dos paneles para humanos con estas características: el *Toxicity Panel 1* (calbidina, clusterina, GST- π , IL-18, KIM-1 y MCP-1) y el *Toxicity Panel 2* (albúmina, B2M, cistatinaC, NGAL, osteopontina y TFF3). En ambos casos se emplean

microesferas magnéticas que nos permiten cuantificar múltiples proteínas en orina.

Estos ensayos se ofrecen premezclados en un solo kit. En el presente estudio se utilizó el *Toxicity Panel 2*. Las regiones donde se realiza la lectura de cada una de las microesferas magnéticas, así como los límites de detección para cada uno de los parámetros, son:

Biomarcador	Región	LD
Albumina	30	14,50 ng/ml
β -2-Microglobulina (β 2M)	22	0,50 ng/ml
Cistatina C	51	1,00 ng/ml
Lipocalina asociada a gelatinasa de neurofilamentos (NGAL)	46	0,80 ng/ml
Osteopontina (OPN)	20	48,00 ng/ml
Proteína factor trébol 3 (TFF3)	61	2,50 ng/ml

El diagrama de flujo del ensayo, tal y como se indica en las instrucciones suministradas por el fabricante, es el siguiente:



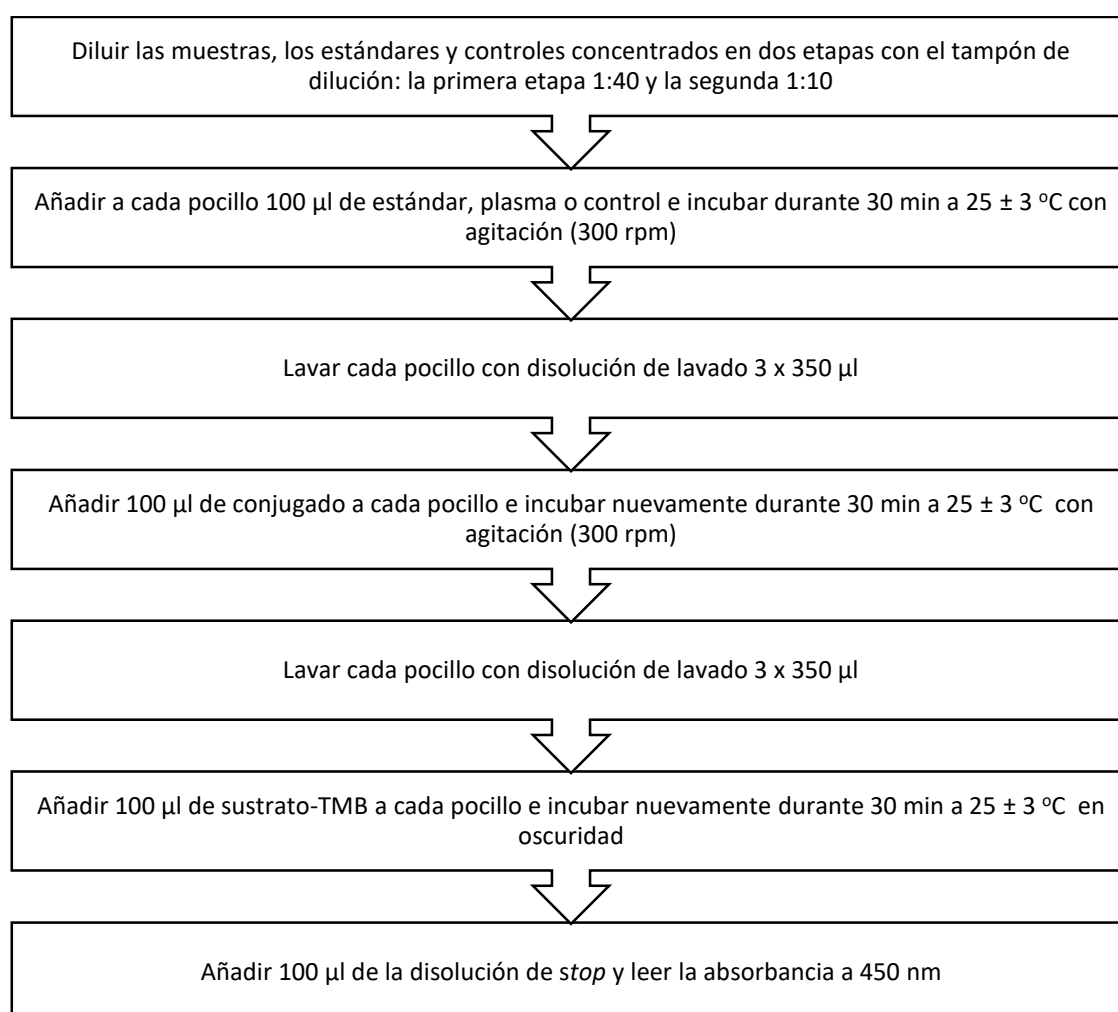
A la hora de analizar los resultados, aquellos valores por debajo del límite de detección (LOD) se imputaron por LOD/2, con objeto de no poder potencia estadística.

9.1.2. Cistatina C en plasma

La determinación de cistatina C en plasma se ha realizado mediante un inmunoensayo enzimático ELISA tipo *sandwich* con un LOD de 100 ng/ml. Para ello se ha empleado el kit comercial *Human Cystatin C ELISA (BioVendor Research and Diagnostic Products, Heidelberg, Alemania)* válido para muestras humanas de suero, plasma (con EDTA, citrato y heparina como anticoagulantes), orina y líquido cefalorraquídeo. En el presente estudio se han empleado muestras de plasma que contienen EDTA como anticoagulante siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, las muestras se incubaron en los pocillos de la placa suministrada con el anticuerpo policlonal de la cistatina C retenido en el mismo. Posteriormente, tras un lavado que elimina el resto de muestra que no se ha unido al anticuerpo, se adiciona el conjugado con el anticuerpo de detección, la estreptavidina y la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Este conjugado se une al antígeno y tras otro lavado, que elimina el resto de conjugado que no se ha unido y la adición del sustrato de la HRP (H_2O_2 -TMB) se produce la reacción de coloración. Por último, la reacción se detiene con la adición de una disolución de ácido sulfúrico y la absorbancia resultante, proporcional a la concentración de cistatina C en la muestra, se mide espectrofotométricamente a 450 nm utilizando una curva patrón con los siguientes puntos: 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/l}$. Tras una serie de pruebas se decidió utilizar el punto 0 como parte de la curva de calibrado (en lugar de usar un blanco) ya que no afectaba a la linealidad de la misma, lo permitió establecer un rango de ensayo de 0 a 80 $\mu\text{g/l}$.

Todo esto se realiza según indica el diagrama de flujo siguiente:

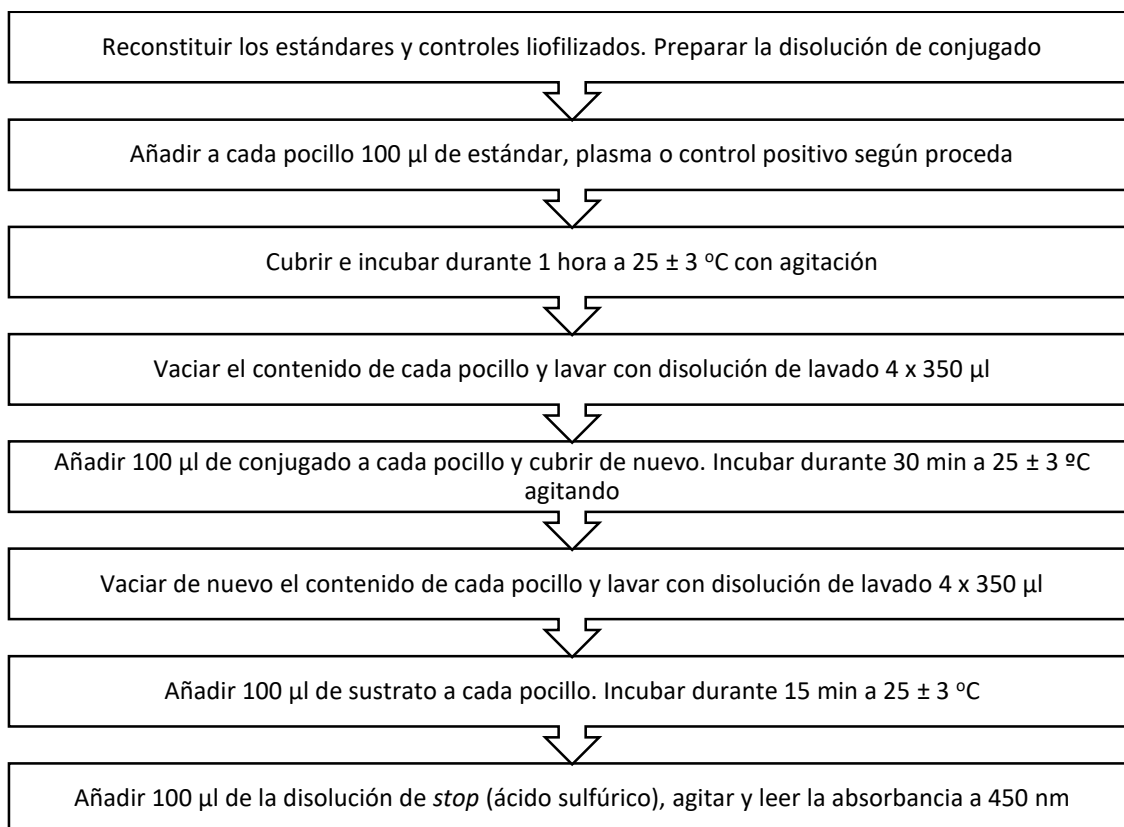


9.1.3. *Glutation S-transferasa alfa (GST- α). EC 2.5.1.18*

La determinación cuantitativa de esta enzima en plasma humano se ha llevado a cabo usando un kit comercial de ELISA tipo *sandwich* suministrado por *EKF Diagnostics Ltd. (Dublín, Irlanda)* válido para muestras no solo de plasma, sino también de orina y suero. La concentración se determina utilizando una curva de calibrado gracias a la adición secuencial de muestra, conjugado enzima-anticuerpo secundario y sustrato a los pocillos de la microplaca cubierto con anticuerpos específicos para la GST- α . La intensidad del color resultante medida a 450 nm es proporcional a la cantidad de GST- α presente en la muestra.

De este modo, la muestra (antígeno) se adiciona a los pocillos de las placas que contienen el anticuerpo primario inmovilizado. Tras eliminar el resto de muestra que no se ha unido al mismo se añade el conjugado, que contiene la enzima HRP. Tras eliminar el exceso de HRP mediante un nuevo lavado, se adiciona el sustrato (H_2O_2 -TMB) y finalmente se detiene la reacción usando el reactivo de *stop* (un ácido, generalmente ácido sulfúrico) y se mide la absorbancia a 450 nm.

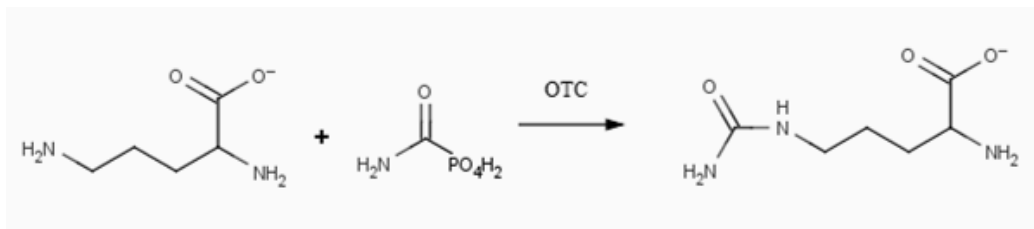
El diagrama de flujo, tal y como indica el fabricante es el siguiente:



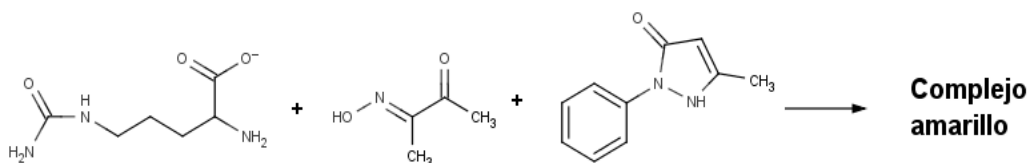
9.2. Biomarcadores de hepatotoxicidad

9.2.1. *Ornitinatrascarbamilasa (OTC). EC. 2.1.3.3*

Este método se basa en la determinación colorimétrica en plasma de la citrulina generada en la reacción de transferencia de un grupo carbamoilo desde una molécula de carbamolifosfato a otra de ornitina.



Posteriormente la citrulina formada reacciona de una forma específica con una mezcla de diacetil monoxima y antipirina, dando lugar a un producto coloreado que se puede medir a 460 nm (Ceriotti, 1983). La cantidad de citrulina formada por unidad de tiempo es proporcional a la actividad de la enzima OTC.



Como la urea puede interferir en la formación de color, se adiciona una disolución de ureasa para eliminarla. Además hay que tener en cuenta que la citrulina total proviene no solo de la formada por la reacción de la OTC, sino que también puede existir una importante contribución endógena (citrulina basal) y otra proveniente de la hidrólisis no enzimática (citrulina preformada), que deben ser corregidas.

Reactivos

- Tampón acetato-barbiturato, 70 mM, pH 7,00. Mezclar el reactivo (A), (B) y agua en proporción 5:6:14 respectivamente y ajustar el pH. Estable indefinidamente.

(A) *Disolución acetato-barbiturato 0,35 M*: acetato sódico trihidratado (Merk, p.a.) y barbiturato sódico (Merk, p.a.).

(B) *Disolución de ácido clorhídrico 50 mM*: HCl (37 % Panreac, p.a.).

- Solución de citrulina (estándar) 10 mM: citrulina (Sigma-Aldrich, p.a.) Estable indefinidamente.
- Solución de ureasa 2500 U/l en tampón acetato-barbiturato 70 mM, pH 7,00: ureasa 120 U/mg (Tipo III de Jack Bean, Sigma). Esta disolución es inestable, pero se preparan alícuotas y se congelan, descongelándolas justo en el momento de utilizarlas.
- Disolución de sustrato (carbamoil fosfato 23 mM y ornitina 2,5 mM) y ureasa 3000 U/l en tampón acetato-barbiturato 70 mM, pH 7,00: carbamoil fosfato dilitio (Sigma-Aldrich, p.a.), ornitina hidrocloreuro (Sigma-Aldrich, p.a.). Esta disolución es inestable, pero se preparan alícuotas y se congelan, descongelándolas justo en el momento de utilizarlas.
- Disolución de cromógeno: mezcla 1:1 de las disoluciones (C) y (D). Debe mezclarse en el momento de uso y descartarse pasadas dos horas.

(C) Disolución de antipirina-sulfato férrico (21 mM – 0,125 mM) en ácido sulfúrico 18 mM: antipirina (Flucka, p.a.), sulfato férrico hidrato (97%, Sigma-Aldrich, p.a.) y ácido sulfúrico (98 %, Panreac, p.a.). Estable indefinidamente.

(D) Disolución diacetilmonoxima 50 mM en ácido acético 0.87 M: ácido acético glacial (Merk, p.a.) y diacetilmonoxima (Sigma-Aldrich, p. a.). Estable indefinidamente.

Metodología

Los reactivos se dispusieron de la siguiente manera según el tipo de medida que se realice (citrulina total, basal o preformada):

	<i>Citrulina Total</i>		<i>Citrulina Basal</i>		<i>Citrulina Preformada</i>	
	<i>A_t</i>	<i>A_{t0}</i>	<i>A_b</i>	<i>A_{b0}</i>	<i>A_s</i>	<i>A_{s0}</i>
Muestra (plasma)	20 ml		20 ml			
Sustrato / Ureasa	40 ml	40 ml				
Ureasa			40 ml	40 ml		
Citrulina					20 ml	
Agua		20 ml		20 ml		20 ml
Tampón						40 ml

A_t: absorbancia total de la muestra; *A_{t0}*: absorbancia total sin sustrato; *A_b*: absorbancia basal de la muestra; *A_{b0}*: absorbancia basal sin sustrato; *A_s*: absorbancia de la citrulina preformada; *A_{s0}*: absorbancia del blanco

A continuación se homogeniza en *vortex* y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Después se añade 1,8 ml del reactivo cromógeno y se mezcla nuevamente empleando el *vortex*. Posteriormente se incuba en un bloque térmico durante 15 minutos a 95 ± 5 °C. Pasado este tiempo se detiene la reacción enfriando en baño de hielo. Por último, se lee la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 460 nm.

Según esto, la actividad se puede establecer como:

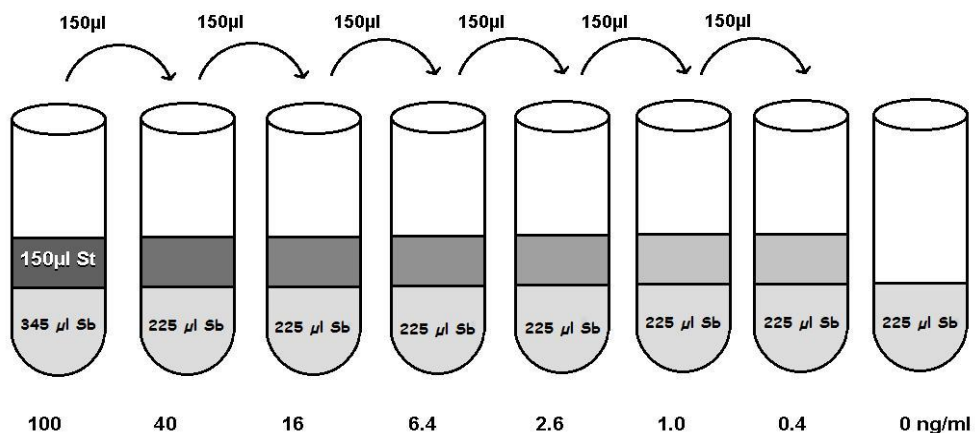
$$a_{OCT} (U/l) = 33.33 \times \frac{(A_t - A_{t0}) - (A_b - A_{b0})}{(A_s - A_{s0})}$$

9.2.2. Arginasa I. EC 3.5.3.1

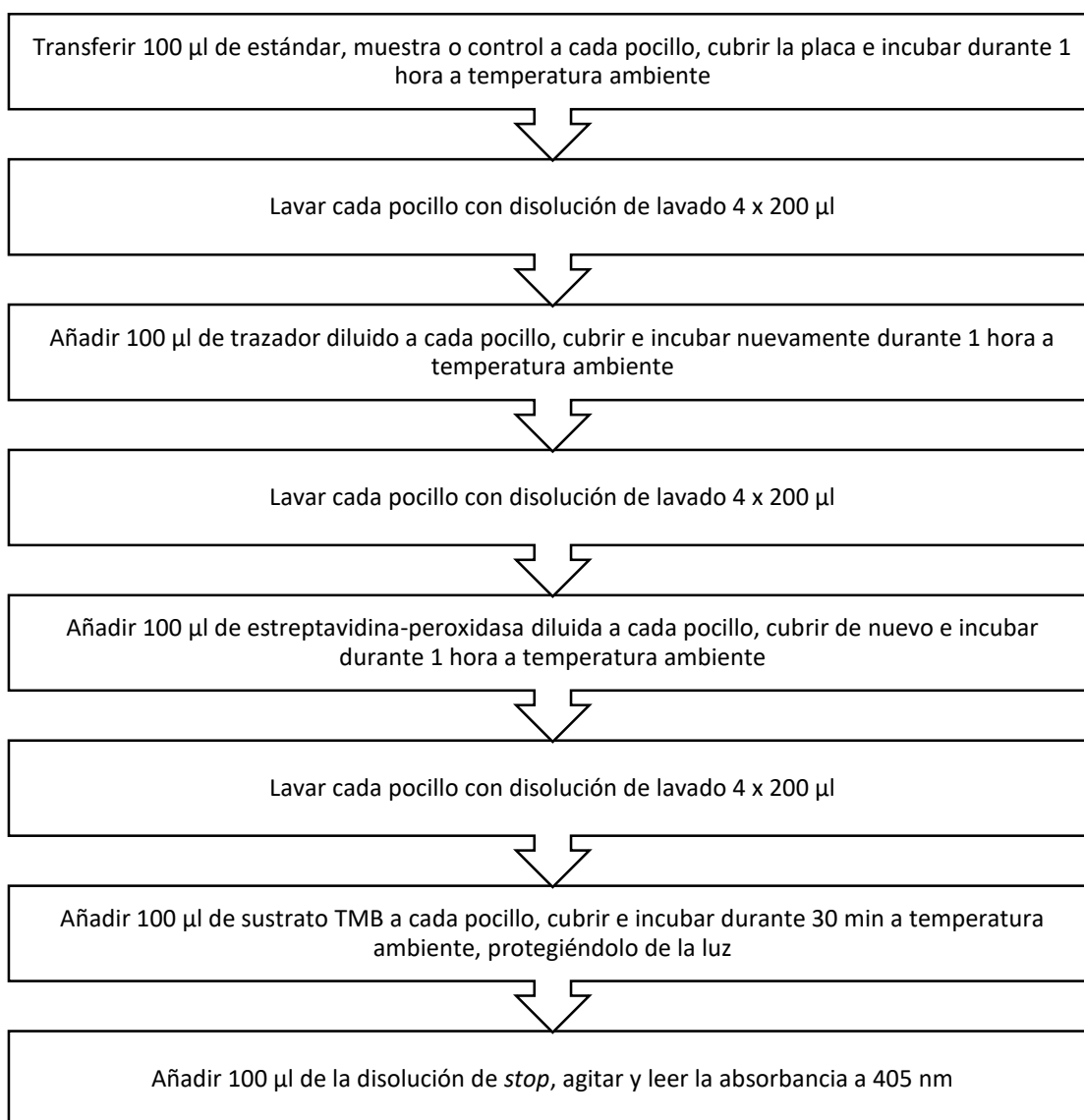
La determinación cuantitativa de arginasa I natural y recombinante se lleva a cabo mediante un inmunoensayo enzimático tipo *sandwich* con un kit comercial, *Human Arginase-I ELISA kit (Hycult biotech, Uden, Países Bajos)* válido para muestras de plasma, suero y cultivo celular. En el presente estudio se han utilizado muestras de plasma con EDTA como anticoagulante y se han seguido las instrucciones que indica el fabricante en el manual de uso.

En concreto, el plasma se ha incubado en los pocillos que tienen fijado el anticuerpo específico de la arginasa I. A continuación, el anticuerpo secundario biotinilado (denominado trazador) se une a la arginasa I capturada en el pocillo, donde posteriormente se une el conjugado de estreptavidina - peroxidasa. Finalmente, este conjugado reacciona con el sustrato H₂O₂ - TMB, reacción que se detiene mediante la adición ácido oxálico a un tiempo determinado. La concentración de arginasa-I en la muestra inicial se determina midiendo espectrofotométricamente cada pocillo a 450 nm y utilizando una curva de calibrado construida previamente. Siguiendo este procedimiento, la concentración mínima que se puede medir es de 2.6 ng/ml.

Para construir la curva de calibrado se realizaron diluciones seriadas (100, 40, 16, 6.4, 2.6, 1, 0.4 y 0 ng/ml) a partir de un estándar certificado (St) utilizando el tampón de dilución (Sb) según se especifica en el siguiente diagrama:



Todo esto se puede resumir en el siguiente diagrama de flujo:

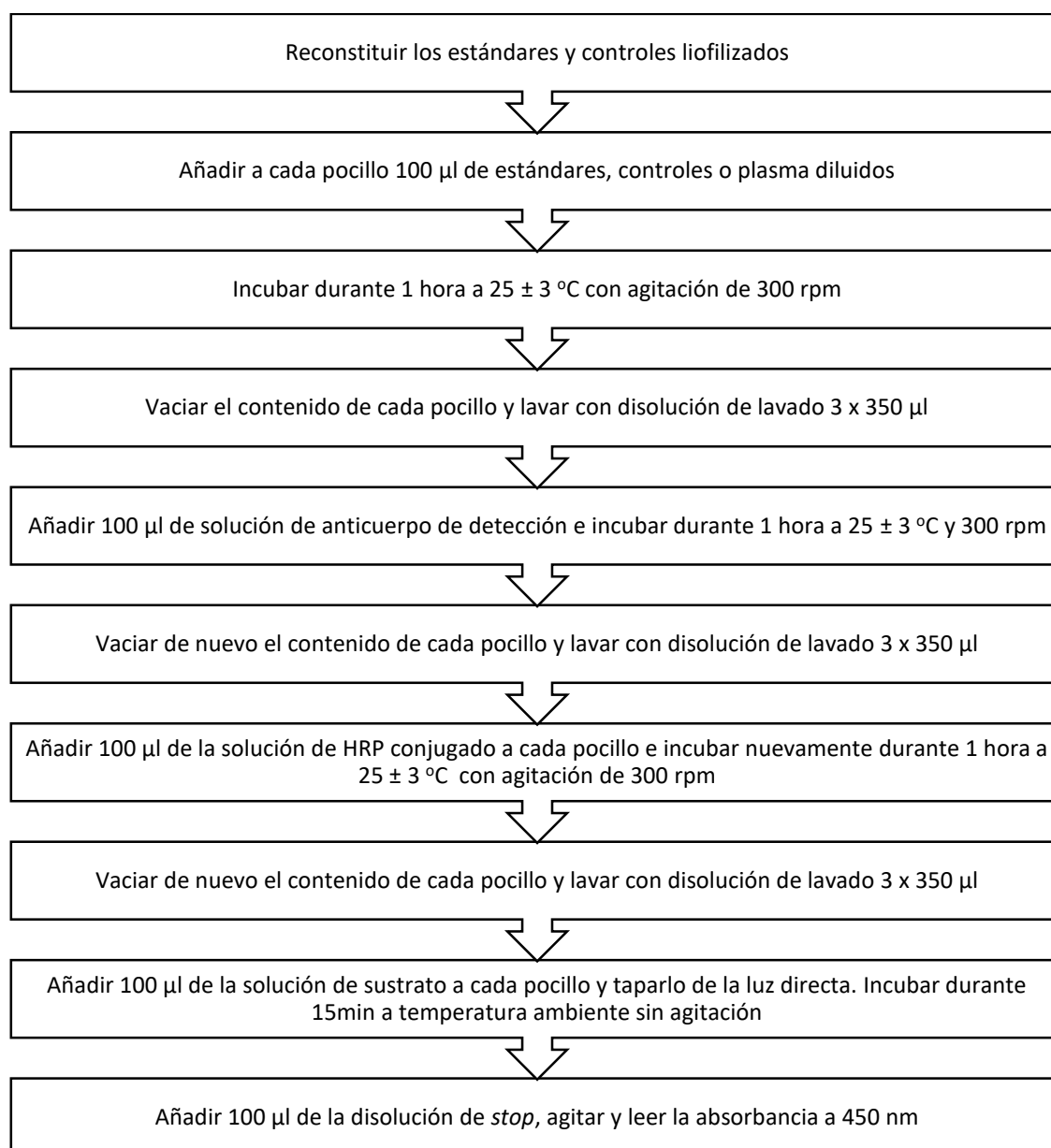


9.3. Biomarcadores de neurotoxicidad

9.3.1. Proteína S100B

Este test está basado en la unión de la proteína S100B con dos anticuerpos específicos, uno inmovilizado en el pocillo de la placa y el otro conjugado con HRP. Para ello se ha utilizado un kit comercial *S100B ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburgo, Alemania)* que permite determinar la concentración de S100B en suero y plasma humanos.

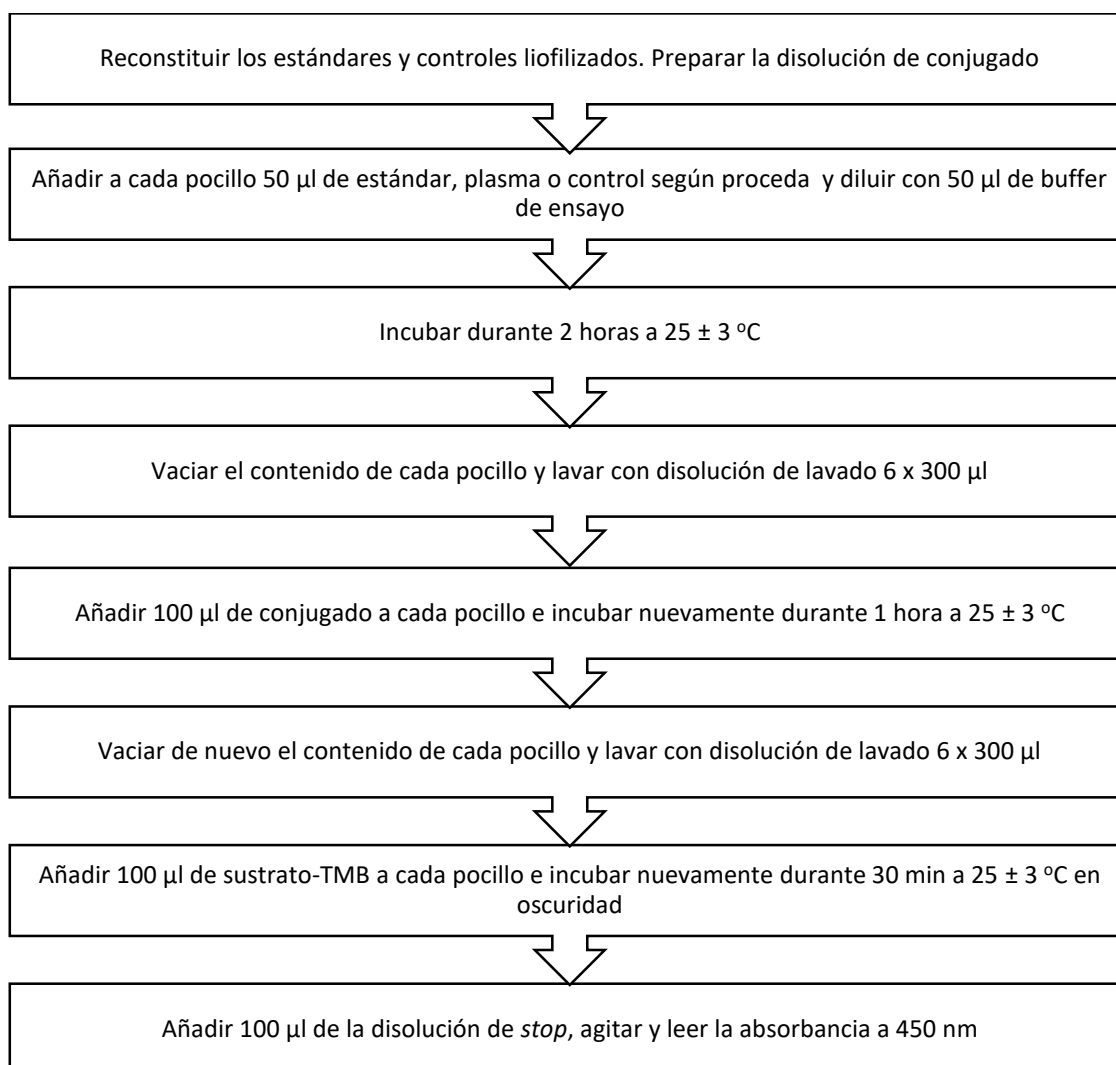
Se trata de un ensayo tipo *sandwich* que consiste en una unión en dos pasos en la que, tras cada incubación, se lleva a cabo un lavado para eliminar el reactivo que no se ha unido. Posteriormente, la enzima HRP que se encuentra en la fracción retenida reacciona con el sustrato (H_2O_2 y TMB) y desarrolla un color azul que cambia a amarillo al añadir la disolución *stop* (ácido sulfúrico). La intensidad del color, medida en el espectrofotómetro a 450 nm, es proporcional a la concentración de proteína S100B en la muestra, la cual se calcula a partir de una curva patrón. Para construirla se han usado los patrones del kit comercial, a los que se han añadido el punto 0, por lo que se han podido determinar valores en el rango de 0-5000 pg/ml.



9.3.2. Neurofilamento H fosforilado (pNF-H)

En este estudio se ha utilizado el kit *Human Phosphorylated Neurofilament H ELISA* (BioVendor Research and Diagnostic Products, Heidelberg, Alemania). Se trata de un inmunoensayo tipo *sandwich* para la determinación del pNF-H en muestras de suero, plasma y líquido cefalorraquídeo. En nuestro caso se han empleado muestras de plasma con EDTA como anticoagulante a las que se le ha añadido una concentración adicional de proteína estándar de 84 µg/ml, que hace las veces de patrón interno, antes de colocarlas junto a los puntos de la curva y los controles en los pocillos que contienen el anticuerpo retenido en la superficie. Tras la incubación y lavado, se ha añadido el anticuerpo de detección y posteriormente el conjugado HRP, realizando posteriormente los correspondientes lavados. Por último, la reacción se detiene

con la adición de una disolución de ácido y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Para su cuantificación se utilizó una curva patrón por comparaciones de absorbancias entre los patrones y las muestras.

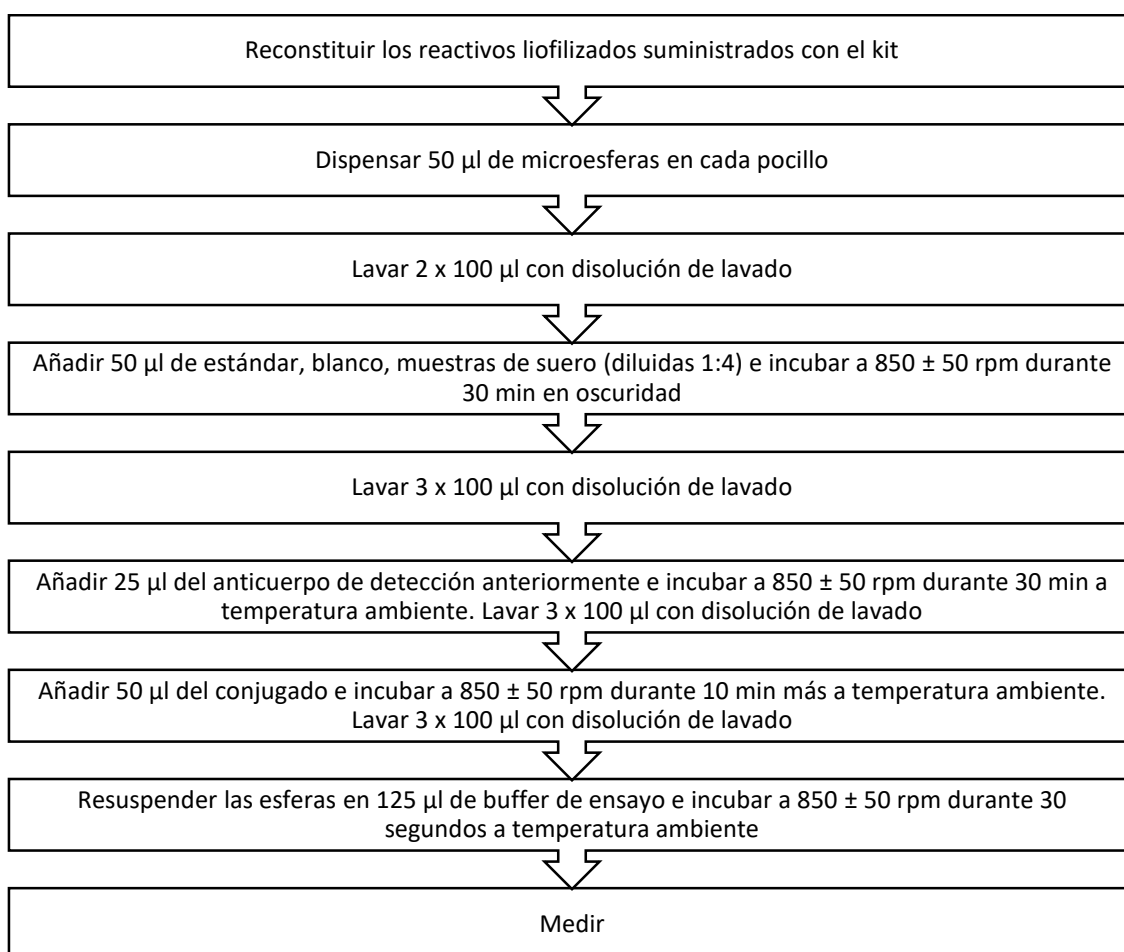


9.4. Parámetros inmunológicos

Los parámetros inmunológicos estudiados han sido citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y se determinaron utilizando kits comerciales con diferente número de marcadores mediante la técnica *Multiplex*. De todos ellos se eligió el *27-plex* de Bio-Rad, que determina simultáneamente 27 parámetros inmunológicos. A continuación se describen dichos parámetros, junto con sus regiones de trabajo (código de color único creado por las distintas proporciones de los dos fluoróforos que se usan para marcar internamente las microesferas) y límites de detección:

<i>Parámetro Inmunológico</i>		<i>Región</i>	<i>LOD (pg/ml)</i>
Interleuquinas	IL-1 β	39	0,47
	IL-1ra	25	2,70
	IL-2	38	1,20
	IL-4	52	0,25
	IL-5	33	1,30
	IL-6	19	1,63
	IL-7	74	1,02
	IL-9	77	1,24
	IL-10	56	2,14
	IL-12p70	75	2,33
	IL-13	51	0,43
	IL-15	73	1,47
	IL-17	76	1,54
	Otras citoquinas	IFN- γ	21
TNF- α		36	3,70
Factores de Crecimiento	VEGF	45	2,20
	Basic FGF	44	0,87
	GM-CSF	34	0,80
	PDGF-BB	47	1,07
	G-CSF	57	3,17
Quimioquinas	IL-8 (CXCL8)	54	2,40
	IP-10 (CXCL10)	48	1,28
	MCP-1 (CCL2)	53	1,67
	MIP-1 α (CCL3)	55	0,15
	MIP-1 β (CCL4)	18	0,39
	RANTES (CCL11)	37	0,97
	Eotaxina (CCL11)	43	1,72

La determinación simultánea de estos parámetros se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. En una primera etapa las microesferas magnéticas se agitan bien y se añaden a cada uno de los pocillos de la placa. A continuación, tras un lavado se añade la muestra que se une de manera específica a cada una de las microesferas marcadas. Posteriormente se realiza otro ciclo de lavado, se añade el anticuerpo de detección y se incuba la placa en agitación y en oscuridad (envolviendo la placa en papel de aluminio). Finalmente se añade el complejo estreptavidina-ficoeritrina mediante una reacción de biotización. De un modo esquemático, se puede resumir este proceso de la siguiente forma:



Los anticuerpos secundarios (de detección) se prepararon añadiendo 2700 µl de su diluyente a un tubo de propileno (Eppendorf). Por su parte, la solución stock de los anticuerpos se agita en un *vortex* y se centrifuga durante 30 segundos (un *spin*). Posteriormente se toman 300 µl del fondo del tubo y se añaden al tubo *Eppendorf*. Los anticuerpos se deben preparar como máximo 10 min antes de usarlos.

Los valores inferiores al LOD (no detectables) fueron imputados por el valor LOD/2.

10. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos se introdujeron en una base de datos del programa informático SPSS (versión 20.0). Se realizó un análisis descriptivo de las características de la población de estudio mediante medidas de tendencia central para variables continuas (biomarcadores, edad, índice de masa corporal, *etc.*) y proporciones para variables categóricas (sexo, expuesto o control, nacionalidad, *etc.*). Las concentraciones de los biomarcadores se analizaron mediante medidas de tendencia central (media geométrica y mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar, percentiles y rango). Los valores de los biomarcadores que eran inferiores al LOD se imputaron por LOD/2.

El contraste de las diferencias en los niveles de los biomarcadores entre el grupo expuesto y el control para cada periodo de estudio se realizó mediante pruebas paramétricas o no paramétricas, según la distribución de las variables. Se utilizó la prueba *t de Student* como prueba de significación de las diferencias entre los trabajadores de invernadero y los controles en relación con la edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC). Las variables categóricas (sexo, consumo de tabaco y de alcohol) se analizaron mediante la prueba de *chi-cuadrado* que permitió calcular *odds ratios* (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

Como los parámetros bioquímicos analizados se determinaron en dos periodos diferentes para cada sujeto de estudio, los resultados se analizaron mediante modelos mixtos lineales con medidas repetidas para los diferentes biomarcadores (transformados logarítmicamente o no según fuera necesario). En estos modelos, los individuos representan efectos aleatorios y los demás factores (estimación cruda de la exposición –expuestos vs. controles– y los dos periodos de estudio –alta vs. baja exposición a plaguicidas) se consideraron como efectos fijos. Además, los modelos se ajustaron por sexo, nacionalidad, edad e índice de masa corporal (IMC). Asimismo se utilizó el término de interacción exposición [expuestos vs. controles] * periodos de estudio [alta vs. baja exposición a plaguicidas]. Se escogió un modelo de varianza no estructurada para los análisis ya que ofrecía un mejor ajuste según el test de máxima verosimilitud.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS (SPSS 20.0 para Windows).

Capítulo 6

RESULTADOS

1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

En el presente estudio participaron un total de 280 individuos, de los cuales 189 eran trabajadores de agricultura intensiva y 91 controles no expuestos. Los trabajadores presentaban exposición ocupacional a plaguicidas como consecuencia del desempeño de su actividad laboral en invernaderos bajo plástico de la zona del Poniente almeriense. La Tabla 30 resume las principales características de la población de estudio.

Tabla 30. Características generales de la población de estudio

	<i>Total</i>	<i>Controles</i>	<i>Expuestos</i>	<i>p</i>
Edad (años)	41,9 ± 10,4 (n=223)	48,4 ± 8,4 (n=82)	38,1 ± 9,6 (n= 141)	< 0,001
Sexo	280	91	189	< 0,001
<i>Hombre</i>	130	25	105	
<i>Mujer</i>	150	66	84	
Peso (kg)	71,8 ± 14,7 (n=249)	69,3 ± 15,3 (n=90)	73,2 ± 14,8 (n=159)	< 0,050
Talla (cm)	166,7 ± 10,1 (n=243)	163,3 ± 10,0 (n=90)	168,7 ± 9,6 (n=153)	< 0,001
IMC (kg/m²)	25,7 ± 4,7 (n=241)	25,8 ± 4,5 (n=90)	25,7 ± 4,8 (n=151)	0,650
Tabaco	105	41	64	0,117
<i>Fumador</i>	54	25	29	
<i>Exfumador, no fumador</i>	51	16	35	
Alcohol	202	78	124	< 0,001
<i>Sí</i>	86	47	39	
<i>No</i>	118	31	85	

1.1. Edad

La edad media de la población de estudio fue 41,9 ± 10,4 años, encontrando diferencias significativas entre controles y expuestos (48,4 ± 8,4 frente a 38,1 ± 9,6 respectivamente, p < 0,001).

1.2. Sexo

El 46,8 % de la población de estudio son hombres y el 53,2 % mujeres. De entre el total de expuestos, el 56,1% eran hombres y el 43,9% eran mujeres, mientras que del total de controles el 27,5% eran hombres frente al 72,5% de mujeres. Se observaron diferencias estadísticas

significativas al comparar exposición por género ($p < 0,001$), pues en el grupo de expuestos predominaban los hombres mientras que en el control predominaban las mujeres (Figura 31).

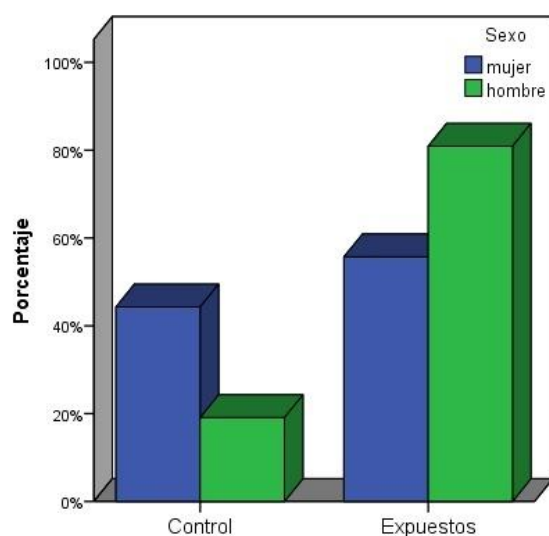


Figura 31. Distribución de la población por género

1.3. Peso, talla e IMC

La altura media de la población de estudio fue de $166,7 \pm 10,1$ cm, encontrando diferencias significativas entre controles y expuestos ($163,3 \pm 10,0$ cm frente a $168,7 \pm 9,6$ cm, respectivamente, $p < 0,001$). En lo que se refiere al peso, el peso medio de la población de estudio fue de $71,8 \pm 14,7$ kg y también se observaron diferencias significativas, ya que los expuestos pesaban casi 4 kg más que los controles ($73,2 \pm 14,8$ kg frente a $69,3 \pm 15,3$ kg, respectivamente). En relación al índice de masa corporal (IMC) el valor medio obtenido fue de $25,7 \pm 4,7$ kg/m², no encontrando diferencias significativas entre controles ($25,8 \pm 4,5$ kg/m²) y expuestos ($25,7 \pm 4,8$ kg/m²).

1.4. Consumo de tabaco

Del total de 105 individuos que contestaron a esta pregunta en la encuesta de salud, el 48,6 % era no fumador o exfumador mientras que el 51,4% admitió ser fumador. Al comparar consumo de tabaco por nivel de exposición (Figura 32) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,117$).

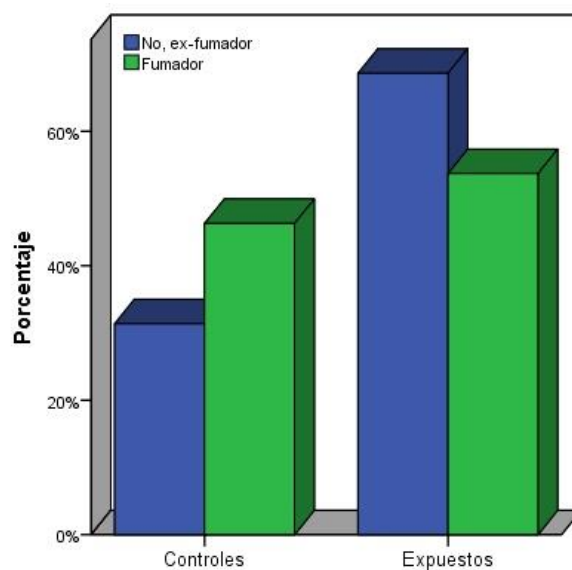


Figura 32. Consumo de tabaco en la población de estudio estratificada por exposición

1.5. Consumo de alcohol

De los 202 individuos que contestaron a esta pregunta, el 42,1 % respondió afirmativamente, mientras que el 57,9 % lo hizo negativamente. Al comparar consumo de alcohol por nivel de exposición (Figura 33) se observaron diferencias estadísticas significativas ya que los controles consumen más alcohol que los expuestos ($p < 0,001$).

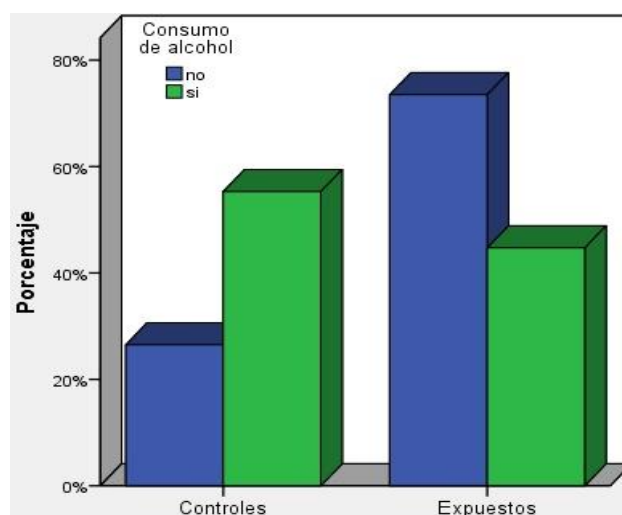


Figura 33. Consumo de alcohol en la población de estudio estratificada por exposición

2. BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

2.1. Metabolitos de plaguicidas OPs (dialquilfosfatos)

La Tabla 31 muestra el análisis descriptivo de la concentración de metabolitos de plaguicidas OPs (dialquilfosfatos o DAPs) en la población estudiada. Aunque también se determinaron una serie de metabolitos ácidos (ácido 3-fenoxibenzoico, metabolito común de piretroides y ácido 6-cloronicotínico, metabolito común de los neonicotinoides de primera generación), los resultados correspondientes al análisis de 75 muestras fueron todos negativos por lo que se decidió no seguir determinando estos metabolitos.

En el análisis bivalente expresado en la Tabla 31 no se observan diferencias significativas entre los periodos de alta y baja exposición para ninguno de los metabolitos, así como para la suma de los mismos (Σ DAPs) ni en la población total ni al estratificar por exposición (controles y expuestos). Las medias aritméticas fueron superiores en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, a excepción del DEDTP, cuyos valores fueron similares en ambos periodos debido a que en todos los casos estaban por debajo del LOD y la tabla expresa el valor imputado ($\text{LOD}/\sqrt{2}$). Por otro lado, al comparar trabajadores expuestos frente a controles en cada uno de los periodos de estudio se observaron diferencias significativas en DMP y suma de dimetilos (Σ DMSy próximas al nivel de significación para la Σ DAPs ($p = 0,077$) en el periodo de alta exposición. No obstante, la media aritmética de todos los DAPs, así como de sus sumas totales y parciales, es mayor en el periodo de alta exposición que en el de baja.

El porcentaje de muestras analizadas que se encontraban por debajo del LOD fue mayor en el periodo de baja exposición que en el de alta, así como en el grupo control con respecto al de expuestos. El 79 % de los individuos evaluados en el periodo de alta exposición presentaron al menos un metabolito DAP frente a un 73 % en baja exposición. Por grupos, los controles presentaron un 85 % de detectables en alta exposición frente a un 78 % en el de baja, mientras que los expuestos presentaron un 77 % de resultados detectables en el periodo de alta exposición frente a un 70 % en el de baja.

La Tabla 32 muestra el análisis de correlación de los DAPs en los dos periodos de estudio. En el de baja exposición existía una correlación positiva y significativa entre todos los parámetros y las sumatorias. Esta tendencia se repetía en el periodo de alta exposición con excepción de las

correlaciones del DEDTP con DMP, Σ DMs y Σ DAPs, donde no se observaron correlaciones significativas.

En las Tablas 33 y 34 se presentan los resultados del análisis de modelos mixtos lineales en el que los datos de DAPs se han transformado logarítmicamente y aquellos que estaban por debajo del LOD se les imputaron su valor. La Tabla 33 muestra las medias y errores estándar de cada DAP para controles y expuestos tanto en el periodo de alta como de baja exposición. Estos datos proceden de un modelo mixto ajustado por las siguientes variables: Alta vs. Baja exposición, Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. En este modelo, el valor de significación estadística (p) correspondía al término de la interacción y se observó que no había diferencias significativas para ninguno de los DAPs teniendo en cuenta tanto controles como expuestos y en ambos periodos de estudio (alta y baja exposición).

La Tabla 34 presenta los resultados del mismo modelo mixto pero ahora se indican los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Al comparar los periodos de alta frente a baja exposición se encontraron diferencias significativas solo en DMP, DMTP, Σ DMs y Σ DAPs ($p < 0,001$). Al comparar trabajadores frente a controles se observaron diferencias significativas en DMP, Σ DMs y Σ DAPs. No se observaron diferencias significativas en cuanto al género. Con respecto a la nacionalidad de los individuos, los españoles mostraron niveles significativamente más altos de DMP, DMTP, DEP, Σ DMs, Σ DEs y Σ DAPs que los marroquíes. Por último, se observó una asociación significativa de la edad con DEP y Σ DEs, de manera que la concentración urinaria de estos compuestos aumenta con la edad.

Tabla 31. Concentración urinaria de dialquilfosfatos (DAPs) en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) para los dos períodos de estudio

	<i>Periodo de alta exposición</i>							<i>Periodo de baja exposición</i>							<i>p valor</i> ^a
	<i>n</i>	<i>%<LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25-P75</i>	<i>n</i>	<i>%<LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25-P75</i>	
Total															
<i>DMP</i>	190	54,2	NC	452,61	NC	163,56	NC – 74,55	59	23,7	13,13	29,68	8,05	24,99	4,47 – 38,60	0,463
<i>DMTP</i>	190	94,9	NC	113,17	NC	42,53	NC – NC	59	57,9	NC	10,75	NC	7,6	NC – 5,74	0,249
<i>DMDTP</i>	190	96,6	NC	29,90	NC	12,75	NC – NC	59	87,4	NC	4,04	NC	5,39	NC – NC	0,753
<i>DEP</i>	190	35,6	NC	125,20	NC	40,15	NC – 22,70	59	47,9	NC	27,07	NC	23,26	NC – 31,79	0,917
<i>DETP</i>	190	94,9	NC	92,58	NC	23,13	NC – NC	59	70,0	NC	7,09	NC	5,55	NC – 5,22	0,116
<i>DEDTP</i>	190	100,0	NC	3,69	NC	4,14	NC – NC	59	100,0	NC	2,82	NC	4,25	NC – NC	0,753
Controles															
<i>DMP</i>	58	17,2	46,48	306,04	35,02	166,92	13,94 – 126,88	23	52,2	NC	33,46	NC	27,60	NC – 91,12	NC
<i>DMTP</i>	58	62,1	NC	72,50	5,64	35,05	NC – 3,09	23	95,7	NC	14,07	NC	8,13	NC – NC	NC
<i>DMDTP</i>	58	89,7	NC	22,60	4,68	10,83	NC – NC	23	95,7	NC	2,53	NC	5,12	NC – NC	NC
<i>DEP</i>	58	48,3	NC	167,61	8,91	56,57	NC – 26,08	23	30,4	NC	36,25	NC	29,30	NC – 39,53	NC
<i>DETP</i>	58	79,3	NC	45,85	4,35	14,09	NC – NC	23	95,7	NC	10,48	NC	6,52	NC – NC	NC
<i>DEDTP</i>	58	100,0	NC	1,81	3,89	4,06	NC – NC	23	100,0	NC	1,81	NC	4,06	NC – NC	NC
Expuestos															
<i>DMP</i>	132	26,5	26,90	504,78	NC	162,08**	NC – 63,24	36	55,5	NC	27,36	NC	23,32	NC – 59,89	0,463
<i>DMTP</i>	132	56,1	NC	127,10	NC	45,82	NC – 17,57	36	94,4	NC	8,17	NC	7,26	NC – NC	0,249
<i>DMDTP</i>	132	86,4	NC	32,64	NC	13,60	NC – NC	36	97,2	NC	4,79	NC	5,57	NC – NC	0,753
<i>DEP</i>	132	47,7	NC	101,10	NC	32,94	NC – 22,59	36	38,9	NC	18,69	NC	19,40	NC – 30,64	0,917
<i>DETP</i>	132	65,9	NC	106,77	NC	27,10	NC – 12,43	36	94,4	NC	3,66	NC	4,93	NC – NC	0,116
<i>DEDTP</i>	132	100,0	NC	3,33	NC	4,36	NC – NC	36	100,0	NC	3,33	NC	4,36	NC – NC	0,753

Continua →

Tabla 31 (continuación). Concentración urinaria de dialquilfosfatos (DAPs) en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por la exposición) para los dos periodos de estudio

	Periodo de alta exposición							Periodo de baja exposición							p valor ^a
	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 - P75	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 - P75	
Total															
ΣDMs	190	23,7	57,37	567,16	34,37	218,85	20,44 – 127,50	59	54,2	NC	38,96	NC	37,98	NC – 50,30	0,249
ΣDEs	190	43,7	NC	197,05	NC	67,43	NC – 43,47	59	35,6	NC	32,37	NC	33,05	NC – 19,11	0,345
ΣDAPs	190	21,1	92,75	671,79	60,61	286,28	NC – 156,05	59	27,1	NC	64,16	NC	71,04	NC – 87,01	0,463
Controles															
ΣDMs	58	17,2	79,17	335,47	52,89	212,80	23,91 – 237,60	23	52,2	NC	45,41	NC	40,85	NC – 54,00	NC
ΣDEs	58	46,5	NC	197,50	17,70	75,30	NC – 40,56	23	30,4	NC	44,63	NC	39,88	NC – 47,65	NC
ΣDAPs	58	15,5	114,48	487,68	73,91	288,10	44,11 – 292,68	23	21,7	85,92	54,41	57,93	80,73	26,78 – 95,67	NC
Expuestos															
ΣDMs	132	27,3	NC	644,26	NC	221,50**	NC – 93,58	36	55,5	NC	34,80	NC	36,15	NC – 49,77	0,249
ΣDEs	132	43,2	NC	197,47	NC	63,97	NC – 43,48	36	38,9	NC	20,83	NC	28,69	NC – 40,35	0,345
ΣDAPs	132	23,5	84,56	740,02	57,81	285,47	36,05 – 135,90	36	30,5	NC	45,61	NC	64,84	NC – 85,29	0,463

Unidades: DMP (dimetilfosfato; nmol/g creatinina), DMTP (dimetilfosfato; nmol /g creatinina), DMDTP (dimetilditiofosfato; nmol /g creatinina), DEP (dietilfosfato; nmol /g creatinina), DETP (dietilfosfato; nmol/g creatinina), DEDTP (dietilditiofosfato; nmol /g creatinina), ΣDMs (dimetilfosfatos totales; nmol/g creatinina), ΣDEs (dietilfosfatos totales; nmol/g creatinina), ΣDAPs (dialquilfosfatos totales; nmol/g creatinina).

n: Número de muestras; **% < LOD:** Porcentaje de casos no detectables; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 - P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%). **NC:** No calculado (el porcentaje de valores por debajo del LOD es superior al 25 %).

^a Prueba de Wilcoxon. Los valores estadísticos p para los controles en ambos periodos de exposición no se calcularon debido a que no hay casos válidos suficientes para realizar la prueba.

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 32. Correlación de Spearman de los diferentes dialqui fosfatos (DAPs) en los dos periodos de estudio con diferente exposición a plaguicidas

	Periodo de alta exposición								Periodo de baja exposición							
	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP	ΣDMs	ΣDEs	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP	ΣDMPs	ΣDEs
DMP																
DMTP	0,513**								0,644**							
DMDTP	0,305**	0,468**							0,657**	0,948**						
DEP	0,555**	0,325**	0,292**						0,487**	0,419**	0,421**					
DETP	0,262**	0,560**	0,413**	0,420**					0,596**	0,932**	0,883**	0,504**				
DEDTP	0,075	0,269**	0,791**	0,231**	0,437**				0,631**	0,994**	0,949**	0,419**	0,936**			
ΣDMs	0,981**	0,618**	0,376**	0,574**	0,335**	0,138			0,988**	0,698**	0,722**	0,480**	0,647**	0,683**		
ΣDEs	0,576**	0,438**	0,279**	0,908**	0,650**	0,220**	0,613**		0,547**	0,533**	0,532**	0,979**	0,620**	0,535**	0,556**	
ΣDAPs	0,925**	0,629**	0,351**	0,709**	0,445**	0,124	0,954**	0,771**	0,862**	0,611**	0,620**	0,780**	0,664**	0,601**	0,864**	0,836**

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 33. Concentración urinaria de dialquilfosfatos (DAPs, transformados logarítmicamente) en expuestos y controles y en cada uno de los dos períodos de estudio ¹. Unidades: nmol/g creatinina para todos los parámetros

	Período de alta exposición		Período de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
DMP	1,292 ± 0,090	1,982 ± 0,111	1,001 ± 0,097	1,388 ± 0,125	-0,249 (-0,620; 0,121)	0,186
DMTP	0,964 ± 0,063	1,198 ± 0,084	0,650 ± 0,045	0,783 ± 0,063	-0,101 (-0,314; 0,111)	0,347
DMDTP	0,686 ± 0,048	0,808 ± 0,059	0,601 ± 0,039	0,711 ± 0,050	-0,011 (-0,182; 0,159)	0,894
DEP	1,042 ± 0,073	1,200 ± 0,091	1,115 ± 0,096	1,215 ± 0,119	-0,057 (-0,392; 0,277)	0,735
DETP	0,801 ± 0,055	0,838 ± 0,067	0,572 ± 0,033	0,666 ± 0,042	-0,013 (-0,101; 0,075)	0,530
DEDTP	0,550 ± 0,020	0,576 ± 0,028	0,551 ± 0,023	0,564 ± 0,038	-0,013 (-0,101; 0,075)	0,765
ΣDMs	1,580 ± 0,077	2,120 ± 0,094	1,302 ± 0,068	1,611 ± 0,088	-0,230 (-0,518; 0,057)	0,116
ΣDEs	1,387 ± 0,059	1,502 ± 0,074	1,341 ± 0,068	1,445 ± 0,085	-0,012 (-0,260; 0,237)	0,927
ΣDAPs	1,834 ± 0,069	2,226 ± 0,085	1,635 ± 0,063	1,877 ± 0,080	-0,150 (-0,407; 0,107)	0,252

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [período de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 34. Análisis de modelos mixtos ¹ de los diferentes dialquilfosfatos (DAPs) en la población de estudio. Unidades: nmol/g creatinina para todos los parámetros

	DMP (n=173)	DMTP (n=173)	DMDTP (n=173)	DEP (n=173)	DETP (n=173)	DEDTP (n=173)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,540** (0,256; 0,825)	0,415** (0,238; 0,593)	0,097 (-0,034; 0,227)	-0,016 (-0,272; 0,241)	0,013 (-0,069; 0,094)	0,013 (-0,069; 0,094)
Expuestos vs. controles	-0,386* (-0,742; -0,031)	-0,133 (-0,314; 0,049)	-0,110 (-0,256; 0,036)	-0,100 (-0,432; 0,231)	-0,013 (-0,110; 0,085)	-0,013 (-0,110; 0,085)
Hombres vs. mujeres	-0,106 (-0,285; 0,072)	-0,018 (-0,130; 0,094)	0,011 (-0,074; 0,097)	-0,018(-0,181; 0,146)	0,039 (-0,013; 0,090)	0,039 (-0,013; 0,090)
Español vs. Marroquí	0,444** (0,209; 0,680)	0,178* (0,032; 0,324)	0,084 (-0,027; 0,194)	0,278* (0,062; 0,495)	-0,004 (-0,072; 0,064)	-0,004 (-0,072; 0,064)
Edad	-0,003 (-0,012; 0,005)	-0,004 (-0,009; 0,001)	-0,002 (-0,006; 0,002)	0,011* (0,002; 0,019)	-0,001 (-0,003; 0,002)	-0,001 (-0,003; 0,002)
IMC	-0,001 (-0,018; 0,017)	-0,001 (-0,0012; 0,011)	-0,002 (-0,010; 0,007)	-0,008 (-0,025; 0,009)	-0,001 (-0,006; 0,005)	-0,001 (-0,006; 0,005)
Interacción	-0,249 (-0,620; 0,121)	-0,101 (-0,314; 0,111)	-0,011 (-0,182; 0,159)	-0,057 (-0,392; 0,277)	-0,013 (-0,101; 0,075)	-0,013 (-0,101; 0,075)

Continua →

Tabla 34 (continuación). Análisis de modelos mixtos ¹ de las sumas de dialquilfosfatos (DAPs) en la población de estudio. Unidades: nmol/g creatinina para todos los parámetros

	Σ DMs (n=173)	Σ DEs (n=173)	Σ DAPs (n=173)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,508** (0,288; 0,729)	0,057 (-0,133; 0,247)	0,348** (0,152; 0,545)
Expuestos vs. controles	-0,309* (-0,567; -0,051)	-0,104 (-0,344; 0,136)	-0,242* (-0,474; -0,011)
Hombres vs. mujeres	-0,124# (-0,256; 0,007)	-0,020 (-0,147; 0,107)	-0,090 (-0,218; 0,038)
Español vs. Marroquí	0,347** (0,170; 0,524)	0,213* (0,046; 0,380)	0,316** (0,149; 0,483)
Edad	-0,004 (-0,010; 0,003)	0,006# (-0,001; 0,012)	0,001 (-0,006; 0,007)
IMC	-0,003 (-0,016; 0,009)	-0,006 (-0,019; 0,008)	-0,003 (-0,016; 0,009)
Interacción	-0,230 (-0,518; 0,057)	-0,012 (-0,260; 0,237)	-0,150 (-0,407; 0,107)

¹ Modelos mixtos lineales con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, # $p < 0,1$

2.2. Esterasas

Las Tablas 35 y 36 muestran el análisis descriptivo de las esterazas estudiadas, tanto colinesterasas como PON1, usando diferentes sustratos. En cuanto a colinesterasas (Tabla 35), al considerar toda la población de estudio se observaron diferencias significativas en la BuChE y BeChE al comparar sus valores en el periodo de alta exposición frente al de baja (análisis de muestras apareadas). Sin embargo, al estratificar la población en controles y expuestos se observó que los controles presentaban niveles significativamente más altos de AChE y BuChE en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por el contrario, los expuestos presentaban niveles significativamente más bajos de AChE y BeChE pero más altos de BuChE en el periodo de alta exposición con respecto al de baja.

La Tabla 35 muestra también la comparación entre controles y expuestos en cada uno de los periodos de estudio. Así, los expuestos mostraron un descenso significativo de AChE y un

aumento significativo de BeChE en cada periodo. Asimismo, los expuestos tenían valores significativamente más altos de BuChE pero solo en el periodo de baja exposición.

La Tabla 36 expresa los datos descriptivos y análisis bivariante de las diversas actividades PON1. Al considerar toda la población de estudio se observó una actividad POasa (basal y estimulada con sal) significativamente más alta en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Al estratificar la población por exposición, tanto controles como expuestos presentaron niveles significativamente más altos de POasa (basal y estimulada con sal) y de AREasa en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Ni DZOasa ni DHCasa mostraron diferencias significativas al comparar ambos periodos entre sí. Por el contrario, al comparar controles con expuestos en cada uno de los periodos de estudio se observó que los expuestos presentaban niveles significativamente más altos de POasa (basal y estimulada con sal) y DZOasa, pero más bajos de DHCasa en el periodo de alta exposición. Sin embargo, en el de baja exposición, los expuestos presentaron niveles significativamente más altos de POasa basal, AREasa y DZOasa; pero más bajos de DHCasa.

La Tabla 37, muestra el análisis de correlación entre las esterasas en cada uno de los periodos de estudio. En ambos periodos se observa una correlación inversa significativa de la AChE con la BeChE y directa con la DHCasa. La AChE también muestra una correlación inversa con la POasa (basal y salina) en el periodo de alta exposición y con la AREasa en baja exposición. Por su parte, la BeChE muestra una correlación directa con BuChE, AREasa y DZOasa en ambos periodos de estudio; además, en el de baja exposición mostró una correlación directa con POasa basal e inversa con DHCasa. En el caso de la BuChE, se observó una correlación directa con AREasa y DZOasa en ambos periodos de estudio y con la DHCasa en el de alta exposición. La POasa basal, mostró una fuerte correlación positiva con la POasa salina en ambos periodos y, además una correlación inversa con la DZOasa en el de alta exposición. La AREasa, por su parte, mostró una correlación directa con la DZOasa en ambos periodos y con la DHCasa solo en alta exposición. Finalmente, la DHCasa mostró una correlación positiva con DZOasa en ambos periodos de estudio.

Las Tablas 38, 39 y 40 muestran los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para las esterasas ajustados por: periodo de exposición (Alta vs. Baja exposición), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. Previamente los datos de AChE, BuChE, BeChE, POasa y ssPOasa fueron transformados logarítmicamente. La Tabla 38 muestra las

medias y errores estándar de cada esterasa para controles y expuestos en cada periodo de estudio. Se observan diferencias estadísticamente significativas para el término de interacción en el caso de AChE, BeChE y AREasa. Las Tablas 39 y 40 presentan los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Al comparar los periodos de alta exposición frente al de baja se observan diferencias significativas en AChE, BuChE, POasa basal y AREasa. Los expuestos presentaban niveles más altos de BeChE y AREasa, y más bajos de DHCasa. En cuanto al sexo los hombres presentaron niveles más bajos de BeChE, BuChE que las mujeres. Por nacionalidad, los españoles mostraron niveles más bajos de AChE que los marroquíes. No se observaron diferencias significativas por edad y, en cuanto al IMC, se observó una asociación directa con la BuChE y AREasa.

Tabla 35. Actividades colinesterasas en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p-valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
AChE	163	21,66	6,85	22,50	22,70	16,38 – 28,57	182	22,35	5,94	22,60	23,10	19,01 – 26,90	0,589
BuChE	188	4511,07	960,51	4551,15	4626,46	4013,49 – 5179,56	179	4213,06	1031,75	4214,10	4354,21	3710,35 – 5060,00	< 0,001
BeChE	190	880,30	212,44	901,90	907,87	763,56 – 1046,78	179	997,60	336,04	1043,85	1052,46	833,68 – 1257,35	< 0,001
Controles													
AChE	63	29,02	4,11	29,42	29,31	26,42 – 31,46	68	26,54	5,56	26,95	27,13	24,21 – 29,82	0,008
BuChE	59	7373,88	1049,53	4440,60	4504,03	3735,25 – 4173,23	64	3984,92	1085,43	4018,05	4150,01	3336,30 – 5028,21	< 0,001
BeChE	61	809,95	219,88	830,35	839,16	647,53 – 995,53	64	807,96	232,57	838,05	844,99	694,47 – 996,29	0,755
Expuestos													
AChE	100	18,01	4,58	17,89	18,53**	14,98 – 21,47	114	20,17	4,75	20,12	20,69**	17,98 – 23,03	0,003
BuChE	129	4575,24	915,77	4633,20	4682,46	4116,35 - 5184,50	115	4345,63	987,23	4289,70	4467,85*	3855,43 – 5064,45	0,006
BeChE	129	915,67	201,65	925,14	940,36**	807,73 – 1071,23	115	1121,80	329,87	1143,55	1167,93**	988,74 – 1306,00	< 0,001

Unidades: AChE (acetilcolinesterasa; U/g de hemoglobina), BuChE (butirilcolinesterasa; U/l), BeChE (benzoilcolinesterasa; U/ml).

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % - 75%).

^a Prueba de Wilcoxon (AChE) y prueba t de muestras relacionadas (BuChE y BeChE).

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney para AChE y t de Student para BuChE y BeChE).

Tabla 36. Actividades PON1 en la población de estudio (en su conjunto y estratificado por la exposición) para los dos periodos de estudio

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
POasa	184	183,81	125,81	197,64	221,09	100,49 – 312,12	155	156,98	115,91	158,36	191,23	91,32 – 278,17	< 0,001
ssPOasa	184	335,73	270,45	381,33	425,81	175,32 – 645,21	155	300,51	266,71	309,31	385,69	163,94 – 563,33	< 0,001
AREasa	184	110,77	26,22	114,04	114,02	96,01 – 131,89	156	117,25	88,80	115,49	131,34	96,64 – 141,92	0,164
DZOasa	185	8,40	3,06	8,75	8,94	6,47 – 10,98	155	8,10	2,90	8,94	8,72	6,98 – 10,80	0,313
DHCasa	184	11,27	3,71	12,01	11,92	9,10 – 14,28	154	11,87	3,40	11,96	12,32	9,89 – 14,05	0,358
Controles													
POasa	61	145,24	120,59	103,03	179,04	85,40 – 261,50	63	125,92	96,27	136,09	153,23	72,41 – 220,07	< 0,001
ssPOasa	61	293,72	248,34	215,05	372,18	160,71 – 619,36	63	296,56	231,34	366,36	369,30	159,43 – 548,27	0,004
AREasa	61	107,89	25,23	114,77	111,18	92,95 – 128,70	64	93,65	23,70	101,00	96,92	77,32 – 113,91	< 0,001
DZOasa	62	7,60	2,56	7,93	8,06	6,06 – 10,15	63	7,37	3,39	8,07	8,20	5,26 – 10,69	0,618
DHCasa	61	14,59	2,76	14,41	14,86	12,79 – 17,19	62	14,28	3,15	14,05	14,60	12,34 – 19,57	0,115
Expuestos													
POasa	123	206,58	123,62	243,46	241,93**	136,50 – 329,69	92	182,57	121,40	170,96	217,24**	120,67 – 323,79	0,071
ssPOasa	123	358,74	277,91	444,00	452,41*	193,69 – 660,87	92	303,24	289,14	304,36	396,91	166,65 – 565,54	< 0,001
AREasa	123	112,22	26,69	113,93	115,42	97,20 – 134,17	92	137,10	107,85	130,07	155,28**	107,31 – 152,76	0,036
DZOasa	123	8,84	3,20	9,08	9,38*	6,67 – 11,59	92	8,65	2,46	9,46	9,07**	7,72 – 11,02	0,389
DHCasa	123	9,92	3,24	10,65	9,88**	7,96 – 12,60	92	10,48	2,62	10,81	10,79**	9,11 – 12,39	0,878

Unidades: POasa y ssPOasa (paraoxón como sustrato; U/l), AREasa (fenil acetato como sustrato; U/l), DZOasa (diazoxon como sustrato; U/l), DHCasa (dihidrocumarina como sustrato; U/ml).

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%).

^a Prueba de Wilcoxon

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney para POasa y ssPOasa y t de Student para DZOasa, AREasa y DHCasa [estas dos últimas solo en alta exposición]).

Tabla 37. Análisis de correlación de Spearman de las diferentes esterasas estudiadas en los dos periodos de estudio.

	<i>Periodo de alta exposición</i>							<i>Periodo de baja exposición</i>						
	<i>AChE</i>	<i>BeChE</i>	<i>BuChE</i>	<i>POasa</i>	<i>ssPOasa</i>	<i>AREasa</i>	<i>DZOasa</i>	<i>AChE</i>	<i>BeChE</i>	<i>BuChE</i>	<i>POasa</i>	<i>ssPOasa</i>	<i>AREasa</i>	<i>DZOasa</i>
<i>AChE</i>														
<i>BeChE</i>	-0,160*							-0,406**						
<i>BuChE</i>	-0,082	0,833**						-0,109	0,640**					
<i>POasa</i>	-0,356**	0,073	0,090					-0,125	0,226**	0,157				
<i>ssPOasa</i>	-0,236**	0,032	0,082	0,950**				0,079	0,045	0,123	0,912**			
<i>AREasa</i>	0,010	0,310**	0,247**	-0,080	-0,063			-0,231**	0,419**	0,217**	0,155	0,088		
<i>DZOasa</i>	-0,113	0,245**	0,165*	-0,206**	-0,215**	0,737**		-0,033	0,251**	0,195*	-0,119	-0,141	0,489**	
<i>DHCasa</i>	0,524**	0,117	0,182*	-0,130	-0,033	0,489**	0,434**	0,388**	-0,261**	-0,009	-0,123	0,065	0,019	0,390**

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 38. Niveles de esterasas sanguíneas en la población de estudio (expuestos y controles) en los dos períodos de estudio (alta vs. baja exposición a plaguicidas) ¹. Unidades: AChE (U/g de hemoglobina), BeChE y DHCasa (U/ml) y BuChE, POasa, ssPOasa, AREasa y DZOasa (U/l).

	<i>Periodo de alta exposición</i>		<i>Periodo de baja exposición</i>		<i>Diferencia de medias (95 % CI)</i>	<i>p</i>
	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>		
AChE	1,298 ± 0,012	1,415 ± 0,013	1,376 ± 0,012	1,376 ± 0,014	-0,087 (-0,126; -0,048)	< 0,001
BeChE	2,948 ± 0,016	2,924 ± 0,020	3,022 ± 0,016	2,921 ± 0,021	-0,077 (-0,115; -0,040)	< 0,001
BuChE	3,671 ± 0,015	3,630 ± 0,019	3,640 ± 0,015	3,588 ± 0,020	-0,010 (-0,039; 0,018)	0,470
POasa	2,262 ± 0,038	2,202 ± 0,044	2,226 ± 0,036	2,110 ± 0,043	-0,056 (-0,116; 0,004)	0,069
ssPOasa	2,538 ± 0,044	2,475 ± 0,051	2,475 ± 0,042	2,449 ± 0,050	0,037 (-0,020; 0,094)	0,201
AREasa	112,807 ± 4,163	114,864 ± 4,651	121,635 ± 3,861	101,209 ± 4,419	-22,482 (-30,368; -14,596)	< 0,001
DZOasa	8,946 ± 0,424	8,424 ± 0,471	8,762 ± 0,380	8,325 ± 0,455	0,085 (-0,951; 1,122)	0,870
DHCasa	10,713 ± 0,439	14,596 ± 0,491	10,853 ± 0,370	14,189 ± 0,450	-0,547 (-1,672; 0,578)	0,338

¹ Análisis de modelos mixtos con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos de AChE, BeChE, BuChE, POasa y ssPOasa fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 39. Análisis de modelos mixtos ¹ de las colinesterasas en la población de estudio. Unidades: AChE (U/g de hemoglobina), BeChE (U/ml) y BuChE (U/l).

	AChE (n=186)	BeChE (n=182)	BuChE (n=183)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	0,039* (0,010; 0,068)	0,003 (-0,026; 0,032)	0,041** (0,019; 0,063)
Expuestos vs. controles	-0,030 (-0,072; 0,012)	0,101* (0,039; 0,163)	0,051# (-0,006; 0,109)
Hombres vs. mujeres	0,019 (-0,005; 0,042)	-0,063* (-0,101; -0,025)	-0,055* (-0,091; -0,019)
Español vs. Marroquí	-0,098** (-0,134; -0,063)	0,014 (-0,042; 0,069)	-0,049# (-0,101; 0,003)
Edad	0,001 (-0,001; 0,002)	0,001 (-0,001; 0,003)	0,001 (-0,001; 0,002)
IMC	-0,001 (-0,004; 0,002)	0,007* (0,003; 0,011)	0,007* (0,003; 0,011)
Interacción	-0,087** (-0,126; -0,048)	-0,077** (-0,115; -0,040)	-0,010 (-0,039; 0,018)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos de AChE, BeChE y BuChE fueron transformados logarítmicamente. Interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

Tabla 40. Análisis de modelos mixtos ¹ de las diferentes actividades PON1 en la población de estudio. Unidades: DHCasa (U/ml) y POasa, ssPOasa, AREasa y DZOasa (U/l).

	POasa (n=181)	ssPoasa (n=181)	AREasa (n=176)	DZOasa (n=181)	DHCasa (n=181)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	0,091** (0,048; 0,135)	0,026 (-0,015; 0,068)	13,654** (7,963; 19,346)	0,099 (-0,653; 0,850)	0,406 (-0,417; 1,229)
Expuestos vs. controles	0,116# (-0,016; 0,248)	0,026 (-0,130; 0,181)	20,425** (6,421; 34,429)	0,437 (-0,931; 1,805)	-3,336** (-4,679; -1,992)
Hombres vs. mujeres	-0,072 (-0,159; 0,015)	-0,040 (-0,142; 0,063)	-0,279 (-8,953; 8,394)	-0,538 (-1,411; 0,336)	0,123 (-0,745; 0,991)
Español vs. Marroquí	0,038 (-0,085; 0,160)	-0,010 (-0,154; 0,135)	10,834# (-1,964; 23,633)	0,475 (-0,768; 1,718)	-0,477 (-1,702; 0,747)
Edad	0,001 (-0,004; 0,005)	0,002 (-0,003; 0,007)	-0,303 (-0,739; 0,133)	-0,021 (-0,065; 0,024)	-0,007 (-0,051; 0,037)
IMC	-0,005 (-0,015; 0,004)	-0,005 (-0,016; 0,006)	1,403* (0,401; 2,405)	-0,011 (-0,108; 0,087)	0,035 (-0,062; 0,132)
Interacción	-0,056# (-0,116; 0,004)	0,037 (-0,020; 0,094)	-22,482** (-30,368; -14,596)	0,085 (-0,951; 1,122)	-0,547 (-1,672; 0,578)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos de POasa y ssPOasa fueron transformados logarítmicamente. Interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3. BIOMARCADORES DE EFECTO TÓXICO

3.1. Biomarcadores de estrés oxidativo

La Tabla 41 muestra el análisis descriptivo y bivalente de los biomarcadores de estrés oxidativo estudiados. Al considerar toda la población de estudio se observaron diferencias significativas en TBARS, SHT y GGT, pues en el periodo de alta exposición los valores de SHT y GGT eran mayores y el de TBARS menor que en el periodo de baja exposición. Al estratificar por exposición, los controles presentaban valores significativamente más bajos de TBARS y FRAS en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por su parte, los expuestos presentaban valores significativamente más bajos de TBARS y más altos de SHT en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Al comparar entre sí controles y expuestos en cada periodo de estudio, se observó que el grupo de expuestos presentaba valores significativamente más altos de TBARS y SHT en ambos periodos de estudio así como de FRAS en el periodo de alta exposición y de GGT en el de baja.

La Tabla 42 muestra el análisis de correlación entre los diversos biomarcadores de estrés oxidativo en los dos periodos de estudio. Se observó una correlación significativa de FRAS con SHT y GGT en ambos periodos. A su vez, en el de alta exposición se observó una correlación significativa entre TBARS y SHT y en el de baja exposición entre TBARS y FRAS así como entre SHT y GGT. Todas estas correlaciones eran de carácter positivo.

Las Tablas 43 y 44 muestran los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para los biomarcadores de estrés oxidativo ajustados por periodo de exposición (Alta vs. Baja exposición), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. Previamente los datos fueron transformados logarítmicamente ya que no seguían una distribución normal. La Tabla 44 muestra las medias y errores estándar de los biomarcadores de estrés oxidativo en controles y expuestos en cada periodo de estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el término de interacción en el caso de TBARS y SHT. Esto indica que los expuestos presentan valores significativamente más altos de ambos biomarcadores con respecto a los controles y en el periodo de alta exposición con respecto al de baja.

La Tabla 45 presenta los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Al comparar los periodos de alta frente a baja exposición se encontraron diferencias significativas en TBARS, FRAS y GGT. En cuanto al sexo los hombres presentaron niveles más altos de TBARS y GGT que las mujeres. En relación al IMC, se observó una asociación directa con la GGT. El resto de variables de ajuste no mostraron asociación significativa.

Tabla 41. Biomarcadores de estrés oxidativo en la población total (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
TBARS	144	1,43	0,72	1,61	1,62	1,08 – 2,02	113	2,39	0,85	2,42	2,54	1,99 – 2,98	< 0,001
SHT	185	0,51	0,17	0,53	0,54	0,40 – 0,65	173	0,43	0,19	0,42	0,46	0,35 – 0,54	0,001
FRAS	183	572,63	218,40	588,39	608,72	433,17 – 742,17	173	624,91	216,26	616,25	658,32	492,47 – 798,54	0,191
GGT	193	24,41	20,99	22,00	27,94	18,00 – 31,00	200	23,04	19,82	22,00	26,46	17,00 – 29,00	0,025
Controles													
TBARS	51	1,18	0,72	1,42	1,41	0,93 – 1,75	63	2,24	0,82	2,36	2,39	1,89 – 2,87	< 0,001
SHT	62	0,39	0,10	0,37	0,37	0,32 – 0,46	62	0,39	0,15	0,39	0,41	0,31 – 0,47	0,664
FRAS	60	426,13	107,81	416,64	437,98	355,13 – 489,24	62	595,19	204,22	583,54	625,53	471,02 – 770,70	< 0,001
GGT	64	23,46	13,92	23,50	25,80	17,25 – 30,50	90	20,97	12,21	20,00	23,33	15,00 – 27,00	0,067
Expuestos													
TBARS	93	1,59	0,70	1,74	1,74**	1,18 – 2,12	50	2,60	0,85	2,57	2,73*	2,17 – 3,34	0,004
SHT	123	0,59	0,14	0,61	0,61**	0,51 – 0,69	111	0,45	0,21	0,44	0,49**	0,36 – 0,57	< 0,001
FRAS	123	661,41	210,25	677,93	692,01**	530,83 – 804,43	111	642,91	221,49	624,58	676,63	507,50 – 845,08	0,227
GGT	129	24,89	23,72	22,00	29,00	18,00 – 31,00	110	24,89	24,10	23,00	29,01*	18,00 – 32,00	0,208

Unidades: GGT (gamma glutamiltransferasa; U/l), SHT (grupos tiólicos totales; mmol/l), FRAS (capacidad reductora del hierro en suero; μmol/l), TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; μmol/l).

n: Número de muestras; *M_G:* Media geométrica; *SD:* Desviación estándar; *M_A:* Media aritmética; *MED:* Mediana; *P25 – P75:* Rango intercuartil (percentiles 25 % - 75%).

^a Prueba de Wilcoxon.

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 42. Correlaciones Spearman entre los biomarcadores de estrés oxidativo estudiados en los dos periodos de estudio con diferente exposición a los pesticidas

	Periodo de alta exposición			Periodo de baja exposición		
	TBARS	SHT	FRAS	TBARS	SHT	FRAS
TBARS						
SHT	0,247**			0,101		
FRAS	0,065	0,670**		0,273**	0,383**	
GGT	0,118	0,097	0,151*	0,120	0,280**	0,379**

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 43. Niveles de los marcadores de estrés oxidativo en suero en la población de estudio (expuestos y controles) estratificadas por los dos periodos de la temporada estudiadas (alta vs. baja exposición a plaguicidas)¹. Unidades: GGT (U/l), SHT (mmol/l) y FRAS y TBARS ($\mu\text{mol/l}$)

	Periodo de alta exposición		Periodo de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
TBARS	2,800 \pm 0,017	2,664 \pm 0,020	2,796 \pm 0,015	2,810 \pm 0,021	0,151 (0,088; 0,213)	< 0,001
SHT	0,249 \pm 0,015	-0,398 \pm 0,019	-0,360 \pm 0,019	-0,389 \pm 0,026	0,120 (0,058; 0,182)	< 0,001
FRAS	0,173 \pm 0,037	0,129 \pm 0,041	0,384 \pm 0,025	0,376 \pm 0,031	0,036 (-0,069;0,142)	0,497
GGT	1,412 \pm 0,025	1,348 \pm 0,031	1,392 \pm 0,022	1,318 \pm 0,029	0,009 (-0,050; 0,032)	0,666

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por periodo de exposición alta vs. baja, expuestos vs .controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media \pm error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 44. Análisis de modelos mixtos ¹ para los diferentes marcadores de estrés oxidativo en la población de estudio. Unidades: GGT (U/l), SHT (mmol/l), FRAS y TBARS (μmol/l)

	TBARS (n=156)	SHT (n=183)	FRAS (n=182)	GGT (n=182)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	-0,146** (-0,193; -0,099)	-0,009 (-0,056; 0,038)	-0,248** (-0,318; -0,177)	0,030* (0,000; 0,059)
Expuestos vs. Controles	-0,014 (-0,071; 0,042)	0,029 (-0,040; 0,099)	0,008 (-0,076; 0,093)	0,074# (-0,014; 0,162)
Hombres vs. Mujeres	0,100** (0,069; 0,132)	0,031# (-0,003; 0,065)	-0,009 (-0,068; 0,051)	0,143** (0,089; 0,197)
Español vs. Marroquí	-0,028 (-0,075; 0,018)	-0,017# (-0,070; 0,036)	-0,071 (-0,160; 0,017)	0,068 (-0,014; 0,150)
Edad	0,000 (-0,002; 0,002)	-0,002 (-0,004; 0,000)	-0,001 (-0,004; 0,002)	0,000 (-0,002; 0,003)
IMC	0,003 (-0,001; 0,007)	0,003 (-0,001; 0,007)	0,006# (-0,001; 0,013)	0,015** (0,009; 0,021)
Interacción	0,151** (0,088; 0,213)	0,120** (0,058; 0,182)	0,036 (-0,069; 0,142)	-0,009 (-0,050; 0,032)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3.2. Biomarcadores de nefrotoxicidad

La Tabla 45 muestra el análisis descriptivo y bivariante de los parámetros de nefrotoxicidad estudiados. Al considerar toda la población de estudio y comparar los periodos de alta y baja exposición, se observó diferencias significativas en la albúmina, TFF3, cistatina C plasmática, creatinina plasmática y en el IFG, mostrando todos valores más altos en el periodo de alta exposición excepto el IFG, que presentaba valores más bajos. Sin embargo, al estratificar la población en controles y expuestos se observó que los controles presentan niveles significativamente más altos de cistatina C plasmática y albúmina; y más bajos de osteopontina en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por su parte, los expuestos presentaban niveles significativamente más altos de albúmina, TFF3 y cistatina C y creatinina plasmáticas; y niveles significativamente más bajos de IFG en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por otro lado, al comparar controles y expuestos en cada uno de los periodos de estudio se observó que los expuestos presentan niveles significativamente más altos de TFF3 e IFG que los controles en ambos periodos. Asimismo, los expuestos presentaban valores significativamente más altos de osteopontina y más bajos de cistatina C plasmática en el periodo de alta exposición y niveles más bajos de creatinina plasmática en el periodo de baja exposición.

La Tabla 46 muestra el análisis descriptivo y bivariante de los parámetros de nefrotoxicidad pero en este caso normalizados por creatinina urinaria. Al considerar toda la población de estudio se observó que la albúmina y TFF3 mostraban niveles significativamente más altos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Al estratificar la población por exposición, tanto controles como expuestos, presentaban niveles significativamente mayores de TFF3 y menores de osteopontina en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Además, los controles mostraban niveles significativamente más altos de albúmina en el periodo de alta exposición en comparación al de baja. Al efectuar la comparación entre controles y expuestos en cada uno de los periodos de estudio se observó que los expuestos presentan niveles significativamente más altos de TFF3 en ambos periodos y de osteopontina solo en el de alta exposición.

La Tabla 47 muestra el análisis de correlación entre los biomarcadores de nefrotoxicidad estudiados para cada uno de los periodos de estudio. Se observó una correlación significativa y directa entre todos los parámetros urinarios ensayados mediante la técnica *Multiplex* (albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, osteopontina y TFF3) y en ambos periodos de exposición. Por su parte, se apreció una correlación significativa e inversa de la creatinina plasmática con la cistatina C

urinaria y NGAL en ambos periodos de estudio. Asimismo, existía una correlación significativa y directa entre el IFG y el TFF3 en ambos periodos. Por su parte, en el periodo de baja exposición se observó que la creatinina plasmática mostraba una correlación significativa e inversa con la albúmina y β 2M, mientras que en el periodo de alta exposición mostraba una correlación directa con el TFF3. Finalmente, el IFG mostraba una correlación positiva con la osteopontina y la cistatina C plasmática y negativa con la creatinina plasmática en el periodo de alta exposición.

En las Tablas 48 y 49 se presentan los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para los biomarcadores de nefrotoxicidad transformados logarítmicamente (ya que no seguían una distribución normal) y ajustado por periodo de exposición (Alta vs. Baja), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. La Tabla 48 muestra las medias y errores estándar de los biomarcadores de nefrotoxicidad para controles y expuestos en cada periodo de estudio. El término de interacción fue estadísticamente significativo para osteopontina y TFF3 en orina, cistatina C y creatinina plasmáticas y para el IFG. Esto supone que los expuestos presentaban valores significativamente más altos que los controles de osteopontina y TFF3 y menores de cistatina C y creatinina plasmáticas así como del IFG al considerar ambos periodos de estudio.

La Tabla 49, por su parte, presenta los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Al comparar los periodos de alta frente a baja exposición se encontraron diferencias significativas en todos los valores a excepción de la cistatina C urinaria, IFG y creatinina plasmática, siendo mayores en el periodo de alta exposición con respecto al de baja excepto en el caso de la osteopontina. Los expuestos presentaron valores significativamente más altos del IFG y más bajos de creatinina plasmática. Por otro lado, en cuanto al género, los hombres presentaban niveles significativamente más altos que las mujeres de TFF3 y más bajos de creatinina plasmática. Respecto a la nacionalidad se apreciaron diferencias significativas entre la población española y marroquí con valores significativamente más altos de TFF3 y más bajos de creatinina plasmática en españoles. En cuanto a la edad se observó una asociación directa con la cistatina C plasmática e inversa con el IFG. Por último, el IMC se asoció directamente con el IFG.

Tabla 45. Biomarcadores de daño renal en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) para los dos periodos de estudio.

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
^u Albúmina	205	2963,95	11264,31	3125,15	7571,95	874,12 – 8768,86	204	1642,85	7707,98	1470,60	4451,26	642,55 – 4714,16	< 0,001
^u β2M	205	16,72	212,46	15,20	61,39	5,60 – 47,66	204	13,998	105,61	14,12	47,51	5,39 – 40,26	0,929
^u Cistatina C	205	10,62	130,94	9,63	28,33	5,61 – 21,53	204	8,56	46,09	9,75	19,23	5,15 – 15,79	0,719
^u NGAL	205	11,71	44,76	10,05	23,41	5,61 – 24,17	204	8,41	34,64	8,07	16,26	4,34 – 13,65	0,099
^u OPN	205	599,35	1020,20	597,68	977,78	318,25 – 1225,10	204	540,19	1191,38	613,97	924,48	342,51 – 1046,66	0,978
^u TFF3	205	653,31	1192,56	727,88	1044,60	386,32 – 1187,83	204	436,06	1239,80	460,90	786,25	225,79 – 797,29	< 0,001
^p Cistatina C	194	997,77	196,69	1005,15	1013,94	907,50 – 1096,00	122	724,07	190,85	695,50	745,43	611,00 – 846,00	< 0,001
^u Creatinina	192	99,76	100,47	105,50	112,93	85,25 – 129,00	193	99,83	40,77	112,00	109,70	81,55 – 128,00	0,735
IFG	239	100,83	19,27	99,50	102,58	90,24 – 113,49	218	103,77	24,87	101,29	106,48	89,49 – 120,41	< 0,001
^p Creatinina	188	0,84	0,14	0,82	0,83	0,75 – 0,95	200	0,80	0,17	0,80	0,82	0,70 – 0,90	0,019
Controles													
^u Albúmina	63	2808,81	9776,28	3087,78	6873,22	834,25 – 8736,55	90	1667,29	5771,70	1318,90	3961,30	643,81- 5262,10	0,011
^u β2M	63	17,57	361,00	13,60	105,36	5,53 – 71,55	90	10,50	61,00	12,15	36,59	4,37 – 36,56	0,059
^u Cistatina C	63	11,09	139,70	7,83	33,68	4,70 – 27,60	90	7,50	18,18	8,00	14,35	5,15 – 14,92	0,299
^u NGAL	63	11,25	56,79	10,65	25,97	4,30 – 21,05	90	7,54	20,43	7,91	13,64	3,57 – 12,70	0,147
^u OPN	63	411,29	695,04	392,78	678,68	175,70 – 864,11	90	594,94	993,65	624,05	910,33	365,50 – 1147,10	0,022
^u TFF3	63	403,42	441,89	475,60	554,68	233,13 -727,88	90	317,36	450,92	407,92	486,83	163,13 – 676,49	0,072
^p Cistatina C	64	1059,49	268,36	1043,00	1085,02	950,50 – 1169,00	82	701,43	149,62	695,50	715,83	595,50 – 792,75	< 0,001
^u Creatinina	63	95,82	27,59	95,62	102,26	95,62 – 118,61	87	102,33	34,46	126,06	110,24	97,97 – 126,06	0,852
IFG	87	90,40	15,28	91,77	91,58	82,68 – 98,81	90	114,83	14,79	89,80	91,02	80,59 – 99,97	0,801
^p Creatinina	61	0,84	0,15	0,81	0,85	0,75 – 0,95	90	0,84	0,16	0,80	0,86	0,70 – 0,90	0,862

Continua →

Tabla 45 (continuación). Biomarcadores de daño renal en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) para los dos períodos de estudio.

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Expuestos													
^u Albúmina	142	3035,49	11884,31	3218,34	7881,95	928,75 – 9115,87	114	1623,82	8952,85	1481,52	4838,06	582,90 – 3803,79	0,016
^u β2M	142	16,36	82,19	16,56	41,89	5,63 – 47,40	114	17,53	130,14	17,46	56,13	6,74 – 40,90	0,141
^u Cistatina C	142	9,63	127,30	10,12	25,96	5,95 – 20,47	114	9,51	59,34	10,20	23,09	5,37 – 16,16	0,651
^u NGAL	142	11,93	38,42	9,86	22,72	6,06 – 24,55	114	9,17	42,62	8,35	18,32	4,82 – 14,89	0,288
^u OPN	142	708,33	1111,64	708,94	1110,48**	363,68 – 1431,15	114	500,56	1331,15	605,70	935,65	277,92 – 1018,01	0,062
^u TFF3	142	809,11	1347,94	864,10	1261,96**	521,91 – 1361,44	114	560,41	1572,92	532,27	1022,63**	297,82 – 1025,55	< 0,001
^p Cistatina C	130	968,72	137,73	979,50	978,95**	903,00 – 1071,75	40	772,79	246,76	706,00	806,10	633,25 – 941,75	0,006
^u Creatinina	129	101,74	120,88	110,00	118,14	78,50 – 137,00	106	97,82	45,46	109,65	109,26	78,94 – 133,25	0,735
IFG	152	107,33	18,52	107,19	108,87**	95,09 – 121,36	128	89,85	24,81	111,22	117,34**	100,47 – 132,22	< 0,001
^p Creatinina	127	0,84	0,14	0,84	0,83	0,72 – 0,95	110	0,77	0,17	0,76	0,79**	0,66 – 0,90	0,004

Unidades: Albúmina (ng/ml), β2-microglobulina (β2M, ng/ml), Cistatina C urinaria (ng/ml), Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, ng/ml), Osteopontina (OPN, ng/ml), Factor trébol 3 (TFF3, ng/ml), Cistatina C plasmática (mg/l), Creatinina (mg/dl). Índice de Filtración Glomerular (IFG, ml/min/1,73 m²); calculado con la fórmula de Cockcroft – Gault.

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%)

^a Prueba de Wilcoxon.

^u Determinado en orina. ^p Determinado en plasma.

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 46. Biomarcadores de daño renal en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) para los dos períodos de estudio. Valores normalizados por creatinina urinaria

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
Albúmina	181	2838,69	9780,41	3077,14	6363,51	1101,63 – 7408,56	192	1625,53	7386,21	1359,57	4257,08	587,09 – 4606,68	0,027
β2M	181	17,10	202,23	16,75	61,46	5,66 – 41,01	192	13,06	100,15	13,17	50,79	5,08 – 42,66	0,667
Cistatina C	181	10,51	125,74	9,08	28,06	5,31 – 21,39	192	8,27	38,09	8,33	18,39	4,60 – 18,25	0,700
NGAL	181	11,92	42,47	10,45	23,06	5,83 – 21,04	192	8,29	41,79	7,08	18,13	3,87 – 16,31	0,927
OPN	181	586,82	736,43	654,01	853,63	309,98 – 1199,86	192	541,69	963,01	531,72	836,23	340,79 – 948,81	0,829
TFF3	181	688,84	1142,77	740,74	1019,30	440,36 – 1069,89	192	438,21	2017,62	429,96	901,45	234,66 – 707,42	0,046
Controles													
Albúmina	59	2979,62	12088,40	4002,98	7719,29	879,40 – 8482,09	85	1579,33	6820,11	1292,93	4183,53	554,95 – 5105,22	0,048
β2M	59	17,93	333,17	14,34	104,67	5,05 – 63,01	85	9,08	80,21	10,38	42,76	3,41 – 6,20	0,284
Cistatina C	59	9,70	128,85	8,01	33,05	4,00 – 29,64	85	7,08	23,93	7,30	15,61	4,18 – 15,47	0,928
NGAL	59	11,62	55,98	10,76	27,10	4,63 – 21,05	85	7,09	37,37	6,29	16,17	3,20 – 15,80	0,276
OPN	59	384,00	584,49	357,07	603,57	186,91 – 879,30	85	574,76	940,20	531,95	846,23	347,03 – 997,11	0,016
TFF3	59	393,21	359,70	476,38	518,36	235,28 - 615,44	85	298,46	320,39	334,28	414,87	167,28 – 571,74	0,045
Expuestos													
Albúmina	122	2772,94	8432,83	3009,29	5856,21	1109,99 – 6736,14	107	1663,19	7807,53	1402,94	4315,51	597,90 – 4262,42	0,086
β2M	122	16,70	79,23	17,33	40,56	6,71 – 39,69	107	11,44	113,50	15,06	57,18*	37,56 – 47,87	0,171
Cistatina C	122	10,92	124,68	9,68	25,65	6,06 – 19,08	107	9,36	46,37	10,36	20,60	4,90 – 19,21	0,373
NGAL	122	12,06	34,20	10,21	21,10	5,98 – 21,32	107	9,39	45,11	7,96	19,96	4,54 – 17,72	0,443
OPN	122	720,40	773,15	730,97	974,56**	400,20 – 1347,40	107	516,78	985,10	529,90	828,28	322,50 – 942,01	0,022
TFF3	122	903,39	1345,06	869,62	1289,80**	638,49 – 1235,19	107	594,56	1798,58	544,10	1053,85**	291,84 – 944,14	< 0,001

Unidades: ng/g creatinina para todos los biomarcadores indicados.

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % - 75%).

^a Prueba de Wilcoxon.

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 47. Análisis de correlación de Spearman de los biomarcadores de nefrotoxicidad en los dos periodos de estudio

	Periodo de alta exposición								Periodo de baja exposición							
	^a ALB	^a β2M	^a Cist C	^a NGAL	^a OPN	^a TFF3	^b Cist C	^b Creat	^a ALB	^a β2M	^a Cist C	^a NGAL	^a OPN	^a TFF3	^b Cist C	^b Creat
^aALB																
^aβ2M	0,659**								0,732**							
^aCist C	0,634**	0,750**							0,721**	0,824** ^a						
^aNGAL	0,555**	0,577**	0,648**						0,553**	0,648**	0,552**					
^aOPN	0,475**	0,388**	0,542**	0,384**					0,498**	0,442**	0,579**	0,353**				
^aTFF3	0,285**	0,288**	0,206**	0,293**	0,496**				0,216**	0,368**	0,372**	0,363**	0,472**			
^pCist C	-0,128	-0,107	-0,207*	-0,178*	-0,166*	-0,039			-0,073	0,088	0,079	0,113	-0,120	0,044		
^pCreat	0,111	-0,141	-0,217**	-0,166*	0,137	0,148*	0,047		-0,207**	-0,386**	-0,300**	-0,349**	0,033	-0,119	0,047	
IFG	0,055	0,045	0,116	0,112	0,257**	0,302**	-0,220**	-0,157*	0,016	0,125	0,047	0,119	-0,028	0,198**	0,028	-0,125

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

^a Determinado en orina y corregidos por mg de creatinina.

^p Determinado en plasma.

Los biomarcadores estaban expresados en las siguientes unidades: Albúmina (ALB), β2M, cistatina C urinaria (CIST C), NGAL, osteopontina (OPN) y TFF3 (ng/g creatinina), cistatina C plasmática (Cist C) (mg/l), creatinina (Creat) (mg/dl) e IFG (ml/min/1,73 m²).

Tabla 48. Biomarcadores de nefrotoxicidad en la población de estudio (expuestos y controles) y en los dos períodos estudiados (alta vs. baja exposición a plaguicidas)¹. Unidades: Albúmina, β2M, cistatina C urinaria, NGAL, osteopontina y TFF3 (ng/g creatinina), cistatina C plasmática (mg/l), creatinina (mg/dl) e IFG (ml/min/1,73 m²)

	Periodo de alta exposición		Periodo de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
^a Albúmina	3,401 ± 0,090	3,517 ± 0.101	3,080 ± 0,082	3,297 ± 0,091	0,101 (-0,135; 0,358)	0,436
^a β2M	1,160 ± 0,100	1,249 ± 0,112	1,098 ± 0,105	1,012 ± 0,117	-0,175 (-0,449; 0,099)	0,209
^a Cistatina C	0,993 ± 0,067	0,984 ± 0,075	0,859 ± 0,069	0,868 ± 0,076	0,018 (-0,179; 0,215)	0,856
^a NGAL	0,975 ± 0,061	1,090 ± 0,068	0,888 ± 0,057	0,898 ± 0,063	-0,105 (-0,272; 0,063)	0,220
^a OPN	2,923 ± 0,058	2,513 ± 0,064	2,701 ± 0,052	2,682 ± 0,058	0,392 (0,227; 0,556)	< 0,001
^a TFF3	2,940 ± 0,051	2,635 ± 0,056	2,668 ± 0,050	2,530 ± 0,054	0,168 (0,030; 0,307)	0,018
^b Cistatina C	2,958 ± 0,010	3,034 ± 0,010	2,897 ± 0,018	2,862 ± 0,013	-0,090 (-0,135; -0,045)	< 0,001
IFG	2,003 ± 0,006	1,979 ± 0,008	2,035 ± 0,007	1,977 ± 0,009	-0,034 (-0,053; -0,015)	<0,001
^b Creatinina	-0,075 ± 0,009	-0,066 ± 0,010	-0,116 ± 0,010	-0,068 ± 0,011	0,040 (0,016; 0,063)	0,001

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [período de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 49. Análisis de modelos mixtos ¹ de los biomarcadores de nefrototoxicidad en la población de estudio. Unidades: Albúmina, β 2M, cistatina C urinaria, NGAL, osteopontina y TFF3 (ng/g /dl) e creatinina, cistatina C plasmática (mg/l), creatinina (mg IFG (ml/min/1,73 m²))

	Albúmina (n=181)	β2M (n=180)	Cistatina C (n=180)	NGAL (n=180)	OPN (n=180)	TFF3 (n=180)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,220* (0,032; 0,408)	0,237* (0,039; 0,436)	0,116 (-0,027; 0,259)	0,192* (0,069; 0,314)	-0,170* (-0,290; -0,049)	0,104* (0,004; 0,205)
Expuestos vs. controles	-0,217 (-0,505; 0,070)	0,086 (-0,278; 0,450)	-0,009 (-0,248; 0,229)	-0,010 (-0,209; 0,189)	0,018 (-0,165; 0,202)	0,137 (-0,035; 0,310)
Hombres vs. mujeres	0,002 (-0,163; 0,167)	-0,080 (-0,283; 0,124)	0,009 (-0,124; 0,141)	0,051 (-0,064; 0,166)	0,011 (-0,095; 0,117)	0,103* (0,005; 0,202)
Español vs. Marroquí	0,198 (-0,059; 0,455)	0,069 (-0,248; 0,387)	0,039 (-0,169; 0,246)	0,110 (-0,068; 0,288)	-0,108 (-0,272; 0,055)	0,134# (-0,018; 0,287)
Edad	-0,001 (-0,009; 0,008)	-0,008 (-0,019; 0,002)	-0,004 (-0,011; 0,002)	-0,004 (-0,010; 0,001)	0,001 (-0,004; 0,007)	-0,002 (-0,007; 0,003)
IMC	-0,013 (-0,032; 0,006)	-0,003 (-0,026; 0,020)	-0,005 (-0,020; 0,010)	-0,007 (-0,020; 0,006)	-0,004 (-0,016; 0,008)	0,006 (-0,006; 0,017)
Interacción	0,101 (-0,135; 0,358)	-0,175 (-0,449; 0,099)	0,018 (-0,179; 0,215)	-0,105 (-0,272; 0,063)	0,392** (0,227; 0,556)	0,168* (0,030; 0,307)

Continua →

Tabla 49 (continuación). Análisis de modelos mixtos ¹ de los biomarcadores de nefrototoxicidad en la población de estudio. Unidades: Albúmina, β 2M, cistatina C urinaria, NGAL, osteopontina y TFF3 (ng/g creatinina), cistatina C plasmática (mg/l), creatinina (mg/dl) e IFG (ml/min/1,73 m²)

	Cistatina C (n=180)	IFG (n=198)	Creatinina (n=183)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,171** (0,144; 0,199)	0,003 (-0,012; 0,017)	0,002 (-0,015; 0,008)
Expuestos vs. controles	0,014 (-0,033; 0,062)	0,058* (0,033; 0,083)	-0,048# (-0,082; -0,015)
Hombres vs. mujeres	-0,028 (-0,050; -0,006)	0,006 (-0,010; 0,021)	-0,089** (-0,108; -0,070)
Español vs. Marroquí	0,049 (0,017; 0,081)	0,015 (-0,006; 0,035)	-0,028# (-0,057; 0,001)
Edad	0,001# (-0,001; 0,002)	-0,004** (-0,004; -0,003)	0,001 (-0,001; 0,001)
IMC	0,002 (-0,001; 0,004)	0,009** (0,007; 0,010)	-0,001 (-0,003; 0,001)
Interacción	-0,090** (-0,135; -0,045)	-0,034** (-0,053; -0,015)	0,040** (0,016; 0,063)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos de invernadero].

** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, # $p < 0,1$

3.3. Biomarcadores de hepatotoxicidad

La Tabla 50 muestra el análisis descriptivo y bivariante de los biomarcadores de hepatotoxicidad estudiados. Al considerar toda la población de estudio y comparar los periodos de alta y baja exposición entre sí, se observaron valores significativamente más altos de ALP y OTC y significativamente más bajos de AST, arginasa I y GST- α en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. No obstante, al estratificar la población en controles y expuestos, los controles presentaron niveles significativamente más altos de OTC y más bajos de AST y arginasa I en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por su parte, los expuestos presentaron niveles significativamente más altos de ALP y OTC y más bajos de ALT en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por otro lado, al comparar controles y expuestos en cada uno de los periodos de estudio se observó que los expuestos presentan niveles significativamente más bajos de OTC y GST- α en el periodo de alta exposición, así como de ALP y la arginasa I en el de baja exposición; sin embargo, presentaban niveles significativamente más altos de GGT en este mismo periodo.

La Tabla 51 muestra el análisis de correlación de los biomarcadores de hepatotoxicidad en cada uno de los periodos de estudio. Se pudo observar una correlación significativa y directa para ambos periodos de la ALT con la AST, GGT y ALP; de la AST con ALT, GGT y ALP, de GGT con ALT y ALP y de ALP con GST- α , aunque en este último caso la correlación es inversa. Además, se observó una correlación significativa y positiva de la OTC con la ALT y arginasa I en el periodo de alta exposición. En el de baja exposición se observó una correlación significativa y directa de la OTC con la AST y de la arginasa I con la ALP, así como una correlación inversa entre la GST- α y la OTC.

Las Tablas 52 y 53 muestran los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para los biomarcadores de hepatotoxicidad transformados logarítmicamente y ajustados por periodo de exposición (Alta vs. Baja), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. La Tabla 52 muestra las medias y errores estándar en controles y expuestos para cada periodo de estudio. Se observaron diferencias significativas para el término de interacción en todos los biomarcadores a excepción de la ALT y GGT.

A su vez, la Tabla 53 presenta los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Al comparar el periodo de alta exposición frente al de baja se observaron diferencias significativas en todos los biomarcadores hepáticos, siendo mayores en el caso de GGT y OTC y menores en el resto. Los expuestos presentaban valores significativamente más altos de GGT y más bajos de ALP, arginasa I y GST- α . En cuanto a las diferencias de género, los hombres presentaban niveles más altos de ALT, AST, GGT, ALP y OTC que las mujeres. Respecto a la nacionalidad, los españoles muestran valores significativamente más altos de ALT, AST, OTC, arginasa I y GST α . Por último, el IMC se asoció directamente con el ALT, GGT, ALP, arginasa I y GST- α ; sin embargo, no se observaron asociaciones significativas con la edad.

Tabla 50. Biomarcadores de hepatotoxicidad en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
ALT	192	18,95	7,48	18,00	19,90	15,00 – 22,00	200	18,50	6,15	18,00	19,24	15,25 – 21,00	0,308
AST	192	17,69	9,41	16,50	19,36	13,00 – 22,00	200	19,43	8,91	18,00	20,95	15,00 – 24,00	0,032
GGT	193	24,41	20,99	22,00	27,94	18,00 – 31,00	200	23,04	19,82	22,00	26,46	17,00 – 29,00	0,058
ALP	193	75,71	20,48	77,00	78,37	63,00 – 90,50	200	68,33	18,57	68,00	70,73	56,00 – 84,00	< 0,001
OTC	207	141,76	117,42	143,02	176,98	91,53 – 228,44	200	78,03	66,34	78,24	99,67	50,53 – 110,64	< 0,001
Arginasa I	195	89,43	93,26	81,70	112,65	56,20 – 145,00	125	184,75	241,18	148,00	262,62	104,50 – 322,00	< 0,001
GST-α	195	54,27	44,15	62,30	71,95	41,30 – 101,00	125	71,34	90,12	73,00	108,54	41,15 – 180,09	0,047
Controles													
ALT	64	17,60	8,35	16,00	18,97	12,25 – 22,75	90	19,98	8,28	19,00	21,43	16,00 – 27,00	0,298
AST	64	18,00	6,72	17,00	18,88	14,00 – 22,00	90	18,84	5,76	18,00	19,50	16,00 – 22,00	0,009
GGT	64	23,46	13,92	23,50	25,80	17,25 – 30,50	90	20,97	12,21	20,00	23,33	15,00 – 27,00	0,166
ALP	64	72,87	19,76	73,00	75,31	59,00 – 87,25	90	76,97	18,36	81,00	79,19	65,00 – 93,50	0,057
OTC	64	224,66	128,43	248,85	260,63	186,78 – 328,65	87	83,55	68,33	83,98	99,72	55,63 – 106,28	< 0,001
Arginasa I	65	87,44	62,18	83,60	103,31	56,45 – 143,50	84	231,52	267,58	205,50	324,96	125,25 – 503,25	< 0,001
GST-α	65	56,36	55,52	86,50	86,91	39,15 – 41,60	84	65,42	94,13	69,45	104,30	37,02 – 170,50	0,085

Continua →

Tabla 50 (continuación). Biomarcadores de hepatotoxicidad en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Expuestos													
ALT	128	17,74	9,92	17,00	19,56	13,00 – 22,00	110	18,99	9,41	17,00	20,55	15,00 – 23,00	0,026
AST	128	19,44	7,81	19,00	20,41	16,00 – 23,00	110	18,23	6,46	18,00	19,03	15,00 – 20,25	0,570
GGT	129	24,89	23,72	22,00	29,00	18,00 – 31,00	110	24,89	24,10	23,00	29,01*	18,00 – 32,00	0,151
ALP	129	77,16	20,73	80,00	79,88	66,00 – 91,00	110	61,98	15,71	62,50	63,81**	54,00 – 72,00	< 0,001
OTC	143	115,36	90,11	117,80	139,55**	82,88 – 171,52	117	74,03	64,90	75,56	92,55	45,58 – 115,43	0,002
Arginasa I	130	90,44	105,33	78,85	117,32	56,10 – 146,75	125	116,36	82,85	118,00	134,90**	86,95 – 154,00	0,054
GST-α	130	53,26	35,11	59,00	64,47**	130,50 – 83,87	41	85,19	81,71	94,60	117,21	51,48 - 186,58	0,269

Unidades: ALT (alaninaaminotransferasa; U/l), AST (aspartatoaminotransferasa; U/l), GGT (gamma glutamiltranspeptidasa; U/l), ALP (fosfatasa alcalina; U/l), OTC (ornitinatranscarbamilasa; U/l), Arginasa I (ng/ml), Glutation-S-Transferasa alfa (GST-α, μg/l).

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartílico (percentiles 25 % - 75%).

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba t Student/Kruskal-Wallis).

Tabla 51. Correlación de Spearman de los biomarcadores de hepatotoxicidad en los dos periodos de estudio

	<i>Periodo de alta exposición</i>						<i>Periodo de baja exposición</i>					
	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>GGT</i>	<i>ALP</i>	<i>OTC</i>	<i>ARG I</i>	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>GGT</i>	<i>ALP</i>	<i>OTC</i>	<i>ARG I</i>
<i>ALT</i>												
<i>AST</i>	0,763**						0,700**					
<i>GGT</i>	0,503**	0,395**					0,476**	0,332**				
<i>ALP</i>	0,203**	0,264**	0,183*				0,159*	0,158*	0,146*			
<i>OTC</i>	0,149*	0,062	0,025	0,030			0,122	0,177*	0,033	0,070		
<i>ARG I</i>	0,113	-0,065	0,116	0,061	0,141*		-0,073	-0,019	-0,041	0,208*	-0,164	
<i>GST-α</i>	0,003	-0,011	0,093	-0,238**	0,037	0,095	-0,057	-0,123	0,114	-0,177*	-0,199*	0,121

Correlación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 52. Biomarcadores de hepatotoxicidad en población expuesta y control en los dos períodos de estudio (alta vs. baja exposición a plaguicidas) ¹. Unidades: ALT, AST, GGT, ALP y OTC (U/l), Arginasa I (ng/ml) y GST- α (μ g/l)

	Periodo de alta exposición		Periodo de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
ALT	1,302 \pm 0,016	1,241 \pm 0,020	1,265 \pm 0,015	1,264 \pm 0,19	0,037 (-0,017; 0,091)	0,183
AST	1,281 \pm 0,021	1,204 \pm 0,026	1,299 \pm 0,019	1,258 \pm 0,024	0,059 (0,022;0,096)	0,002
GGT	1,412 \pm 0,025	1,348 \pm 0,031	1,392 \pm 0,022	1,318 \pm 0,029	0,009 (-0,050; 0,032)	0,666
ALP	1,882 \pm 0,014	1,887 \pm 0,018	1,787 \pm 0,013	1,906 \pm 0,017	0,114 (0,089; 0,140)	< 0,001
OTC	2,066 \pm 0,033	2,317 \pm 0,046	1,884 \pm 0,032	1,868 \pm 0,041	-0,267 (-0,381; -0,152)	< 0,001
Arginasa I	1,992 \pm 0,034	1,870 \pm 0,047	2,074 \pm 0,059	2,294 \pm 0,050	0,342 (0,185; 0,498)	< 0,001
GST-α	1,715 \pm 0,057	1,795 \pm 0,077	1,911 \pm 0,084	1,862 \pm 0,074	0,342 (0,185; 0,498)	< 0,001

¹Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media \pm error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 53. Análisis de modelos mixtos ¹ de los biomarcadores de hepatotoxicidad en la población de estudio. Unidades: ALT, AST, GGT, ALP y OTC (U/l), Arginasa I (ng/ml) y GST-α (μg/l)

	ALT (n=182)	AST (n=182)	GGT (n=182)	ALP (n=182)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	-0,054# (-0,093; -0,016)	-0,023# (-0,049; 0,004)	0,030* (0,000; 0,059)	-0,020* (-0,038; -0,001)
Expuestos vs. controles	0,041 (-0,031; 0,112)	0,001 (-0,055; 0,057)	0,074# (-0,014; 0,162)	-0,119** (-0,171; -0,067)
Hombres vs. mujeres	0,115** (0,072; 0,157)	0,078** (0,044; 0,111)	0,143** (0,089; 0,197)	0,058** (0,026; 0,090)
Español vs. Marroquí	0,110* (0,044; 0,176)	0,045# (-0,007; 0,096)	0,068 (-0,014; 0,150)	-0,021 (-0,069; 0,028)
Edad	0,001 (-0,001; 0,003)	0,001 (-0,001; 0,003)	0,000 (-0,002; 0,003),	0,001 (0,000; 0,003)
IMC	0,010** (0,005; 0,015)	0,002 (-0,002; 0,006)	0,015** (0,009; 0,021)	0,004# (0,000; 0,007)
Interacción	0,037 (-0,017; 0,091)	0,059* (0,022; 0,096)	-0,009 (-0,050; 0,032)	0,114** (0,089; 0,140)

Tabla 53 (continuación). Análisis de modelos mixtos ¹ de los diferentes marcadores de hepatotoxicidad en la población de estudio. Unidades: ALT, AST, GGT, ALP y OTC (U/l), arginasa I (ng/ml) y GST-α (μg/l)

	OTC (n=196)	Arginasa I (n=173)	GST-α (n=173)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	0,449** (0,364; 0,535)	-0,424** (-0,522; -0,327)	-0,424** (-0,522; -0,327)
Expuestos vs. controles	0,016 (-0,100; 0,132)	-0,220* (-0,383; -0,057)	-0,220* (-0,383; -0,057)
Hombres vs. mujeres	0,122** (0,050; 0,193)	0,023 (-0,058; 0,105)	0,023 (-0,058; 0,105)
Español vs. Marroquí	0,108# (0,009; 0,207)	0,201* (0,080; 0,321)	0,201* (0,080; 0,321)
Edad	0,003 (-0,001; 0,007)	-0,004 (-0,009; 0,001)	-0,004 (-0,009; 0,001)
IMC	-0,006 (-0,014; 0,002)	0,008# (-0,001; 0,017)	0,008# (-0,001; 0,017)
Interacción	-0,267** (-0,381; -0,152)	0,342** (0,185; 0,498)	0,342** (0,185; 0,498)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3.4. Biomarcadores de neurotoxicidad

La Tabla 54 muestra el análisis descriptivo y bivariante de los biomarcadores de neurotoxicidad estudiados. Solo en la población expuesta se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el periodo de alta exposición con el de baja. Así, la proteína S100B y el pNF-H muestran valores más bajos en el periodo de alta exposición. Al comparar controles y expuestos en cada periodo de estudio, se observa que los expuestos presentaban niveles significativamente más bajos de pNF-H en el periodo de alta exposición y de S100B en el de baja exposición.

El análisis de correlación no mostró asociación significativa entre los biomarcadores de neurotoxicidad estudiados (S100B y el pNF-H) en ninguno de los dos periodos de estudio (datos no tabulados).

Las Tablas 55 y 56 muestran los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para los biomarcadores de neurotoxicidad transformados logarítmicamente y ajustados por: periodo de exposición (Alta vs. Baja), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. La Tabla 55 muestra las medias y errores estándar para controles y expuestos en cada periodo de estudio. No se observaron diferencias significativas para el término de interacción en ningún caso, aunque las diferencias estaban al borde de la significación estadística ($p = 0,074$ para la proteína S100B y $p = 0,098$ para el pNF-H).

Por su parte, la Tabla 56 muestra los resultados del análisis de modelos mixtos lineales indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. En el periodo de alta exposición se observó niveles significativamente más bajos de pNF-H que en el de baja exposición. A su vez, los expuestos presentaron valores significativamente más altos para el pNF-H. En cuanto al género, los hombres presentaron niveles significativamente más bajos de pNF-H que las mujeres. Respecto a la nacionalidad, los españoles mostraron niveles significativamente más altos de S100B y pNF-H que los marroquíes. Por último, se observó una asociación directa del IMC con la proteína S100B.

Tabla 54. Biomarcadores de neurotoxicidad en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) y en los dos períodos estudiados

	Periodo de alta exposición						Periodo de baja exposición						p valor ^a
	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total													
S100B	195	1,86	2,98	1,67	2,60	1,09 – 3,07	125	1,86	3,45	1,69	3,11	0,97 – 3,90	0,937
pNF-H	171	89,52	56,55	101,10	107,08	69,30 – 71,55	105	131,32	56,61	137,51	142,54	108,73 – 173,58	0,060
Controles													
S100B	65	1,86	2,60	1,53	2,58	1,07 – 3,24	84	2,14	3,08	2,03	3,20	0,99 – 4,42	0,170
pNF-H	65	99,17	68,51	136,50	130,50	88,95 – 172,95	67	128,58	51,79	137,51	137,61	111,29 – 168,73	0,487
Expuestos													
S100B	130	1,85	3,15	1,75	2,61	1,09 – 3,08	41	1,41	4,15	1,08	2,91*	0,77 – 3,25	0,019
pNF-H	106	84,07	43,07	91,50	95,81**	64,80 – 123,90	38	136,28	64,05	148,68	151,21	96,14 – 201,16	0,012

Unidades: S100B (proteína S100B; ng/ml), pNF-H (neurofilamento de alto peso molecular fosforilado; ng/ml).

n: Número de muestras; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartílico (percentiles 25 % - 75%).

^a Prueba de Wilcoxon.

*p < 0,05; **p < 0,01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 55. Biomarcadores de neurotoxicidad en la población de estudio (expuestos y controles) y en los dos periodos estudiados (alta y baja exposición a plaguicidas) ¹. Unidades ng/ml para ambos biomarcadores

	Periodo de alta exposición		Periodo de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
S100B	0,298 ± 0,038	0,146 ± 0,053	0,180 ± 0,082	0,219 ± 0,066	0,191(-0,019; 0,401)	0,074
pNF-H	1,962 ± 0,049	1,888 ± 0,053	2,195 ± 0,031	1,998 ± 0,034	-0,123 (-0,269; 0,023)	0,098

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por periodo de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 56. Análisis de modelos mixtos ¹ de los diferentes marcadores de neurotoxicidad en la población de estudio. Unidades ng/ml para ambos biomarcadores

	S100B (n=173)	pNF-H (n=144)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	-0,073 (-0,200; 0,054)	-0,110* (-0,209; -0,011)
Expuestos vs. controles	-0,039 (-0,257; 0,179)	0,196** (0,095; 0,298)
Hombres vs. mujeres	0,064 (-0,032; 0,160)	-0,071* (-0,134; -0,007)
Español vs. Marroquí	0,248** (0,108; 0,388)	0,206** (0,102; 0,310)
Edad	0,002 (-0,004; 0,007)	-0,01 (-0,004; 0,003)
IMC	0,018* (0,007; 0,029)	-0,003 (-0,010; 0,004)
Interacción	0,191# (-0,019; 0,401)	-0,123# (-0,269; 0,023)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3.5. Parámetros inmunológicos

3.5.1. Citoquinas inmunorreguladoras

La Tabla 57 muestra el análisis descriptivo y bivalente de las citoquinas inmunoreguladoras (interleuquinas, receptor IL-1ra, IFN- γ y TNF- α). Al considerar la población total en su conjunto se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los periodos de alta y baja exposición para todas ellas excepto IL-7 y IL-15. En todos los casos se observaron niveles significativamente más altos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja con excepción de la IL-11, donde fue al revés. Al estratificar la población por exposición, los controles presentaron valores significativamente más altos de todas las citoquinas en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, con la única excepción de la IL-9, que mostró niveles significativamente más bajos en dicho periodo. Por su parte, los expuestos mostraban diferencias significativas en todas las citoquinas excepto IL-2, IL-7, IL-1ra y TNF- α . En todos los casos los valores de la media aritmética fueron mayores en el periodo de alta exposición que en el de baja con excepción de la IL-15. Por otro lado, al comparar controles y expuestos en cada uno de los periodos estudiados se observaron diferencias significativas en el de alta exposición para todas las citoquinas excepto IL-2, IL-13, IL-1ra e IFN- γ ; en todos los casos los valores fueron más altos en los expuestos excepto los de IL-9, IL-12p70 y IL-15. Asimismo, en el periodo de baja exposición todas las citoquinas estudiadas mostraron diferencias significativas entre expuestos y controles, mostrando los expuestos valores más altos excepto en el caso de IL-2, IL-9, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ , cuyos valores eran más bajos.

La Tabla 58 muestra el análisis de correlación de los diferentes parámetros inmunorreguladores estudiados y en los dos periodos de estudio. En el de alta exposición se observó una correlación significativa de la mayoría de ellos entre sí con excepción de IL-15 el IFN- γ , en los que no se encontró asociación con 3 y 4 citoquinas, respectivamente. En todos los casos la correlación es directa excepto en tres citoquinas en las que fue inversa (en dos de ellas está implicado el IFN- γ). Sin embargo, en el periodo de baja exposición se observaron correlaciones significativas y directas entre todas las citoquinas estudiadas.

En las Tablas 59 y 60 se presentan los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para las citoquinas inmunorreguladoras ajustadas por periodo de exposición (Alta vs. Baja), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. Previamente los datos fueron transformados logarítmicamente por no ajustarse a una distribución normal. La Tabla 59 muestra las medias y errores

estándar de cada biomarcador para controles y expuestos en cada periodo de estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el término de interacción en IL-1 β , IL-13 e IL-15 y al borde de la significación en el caso de la IL-4. En todos los casos las diferencias de medias fueron negativas, aunque hay que tener en cuenta que los valores están transformados logarítmicamente.

La Tabla 60 presenta los resultados del mismo análisis de modelos mixtos, pero ahora se indican los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Lo más llamativo es que para todas las citoquinas inmunorreguladoras se obtuvieron niveles significativamente más altos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Asimismo, los expuestos presentaron valores significativamente más altos que los controles en todas las citoquinas estudiadas. En cuanto al sexo, los hombres presentaban valores significativamente superiores de IL-1ra, IFN- γ y TNF- α que las mujeres. Por nacionalidad, los españoles mostraron niveles más altos de IL-1ra e IFN- γ que los marroquíes. Por último no se observaron asociaciones significativas con respecto a la edad e IMC.

Tabla 57. Niveles de citoquinas en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) y en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición							Periodo de baja exposición							p valor ^a
	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total															
<i>IL-1β</i>	174	0,0	0,80	0,68	1,07	1,08	0,54 – 1,56	172	2,3	0,40	0,61	0,42	0,65	0,23 – 0,89	< 0,001
<i>IL-2</i>	174	40,8	NC	4,50	NC	2,35	NC – 2,61	172	51,6	NC	5,82	NC	2,01	NC – 1,31	0,012
<i>IL-4</i>	174	4,0	0,60	0,49	0,81	0,82	0,42 – 1,19	172	4,1	0,36	0,40	0,39	0,51	0,22 – 0,69	< 0,001
<i>IL-5</i>	174	0,6	1,69	2,62	2,32	2,78	0,77 – 4,45	172	23,8	0,52	1,04	0,65	0,85	0,29 – 0,90	< 0,001
<i>IL-6</i>	174	0,0	1,71	1,46	2,20	2,24	1,11 – 2,99	172	7,5	0,87	1,59	0,93	1,51	0,43 – 2,11	< 0,001
<i>IL-7</i>	174	8,0	1,88	2,59	2,13	2,73	1,03 – 3,21	172	5,8	1,54	2,14	1,82	2,30	0,84 – 3,04	0,304
<i>IL-9</i>	158	1,2	6,16	38,61	6,68	11,82	4,04 – 9,39	172	4,6	3,69	97,31	4,14	14,00	1,69 – 8,13	< 0,001
<i>IL-10</i>	174	0,6	4,78	10,97	5,93	8,36	3,04 – 9,25	172	7,5	2,33	17,48	2,47	6,13	1,07 – 6,56	< 0,001
<i>IL-12p70</i>	174	1,1	9,87	638,20	9,51	15,76	6,02 – 15,72	172	4,1	5,24	31,70	6,05	12,04	2,14 – 12,08	< 0,001
<i>IL-13</i>	174	0,0	2,72	4,66	2,61	3,59	1,89 – 3,86	172	1,2	1,66	4,18	1,63	2,52	1,01 – 2,76	< 0,001
<i>IL-15</i>	174	80,5	NC	0,96	NC	1,16	NC – NC	172	65,0	NC	2,26	NC	1,42	NC – 0,79	0,680
<i>IL-17</i>	174	4,0	26,19	40,56	34,42	44,22	16,19 – 59,76	172	7,0	8,73	19,53	11,35	15,97	4,01 – 21,16	< 0,001
<i>IL-1ra</i>	174	0,6	35,14	89,48	35,95	61,89	19,82 – 71,49	172	0,6	17,67	51,64	19,00	31,84	8,07 – 39,90	< 0,001
<i>IFN-γ</i>	174	1,7	102,56	167,69	93,10	176,73	50,46 – 295,52	172	1,2	34,55	61,45	31,61	54,57	18,79 – 66,91	< 0,001
<i>TNF-α</i>	174	1,1	12,05	11,79	13,80	15,94	8,03 – 20,20	172	1,7	8,76	9,10	9,75	11,90	4,77 – 15,47	0,005

Continua →

Tabla 57 (continuación). Niveles de citoquinas en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) y en los dos períodos de estudio

	<i>Periodo de alta exposición</i>							<i>Periodo de baja exposición</i>							<i>p valor^a</i>
	<i>n</i>	<i>% < LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25 – P75</i>	<i>n</i>	<i>% < LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25 – P75</i>	
Controles															
<i>IL-1β</i>	63	0,0	0,52	0,70	0,58	0,83	0,20 – 1,25	79	1,3	0,22	0,28	0,24	0,32	0,13 – 0,45	< 0,001
<i>IL-2</i>	63	54,0	NC	6,78	NC	3,13	NC – 2,78	79	64,6	NC	7,94	NC	2,07	NC – 0,60	0,003
<i>IL-4</i>	63	7,9	0,40	0,53	0,51	0,66	0,18 – 0,95	79	7,6	0,22	0,22	0,24	0,29	0,14 – 0,36	< 0,001
<i>IL-5</i>	63	1,6	1,01	2,09	0,98	2,12	0,40 – 4,40	79	31,6	NC	0,31	NC	0,45	NC – 0,65	< 0,001
<i>IL-6</i>	63	0,0	1,34	1,75	1,56	2,04	0,62 – 2,95	79	10,1	0,50	1,49	0,65	0,98	0,30 – 0,68	< 0,001
<i>IL-7</i>	63	20,6	1,32	2,24	1,35	2,11	0,51 – 2,52	79	8,9	0,96	1,30	1,01	1,44	0,51 – 1,96	0,023
<i>IL-9</i>	63	1,6	5,38	60,16	6,24	16,11	3,27 – 8,89	79	7,6	2,69	142,19	2,56	20,78	1,19 – 6,93	0,001
<i>IL-10</i>	63	1,6	3,16	14,54	3,44	8,17	1,85 – 7,77	79	13,9	1,39	25,24	1,18	6,83	0,74 – 3,70	< 0,001
<i>IL-12p70</i>	63	3,2	8,44	39,43	7,43	18,64	4,78 – 13,30	79	6,3	3,91	43,98	3,58	13,58	1,30 – 8,94	< 0,001
<i>IL-13</i>	63	0,0	2,75	3,17	2,83	3,59	1,65 – 4,16	79	2,5	1,18	1,89	1,20	1,71	0,70 – 1,70	< 0,001
<i>IL-15</i>	63	68,2	NC	1,04	NC	1,37	NC – 1,84	79	73,4	NC	2,68	NC	1,20	NC – 0,75	0,007
<i>IL-17</i>	63	9,5	12,82	42,88	18,87	30,88	4,53 – 39,18	79	11,4	5,45	15,39	6,20	11,40	1,92 – 14,44	< 0,001
<i>IL-1ra</i>	63	1,6	28,17	123,37	30,68	64,62	14,45 – 71,55	79	0,0	11,94	70,19	12,65	27,69	4,74 – 24,82	< 0,001
<i>IFN-γ</i>	63	4,8	92,79	152,90	173,16	183,04	39,49 – 302,02	79	1,3	29,58	83,82	22,56	59,86	14,09 – 40,76	< 0,001
<i>TNF-α</i>	63	1,6	8,84	12,36	11,45	13,13	4,07 – 15,99	79	1,3	5,96	5,52	5,43	7,64	3,94 – 10,32	< 0,001

Continua →

Tabla 57 (continuación). Niveles de citoquinas en la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) y en los dos periodos de estudio

	Periodo de alta exposición							Periodo de baja exposición							p valor ^a
	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Expuestos															
IL-1β	111	0,0	1,01	0,63	1,26	1,22**	0,72 – 1,70	93	3,2	0,68	0,68	0,73	0,93**	0,34 – 1,33	0,002
IL-2	111	33,3	NC	2,31	NC	1,90	NC – 2,56	93	40,9	NC	3,07	NC	1,96**	NC – 2,22	0,444
IL-4	111	1,8	0,76	0,45	0,91	0,91**	0,57 – 1,24	93	1,1	0,56	0,18	0,59	0,70**	0,39 – 1,01	0,006
IL-5	111	0,0	2,26	3,25	2,92	3,16**	1,54 – 4,49	93	17,2	0,78	1,30	0,65	1,19**	0,50 – 1,56	< 0,001
IL-6	111	0,0	1,96	1,27	2,31	2,35**	1,42 – 3,00	93	5,4	1,40	1,53	1,56	1,96*	0,80 – 2,70	0,018
IL-7	111	0,9	2,30	2,72	2,31	3,08**	1,59 – 3,33	93	3,2	2,31	2,42	2,57	3,03**	1,51 – 4,05	0,512
IL-9	95	1,0	6,75	9,05	7,27	8,98*	4,89 – 10,17	93	2,1	4,84	19,69	5,18	8,24**	3,15 – 9,56	0,200
IL-10	111	0,0	6,05	8,38	6,67	8,46*	4,14 – 9,64	93	2,1	3,62	5,19	3,76	5,55**	1,95 – 8,59	0,002
IL-12p70	111	0,0	10,78	10,96	11,44	14,13**	6,95 -16,13	93	2,1	6,73	14,95	7,14	10,73**	3,14 – 13,59	0,024
IL-13	111	0,0	2,71	5,34	2,57	3,59	1,96 - 3,68	93	0,0	2,21	5,33	2,12	3,21**	1,34 – 3,25	0,011
IL-15	111	87,4	NC	0,89	NC	1,05**	NC – NC	93	58,1	NC	1,82	NC	1,61**	NC – 1,52	0,044
IL-17	111	0,9	39,27	37,31	42,06	51,80**	24,62 – 68,95	93	3,2	13,04	21,80	13,88	19,85**	7,59 – 29,83	< 0,001
IL-1ra	111	0,0	39,84	63,30	37,00	60,34	24,26 – 63,54	93	1,1	24,65	27,45	28,98	35,36**	12,72 – 52,59	0,102
IFN-γ	111	0,0	108,55	176,11	85,81	173,14	56,91 – 281,03	93	1,1	39,43	31,90	41,57	50,07**	25,43 – 69,05	< 0,001
TNF-α	111	0,9	14,36	11,19	15,36	16,54**	9,69 – 20,93	93	2,1	12,15	0,97	13,54	15,51**	7,40 – 20,80	0,669

Unidades: IL-1β (interleuquina 1 subunidad beta; pg/ml), IL-2 (interleuquina 2; pg/ml), IL-4 (interleuquina 4; pg/ml), IL-5 (interleuquina 5; pg/ml), IL-6 (interleuquina 6; pg/ml), IL-7 (interleuquina 7; pg/ml), IL-9 (interleuquina 9; pg/ml), IL-10 (interleuquina 10; pg/ml), IL-12p70 (interleuquina 12 heterodimerica p70; pg/ml), IL-13 (interleuquina 13; pg/ml), IL-15 (interleuquina 15; pg/ml), IL-1ra (receptor antagonista de la interleuquina 1; pg/ml), IFN-γ (interferón gamma, pg/ml), TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa, pg/ml).

n: Número de muestras; *%<LOD:* Porcentaje de casos no detectables; *M_G:* Media geométrica; *SD:* Desviación estándar; *M_A:* Media aritmética; *MED:* Mediana; *P25 – P75:* Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%); *NC:* No calculado (el porcentaje de valores por debajo del LOD es superior al 25 %).

^a Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

*p< 0.05; **p< 0.01 para la comparación entre controles y expuestos (prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 58. Análisis de correlación de Spearman de las citoquinas entre sí en los dos periodos de estudio

	Periodo de alta exposición													
	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17	IL-1ra	IFN- γ
IL-1β														
IL-2	0,598**													
IL-4	0,958**	0,608**												
IL-5	0,856**	0,424**	0,844**											
IL-6	0,877**	0,662**	0,903**	0,788**										
IL-7	0,640**	0,453**	0,639**	0,393**	0,591**									
IL-9	0,471**	0,396**	0,471**	0,223**	0,435**	0,644**								
IL-10	0,713**	0,596**	0,696**	0,506**	0,740**	0,710**	0,672**							
IL-12p70	0,601**	0,605**	0,600**	0,353**	0,636**	0,702**	0,711**	0,820**						
IL-13	0,494**	0,502**	0,498**	0,467**	0,505**	0,367**	0,290**	0,478**	0,417**					
IL-15	0,405**	0,355**	0,443**	0,553**	0,513**	0,057	-0,021	0,183*	0,113	0,234**				
IL-17	0,571**	0,387**	0,544**	0,282**	0,464**	0,700**	0,720**	0,700**	0,736**	0,331**	-0,233**			
IL-1ra	0,574**	0,616**	0,574**	0,288**	0,651**	0,732**	0,665**	0,759**	0,747**	0,390**	0,202**	0,601**		
IFN-γ	0,055	0,177*	0,050	-0,345**	0,042	0,468**	0,539**	0,279**	0,433**	0,001	-0,242**	0,495**	0,616**	
TNF-α	0,740**	0,582**	0,745**	0,506**	0,724**	0,774**	0,593**	0,717**	0,691**	0,414**	0,254**	0,629**	0,805**	0,444**

Continua →

Tabla 58 (continuación). Análisis de correlación de Spearman de las citoquinas entre sí en los dos periodos de estudio

	Periodo de baja exposición													
	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17	IL-1ra	IFN- γ
IL-1β														
IL-2	0,456**													
IL-4	0,889**	0,493**												
IL-5	0,612**	0,404**	0,610**											
IL-6	0,801**	0,545**	0,817**	0,650**										
IL-7	0,859**	0,493**	0,861**	0,612**	0,767**									
IL-9	0,623**	0,542**	0,625**	0,454**	0,700**	0,651**								
IL-10	0,773**	0,487**	0,744**	0,561**	0,786**	0,772**	0,687**							
IL-12p70	0,700**	0,477**	0,692**	0,460**	0,755**	0,743**	0,724**	0,830**						
IL-13	0,542**	0,347**	0,514**	0,381**	0,521**	0,576**	0,500**	0,628**	0,603**					
IL-15	0,365**	0,375**	0,364**	0,315**	0,372**	0,378**	0,332**	0,361**	0,360**	0,290**				
IL-17	0,762**	0,487**	0,780**	0,480**	0,722**	0,793**	0,720**	0,706**	0,786**	0,491**	0,384**			
IL-1ra	0,833**	0,570**	0,793**	0,568**	0,830**	0,789**	0,726**	0,858**	0,841**	0,587**	0,347**	0,786**		
IFN-γ	0,641**	0,332**	0,579**	0,326**	0,571**	0,559**	0,507**	0,593**	0,524**	0,255**	0,258**	0,675**	0,712**	
TNF-α	0,891**	0,439**	0,862**	0,575**	0,817**	0,839**	0,596**	0,788**	0,747**	0,568**	0,402**	0,807**	0,845**	0,690**

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 59. Niveles de citoquinas en suero de la población de estudio (expuestos y controles) y en los dos períodos de estudio (alta vs. baja exposición a plaguicidas) ¹. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	<i>Periodo de alta exposición</i>		<i>Periodo de baja exposición</i>		<i>Diferencia de medias (95 % CI)</i>	<i>p</i>
	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>		
IL-1β	-0,041 ± 0,055	-0.253 ± 0,068	-0.189 ± 0,051	-0,635 ± 0,062	-0,234 (-0,420; -0,049)	0,013
IL-4	-0,149 ± 0,057	-0,386 ± 0,069	-0,270 ± 0,046	-0,657 ± 0,058	-0,150 (-0,323; 0,022)	0,088
IL-5	0,281 ± 0,071	0,019 ± 0,085	-0,133 ± 0,056	-0,489 ± 0,069	-0,095 (-0,328; 0,139)	0,428
IL-7	0,351 ± 0,053	0,091 ± 0,085	0,348 ± 0,053	-0,050 ± 0,063	-0,137 (-0,318; 0,043)	0,134
IL-9	0,819 ± 0,064	0,628 ± 0,072	0,639 ± 0,062	0,357 ± 0,075	-0,091 (-0,293; 0,111)	0,374
IL-10	0,737 ± 0,075	0,476 ± 0,096	0,486 ± 0,077	0,125 ± 0,095	-0,099 (-0,348; 0,149)	0,429
IL-12p70	1,052 ± 0,048	0,816 ± 0,064	0,796 ± 0,062	0,514 ± 0,072	-0,046 (-0,238; 0,146)	0,636
IL-13	0,389 ± 0,034	0,437 ± 0,045	0,297 ± 0,043	0,106 ± 0,050	-0,240 (-0,364; -0,115)	< 0,001
IL-15	0,270 ± 0,053	0,122 ± 0,068	0,133 ± 0,060	-0,301 ± 0,073	-0,286 (-0,466; -0,105)	0,002
IL-17	1,558 ± 0,074	1,607 ± 0,091	1,047 ± 0,068	0,749 ± 0,082	0,192 (-0,058; 0,442)	0,132
IL-1ra	1,630 ± 0,062	1,355 ± 0,078	1,400 ± 0,058	1,1016 ± 0,073	-0,110 (-0,304; 0,084)	0,265
IFN-γ	2,075 ± 0,072	1,885 ± 0,087	1,627 ± 0,058	1,434 ± 0,072	-0,004 (-0,219; 0,211)	0,972
TNF-α	1,148 ± 0,047	0,930 ± 0,059	1,079 ± 0,044	0,766 ± 0,054	-0,095 (-0,244; 0,053)	0,206

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [período de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 60. Análisis de modelos mixtos ¹ de las diferentes citoquinas en la población de estudio. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	IL-1β (n=174)	IL-4 (n=174)	IL-5 (n=173)	IL-7 (n=173)	IL-9 (n=158)	IL-10 (n=169)	IL-12p70 (n=170)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,382** (0,252; 0,512)	0,271** (0,150; 0,392)	0,508** (0,343; 0,674)	0,141* (0,015; 0,267)	0,272** (0,133; 0,411)	0,351* (0,176; 0,526)	0,302** (0,165; 0,439)
Expuestos vs. controles	0,446** (0,266; 0,627)	0,387** (0,218; 0,556)	0,356** (0,154; 0,559)	0,389** (0,214; 0,581)	0,282* (0,063; 0,501)	0,361* (0,088; 0,634)	0,282* (0,076; 0,489)
Hombres vs. mujeres	0,079 (-0,030; 0,188)	0,029 (-0,077; 0,135)	-0,004 (-0,127; 0,120)	0,048 (-0,062; 0,158)	0,068 (-0,057; 0,193)	0,005 (-0,161; 0,171)	0,029 (-0,087; 0,144)
Español vs. Marroquí	-0,063 (-0,220; 0,095)	-0,070 (-0,233; 0,082)	-0,087 (-0,267; 0,094)	0,050 (-0,108; 0,208)	0,085 (-0,110; 0,280)	-0,080 (-0,313; 0,154)	0,070 (-0,093; 0,233)
Edad	0,001 (-0,005; 0,006)	0,003 (-0,002; 0,009)	0,002 (-0,005; 0,008)	-0,001 (-0,007; 0,005)	-0,002 (-0,008; 0,005)	-0,004 (-0,012; 0,005)	-0,002 (-0,008; 0,004)
IMC	0,001 (-0,012; 0,012)	0,002 (-0,010; 0,013)	-0,006 (-0,019; 0,008)	-0,006 (-0,018; 0,006)	0,003 (-0,011; 0,018)	0,002 (-0,016; 0,020)	-0,002 (-0,015; 0,010)
Interacción	-0,234* (-0,420; -0,049)	-0,150# (-0,323; 0,022)	-0,095 (-0,328; 0,139)	-0,137 (-0,318; 0,043)	-0,091 (-0,293; 0,111)	-0,099 (-0,348; 0,149)	-0,046 (-0,238; 0,146)

Continua →

Tabla 60 (continuación). Análisis de modelos mixtos ¹ de las diferentes citoquinas en la población de estudio. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	IL-13 (n=172)	IL-15 (n=174)	IL-17 (n=173)	IL-1ra (n=173)	IFN-γ (n=174)	TNF-α (n=174)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja exposición	0,331** (0,244; 0,418)	0,422** (0,297; 0,548)	0,319** (0,142; 0,495)	0,339** (0,203; 0,475)	0,452** (0,302; 0,602)	0,164* (0,060; 0,267)
Expuestos vs. controles	0,191* (0,047; 0,335)	0,434** (0,225; 0,643)	0,299* (0,058; 0,539)	0,384** (0,174; 0,595)	0,193# (-0,019; 0,405)	0,313** (0,155; 0,471)
Hombres vs. mujeres	0,036 (-0,046; 0,118)	0,040 (-0,084; 0,164)	0,118 (-0,026; 0,262)	0,127# (-0,005; 0,258)	0,201* (0,068; 0,335)	0,126* (0,028; 0,224)
Español vs. Marroquí	-0,056 (-0,172; 0,061)	-0,026 (-0,201; 0,149)	0,058 (-0,151; 0,267)	0,182# (-0,003; 0,368)	0,204* (0,012; 0,397)	0,059 (-0,081; 0,199)
Edad	0,001 (-0,003; 0,005)	0,001 (-0,006; 0,008)	-0,004 (-0,012; 0,003)	-0,005 (-0,012; 0,002)	-0,003 (-0,010; 0,004)	-0,001 (-0,006; 0,004)
IMC	-0,001 (-0,010; 0,008)	0,003 (-0,010; 0,017)	0,008 (-0,008; 0,024)	0,005 (-0,009; 0,019)	0,008 (-0,007; 0,023)	0,006 (-0,005; 0,016)
Interacción	-0,240** (-0,364; -0,115)	-0,286* (-0,466; -0,105)	0,192 (-0,058; 0,442)	-0,110 (-0,304; 0,084)	-0,004 (-0,219; 0,211)	-0,095 (-0,244; 0,053)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3.5.2. Factores de crecimiento

La Tabla 61 muestra el análisis descriptivo y bivalente de los factores de crecimiento estudiados. Al considerar toda la población de estudio y comparar los periodos de alta y baja exposición entre sí, se observaron niveles significativamente más altos de b-FGF y PDGF-BB y más bajos de GM-CSF en el periodo de alta exposición con respecto al de baja exposición. Sin embargo, al estratificar la población por exposición se observó que los controles presentan niveles significativamente más altos de VEGF, b-FGF, PDGF-BB y más bajos de GM-CSF en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Los expuestos, por su parte, presentaban valores significativamente más altos de b-FGF y más bajos de VEGF (aunque próximos al nivel de significación; $p=0,006$) en el periodo alta exposición. Por otro lado, al comparar controles y expuestos en cada uno de los periodos de estudio se observó que los expuestos presentaban valores significativamente más altos de b-FGF que los controles en ambos periodos. Sin embargo, en el de baja exposición los expuestos mostraron valores significativamente más altos de VEGF, b-FGF y PDGF-BB que los controles.

La Tabla 62 muestra el análisis de correlación de los factores de crecimiento estudiados en cada uno de los dos periodos estudiados. En el de alta exposición existía una correlación significativa y directa de todos los parámetros entre sí excepto el GM-CSF, que no se correlaciona con ningún otro. Por su parte, en el periodo de baja exposición se observaron los mismos resultados salvo que el G-CSF solo mostró correlación con b-FGF pero no con los demás factores de crecimiento.

En las Tablas 63 y 64 se presentan los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para los factores de crecimiento (transformados logarítmicamente ya que no seguían una distribución normal) ajustados por: periodo de exposición (Alta vs. Baja), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. Los modelos mixtos no se han aplicado a los dos factores estimulantes de colonias (G-CSF y GM-CSF) debido a su alto número de casos con un valor inferior al LOD. La Tabla 63 muestra las medias y errores estándar de los factores de crecimiento para controles y expuestos en cada periodo de estudio. Tan solo se observó diferencias significativas para el término de interacción en el caso del VEGF.

La Tabla 64, por su parte, presenta los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Se observaron niveles significativamente más altos de VEGF, b-FGF y PDGF-BB en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y en expuestos con respecto a controles. En cuanto al género, los

hombres presentaban niveles significativamente más altos de PDGF-BB que las mujeres. Respecto a la nacionalidad, los españoles mostraron niveles más altos (al borde de la significación estadística; $p < 0,1$) de b-FGF que los marroquíes. La edad no se asoció significativamente con ninguna de las variables de ajuste y el IMC se asoció de forma significativa y directa con el PDGF-BB.

Tabla 61. Niveles de factores de crecimiento en suero de la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	Periodo de alta exposición							Periodo de baja exposición							p valor ^a
	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	% < LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Total															
VEGF	174	7,5	4,66	7,38	5,31	7,66	2,33 – 10,95	172	5,2	4,64	8,67	5,01	7,86	2,45 – 10,00	0,238
b-FGF	174	0,0	21,59	15,00	22,13	25,92	15,82 – 33,53	172	4,6	13,39	12,12	14,36	16,90	8,87 – 21,07	< 0,001
PDGF-BB	174	0,0	280,81	283,56	311,88	383,42	188,12 – 513,32	172	0,6	165,95	296,10	178,56	274,77	80,88 – 373,83	0,002
GM-CSF	174	78,7	NC	15,72	NC	5,34	NC – NC	172	61,6	NC	30,82	NC	11,59	NC – 12,40	0,019
G-CSF	174	27,6	NC	2,22	NC	2,01	NC – 1,76	172	73,3	NC	2,70	NC	2,09	NC – 1,60	0,779
Controles															
VEGF	63	7,9	4,22	5,53	5,07	6,37	1,81 – 8,787	79	10,1	2,61	6,84	2,87	4,58	1,27 – 5,44	< 0,001
b-FGF	63	0,0	16,66	13,69	19,23	20,96	10,24 – 28,27	79	1,3	10,41	9,53	10,03	13,22	7,57 – 17,06	< 0,001
PDGF-BB	63	0,0	229,65	338,74	304,48	369,26	123,31 – 541,28	79	0,0	131,30	344,65	117,75	237,76	64,49 – 225,01	0,001
GM-CSF	63	74,6	NC	10,39	NC	4,50	NC – 1,92	79	60,8	NC	42,80	NC	15,93	NC – 0,40	0,021
G-CSF	63	41,3	NC	1,25	NC	1,72	NC – 1,60	79	91,1	NC	0,72	NC	1,58	NC – NC	0,429
Expuestos															
VEGF	111	7,2	4,93	8,18	5,95	8,39	2,51 – 11,80	93	1,1	7,56	9,10	8,47	10,64**	4,41 – 15,18	0,066
b-FGF	111	0,0	25,02	15,04	26,58	28,74**	17,12 – 36,12	93	1,1	16,60	13,21	17,55	20,02**	12,16 – 27,07	0,008
PDGF-BB	111	0,0	314,77	248,20	328,16	391,45	210,20 – 484,42	93	1,1	202,49	245,11	243,39	306,21**	121,47 – 441,51	0,412
GM-CSF	111	81,1	NC	18,09	NC	5,82	NC – NC	93	62,4	NC	13,54	NC	7,91	NC – 12,64	0,381
G-CSF	111	19,8	1,70	2,61	1,60	2,18	1,41 – 2,03	93	36,6	1,56	3,56	1,60	2,52	1,60 – 1,68	0,414

Unidades: VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular; pg/ml), b-FGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico; pg/ml), PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas BB; pg/ml), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos pg/ml), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, pg/ml).

n: Número de muestras; **%<LOD:** Porcentaje de casos no detectables; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **MA:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%); **NC:** No calculado (el porcentaje de valores por debajo del LOD es superior al 25 %).

^a Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

* p<0.05, **p< 0.01 Test U de Mann-Whitney de la comparación entre controles y expuestos.

Tabla 62. Análisis de correlación de Spearman de los factores de crecimiento en cada uno de los periodos de estudio

	Periodo de alta exposición				Periodo de baja exposición			
	VEGF	b-FGF	PDGF-BB	GM-CSF	VEGF	b-FGF	PDGF-BB	GM-CSF
VEGF								
b-FGF	0,777**				0,767**			
PDGF-BB	0,616**	0,560**			0,567**	0,611**		
GM-CSF	- 0,014	- 0,010	- 0,051		0,136	0,125	0,122	
G-CSF	0,261**	0,398**	0,157*	- 0,015	0,132	0,157*	0,122	0,009

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 63. Niveles séricos de factores de crecimiento en la población de estudio (expuestos y controles) en los periodos de alta y baja exposición a plaguicidas)¹. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	Periodo de alta exposición		Periodo de baja exposición		Diferencia de medias (95 % CI)	p
	Expuestos	Controles	Expuestos	Controles		
VEGF	0,725 ± 0,067	0,575 ± 0,082	0,856 ± 0,060	0,345 ± 0,073	-0,361 (-0,580; -0,142)	0,001
b-FGF	1,402 ± 0,037	1,160 ± 0,047	1,211 ± 0,041	0,962 ± 0,049	-0,008 (-0,139; 0,123)	0,904
PDGF-BB	2,497 ± 0,053	2,316 ± 0,069	2,280 ± 0,061	2,096 ± 0,073	-0,003 (-0,194; 0,188)	0,977

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs.baja, expuestos vs.controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

No se realizó el análisis de modelos mixtos lineales al GM-CSF y G-CSF debido al alto número de casos con un valor inferior al LOD.

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 64. Análisis de modelos mixtos ¹ de los diferentes marcadores de factores de crecimiento en la población de estudio. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	VEGF (n=173)	b-FGF (n=173)	PDGF-BB (n=174)
	Media (95% CI)	Media (95% CI)	Media (95% CI)
Alta vs. baja periodo exposición	0,230* (0,076; 0,384)	0,199** (0,108; 0,290)	0,220* (0,087; 0,354)
Expuestos vs. controles	0,511** (0,298; 0,724)	0,249** (0,108; 0,391)	0,184# (-0,027; 0,395)
Hombres vs. mujeres	-0,076 (-0,206; 0,054)	0,016 (-0,067; 0,099)	0,161* (0,038; 0,284)
Español vs. Marroquí	0,035 (-0,153; 0,223)	0,115# (-0,044; 0,234)	0,116 (-0,059; 0,290)
Edad	0,01 (-0,007; 0,006)	-0,003 (-0,007; 0,002)	-0,002 (-0,009; 0,004)
IMC	0,002 (-0,013; 0,016)	0,002 (-0,007; 0,011)	0,013* (0,000; 0,027)
Interacción	-0,361* (-0,580; -0,142)	-0,008 (-0,139; 0,123)	-0,003 (-0,194; 0,188)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

No se realizó el análisis de modelos mixtos lineales al GM-CSF y G-CSF debido al alto número de casos con un valor inferior al LOD.

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

3.5.3. Quimioquinas

La Tabla 65 muestra el análisis descriptivo y bivalente de las quimioquinas estudiadas. Al considerar toda la población de estudio se observaron diferencias significativas en MIP-1 α y RANTES y al borde de la significación en IP-10, observando niveles mayores de MIP-1 α y IP-10 y menores de RANTES en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Al estratificar la población por exposición, los controles presentaron valores significativamente más altos de MCP-1 y MIP-1 α y más bajos de RANTES en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Por su parte, los expuestos presentaron valores significativamente más altos de MIP-1 α y más bajos de MCP-1 y RANTES en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Al comparar controles y expuestos en cada periodo de estudio, la población expuesta presentó valores significativamente más altos de MIP-1 α , MIP-1 β y eotaxina en ambos periodos de estudio, así como de RANTES en el periodo de baja exposición en comparación a los controles. Por el contrario, los expuestos presentaron niveles más bajos de IP-10 que los controles en el periodo de alta exposición.

La Tabla 66 muestra el análisis de correlación de las quimioquinas en los dos periodos de estudio. En general se observaron correlaciones significativas de todas ellas entre sí con excepción del MCP-1, que tan solo mostró correlación con MIP-1 α y eotaxina en el periodo de alta exposición. En este mismo periodo, RANTES no se correlacionó con MCP-1 ni MIP-1 α , pero sí con el resto de quimioquinas. Por el contrario, en el periodo de baja exposición se observaron correlaciones significativas de todas las quimioquinas entre sí excepto el IP-10, que solo se correlacionó significativamente con MCP-1 y MIP-1 β . En casi todos los casos las correlaciones significativas fueron directas excepto la de IP-10 con RANTES e IL-8, que es inversa en el periodo de alta exposición.

Las Tablas 67 y 68 muestran los resultados del análisis de modelos mixtos lineales para las quimioquinas ajustados por periodo de exposición (Alta vs. Baja exposición), Expuestos vs. Controles, Hombres vs. Mujeres, Español vs. Marroquí, Edad, IMC y el término de interacción [Alta vs. Baja exposición] * [Expuestos vs. Controles]. Previamente los datos fueron transformados logarítmicamente ya que no seguían una distribución normal. La Tabla 67 muestra las medias y errores estándar de las quimioquinas en controles y expuestos en cada periodo de estudio. No se observaron asociaciones estadísticamente significativas para el término de interacción en ninguno de los casos salvo para RANTES, que estaban próximas a la significación estadística ($p=0,079$).

La Tabla 68 presenta los resultados del análisis de modelos mixtos indicando los parámetros correspondientes a cada una de las variables de ajuste y su significación estadística. Las quimioquinas IL-8, IP-10, MIP-1 α y MIP-1 β mostraban valores significativamente más altas en el periodo de alta exposición que en el de baja. Por su parte, los expuestos presentaban valores significativamente superiores de IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES y eotaxina que los controles. En relación al género, los hombres presentaban niveles más altos de MIP-1 α y eotaxina que las mujeres. Por nacionalidades, los españoles poseían niveles mayores de IP-10, MCP-1 y MIP-1 α que los marroquíes, pero más bajos de IL-8 y RANTES. La edad se asoció de forma significativa y directa con MCP-1 y eotaxina e inversamente con MIP-1 α . Por último, el IMC tan solo mostró una asociación negativa con RANTES.

Tabla 65. Niveles de quimioquinas en suero de la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio

	<i>Periodo de alta exposición</i>							<i>Periodo de baja exposición</i>							<i>p valor^a</i>
	<i>n</i>	<i>%<LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25 – P75</i>	<i>n</i>	<i>%<LOD</i>	<i>M_G</i>	<i>SD</i>	<i>MED</i>	<i>M_A</i>	<i>P25 – P75</i>	
Total															
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	174	16,7	2,03	1,71	1,80	2,47	1,20 – 3,29	172	16,3	1,78	6,24	1,69	2,87	1,20 – 3,01	0,198
<i>IP-10 (CXCL10)</i>	174	0,0	169,60	226,35	138,42	236,67	89,15 - 333,16	172	0,0	128,99	184,43	117,96	168,81	85,95 - 164,40	0,053
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	174	20,7	2,75	5,01	4,72	4,89	0,93 – 7,29	172	13,4	3,02	9,21	3,74	5,91	1,26 – 6,67	0,859
<i>MIP-1α (CCL3)</i>	174	0,0	2,31	2,48	2,26	2,88	1,56 – 3,16	172	1,2	1,38	1,53	1,37	1,77	0,96 – 2,16	< 0,001
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	174	0,0	8,46	7,07	8,39	10,08	5,67 – 11,76	172	0,0	7,37	4,16	7,26	8,25	5,44 – 10,19	0,133
<i>RANTES (CCL5)</i>	174	0,6	1718,26	1160,53	1583,86	1962,76	1323,72 – 2084,04	172	0,6	2193,63	2331,32	2217,88	2751,81	1460,05 – 3169,92	< 0,001
<i>Eotaxina (CCL11)</i>	174	1,1	11,42	27,22	12,27	17,76	8,01 – 20,36	172	8,1	8,99	32,85	10,62	15,20	5,84 – 18,06	0,847
Controles															
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	63	30,2	NC	0,97	NC	1,50	NC – 1,57	79	26,6	NC	0,88	NC	1,32	NC – 1,39	0,097
<i>IP-10 (CXCL10)</i>	63	0,0	200,28	262,49	195,31	272,33	110,26 – 351,65	79	0,0	151,71	256,26	122,82	224,14	86,20 – 221,33	0,080
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	63	14,3	3,06	6,02	5,72	5,45	0,83 – 7,25	79	8,9	2,66	10,91	2,84	5,32	1,22 – 5,51	0,020
<i>MIP-1α (CCL3)</i>	63	0,0	1,85	2,45	1,88	2,47	1,14 – 2,54	79	1,3	1,11	1,05	1,13	1,42	0,76 – 1,69	< 0,001
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	63	0,0	6,76	4,10	4,10	6,82	4,88 – 9,82	79	0,0	6,20	4,13	6,17	7,04	4,80 – 7,82	0,098
<i>RANTES (CCL5)</i>	63	0,0	1527,23	785,97	1576,18	1675,27	1263,10 – 1716,55	79	1,3	1757,64	2356,81	1646,29	2177,96	1275,38 – 2316,27	0,002
<i>Eotaxina (CCL11)</i>	63	1,6	7,52	40,45	8,55	16,01	4,82 – 13,69	79	13,7	7,02	47,03	8,15	15,13	4,34 – 13,07	0,305

Continua →

Tabla 65 (continuación). Niveles de quimioquinas en suero de la población de estudio (en su conjunto y estratificada por exposición) en los dos períodos de estudio.

	Periodo de alta exposición							Periodo de baja exposición							p valor ^a
	n	%<LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	n	%<LOD	M _G	SD	MED	M _A	P25 – P75	
Expuestos															
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	111	9,0	2,55	1,79	2,61	3,02	1,52 – 3,99	93	7,5	2,68	8,24	2,58	4,19	1,71 – 3,88	0,320
<i>IP-10 (CXCL10)</i>	111	0,0	154,32	201,49	126,56	216,44**	85,10 – 308,60	93	0,0	112,38	51,81	115,51	121,81	85,50 – 148,26	0,373
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	111	24,3	2,60	4,34	3,71	4,71	0,83 – 7,41	93	14,0	3,36	7,49	4,69	6,41	1,33 – 8,34	0,033
<i>MIP-1α (CCL3)</i>	111	0,0	2,31	2,47	2,49	3,11**	1,83 – 3,39	93	1,1	1,65	1,80	1,59	2,07**	1,16 – 2,59	0,007
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	111	0,0	9,61	8,03	9,05	11,37**	6,55 – 13,00	93	0,0	8,54	3,91	8,55	9,28**	6,49 – 11,07	0,667
<i>RANTES (CCL5)</i>	111	0,9	1837,12	1302,23	1649,57	2125,94	1325,68 – 2432,67	93	0,0	2647,95	2206,78	2822,00	3239,27**	2049,29 – 3819,46	0,003
<i>Eotaxina (CCL11)</i>	111	0,9	14,48	15,50	14,61	18,75**	9,90 – 21,35	93	4,3	11,08	11,41	14,06	15,26*	6,68 – 19,79	0,238

Unidades: *IL-8* (interleuquina 8; pg/ml), *IP-10* (proteína 10 inducida por IFN-γ; pg/ml), *MCP-1* (proteína 1 quimioatrayente de monocitos; pg/ml), *MIP-1α* (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa; pg/ml), *MIP-1β* (proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta; pg/ml), *RANTES* (quimioquina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T, pg/ml), *eotaxina* (citoquina quimiotáctica de eosinófilos; pg/ml).

n: Número de muestras; **%<LOD:** Porcentaje de casos no detectables; **M_G:** Media geométrica; **SD:** Desviación estándar; **M_A:** Media aritmética; **MED:** Mediana; **P25 – P75:** Rango intercuartil (percentiles 25 % -75%); **NC:** No calculado (el porcentaje de valores por debajo del LOD es superior al 25 %).

^a Prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

* p<0.05, **p<0.01 Test U de Mann-Whitney de la comparación entre controles y expuestos.

Tabla 66. Análisis de correlación de Spearman de las quimioquinas estudiadas en los dos periodos de estudio. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	<i>Periodo de alta exposición</i>						<i>Periodo de baja exposición</i>					
	<i>IL-8</i>	<i>IP-10</i>	<i>MCP-1</i>	<i>MIP-1α</i>	<i>MIP-1β</i>	<i>RANTES</i>	<i>IL-8</i>	<i>IP-10</i>	<i>MCP-1</i>	<i>MIP-1α</i>	<i>MIP-1β</i>	<i>RANTES</i>
<i>IL-8 (CXCL8)</i>												
<i>IP-10 (CXCL10)</i>	- 0,279**						- 0,023					
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	0,123	0,146					0,350**	0,181*				
<i>MIP-1α (CCL3)</i>	0,441**	0,344**	0,415**				0,522**	0,107	0,373**			
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	0,414**	0,382**	0,133	0,664**			0,520**	0,314**	0,368**	0,414**		
<i>RANTES (CCL5)</i>	0,509**	- 0,225**	- 0,081	0,020	0,255**		0,364**	- 0,026	0,278**	0,189*	0,359**	
<i>Eotaxina (CCL10)</i>	0,387**	0,123	0,476**	0,629**	0,463**	0,091	0,467**	0,072	0,565**	0,535**	0,440**	0,267**

Asociación significativa: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 67. Niveles de quimioquinas en suero de la población de estudio (expuestos y controles) en dos períodos de alta y baja exposición a plaguicidas ¹. Unidades: pg/ml para todos los parámetros

	<i>Periodo de alta exposición</i>		<i>Periodo de baja exposición</i>		<i>Diferencia de medias (95 % CI)</i>	<i>p</i>
	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>	<i>Expuestos</i>	<i>Controles</i>		
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	0,372 ± 0,030	0,203 ± 0,039	0,366 ± 0,038	0,107 ± 0,044	-0,090 (-0,209; 0,030)	0,140
<i>IP-10 (CXCL10)</i>	2,272 ± 0,043	2,201 ± 0,052	2,132 ± 0,034	2,075 ± 0,044	0,013 (-0,112; 0,139)	0,832
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	0,573 ± 0,068	0,282 ± 0,085	0,580 ± 0,071	0,209 ± 0,084	-0,081 (-0,336; 0,174)	0,533
<i>MIP-1α (CCL3)</i>	0,430 ± 0,036	0,218 ± 0,040	0,213 ± 0,041	-0,008 ± 0,040	-0,009 (-0,134; 0,117)	0,890
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	1,001 ± 0,032	0,811 ± 0,039	0,946 ± 0,026	0,777 ± 0,032	0,002 (-0,004; 0,009)	0,686
<i>RANTES (CCL5)</i>	3,230 ± 0,026	3,228 ± 0,033	3,376 ± 0,035	3,273 ± 0,039	-0,101 (-0,213; 0,012)	0,079
<i>Eotaxina (CCL11)</i>	1,166 ± 0,056	0,806 ± 0,071	1,077 ± 0,054	0,809 ± 0,067	0,092 (-0,080; 0,264)	0,293

¹ Análisis de modelo mixto con covarianza no estructurada ajustada por período de exposición alta vs. baja, expuestos vs. controles, género, nacionalidad, edad, IMC y el término de interacción [período de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

Los datos corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron transformados logarítmicamente. La diferencia de medias se calcula como sigue: (media expuestos alta exposición - media controles alta exposición) - (media expuestos baja exposición - media controles baja exposición).

p: significación estadística para el término de interacción.

Tabla 68. Análisis de modelos mixtos ¹ de quimioquinas en la población de estudio. *Unidades: pg/ml para todos los parámetros*

	IL-8 (n=182)	IP-10(n=173)	MCP-1 (n=173)	MIP-1α (n=173)	MIP-1β (n=174)	RANTES (n=174)	Eotaxina (n=173)
	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>	<i>Media (95% CI)</i>
Alta vs. baja exposición	0,096* (0,012; 0,180)	0,127* (0,039; 0,215)	0,074 (-0,108; 0,255)	0,225** (0,139; 0,312)	0,617** (0,418; 0,815)	-0,045 (-0,126; 0,035)	-0,003 (-0,123; 0,117)
Expuestos vs. controles	0,259** (0,133; 0,386)	0,058 (-0,070; 0,185)	0,372* (0,128; 0,615)	0,221* (0,082; 0,360)	0,034 (-0,040; 0,108)	0,103# (-0,011; 0,217)	0,268* (0,074; 0,463)
Hombres vs. mujeres	0,007 (-0,063; 0,077)	-0,050 (-0,086; 0,077)	-0,059 (-0,199; 0,081)	0,048 (-0,033; 0,130)	0,169** (0,075; 0,264)	-0,016 (-0,075; 0,043)	0,210** (0,088; 0,333)
Español vs. Marroquí	-0,155* (-0,255; -0,055)	0,146* (0,030; 0,262)	0,231* (0,029; 0,432)	0,107# (-0,010; 0,223)	0,008 (-0,049; 0,066)	-0,091* (-0,177; -0,006)	0,055 (-0,117; 0,227)
Edad	0,002 (-0,002; 0,006)	0,001 (-0,003; 0,005)	0,007# (-0,001; 0,014)	-0,001* (-0,005; 0,004)	0,021 (-0,063; 0,105)	-0,001 (-0,004; 0,002)	0,008* (0,002; 0,014)
IMC	0,004 (-0,003; 0,012)	0,007 (-0,002; 0,016)	-0,004 (-0,020; 0,011)	0,001 (-0,007; 0,010)	0,002 (-0,001; 0,005)	0,008* (0,002; 0,015)	-0,001 (-0,014; 0,013)
Interacción	-0,090 (-0,209; 0,030)	0,013 (-0,112; 0,139)	-0,081 (-0,336; 0,174)	-0,009 (-0,134; 0,117)	0,002 (-0,004; 0,009)	-0,101# (-0,213; 0,012)	0,092 (-0,080; 0,264)

¹ Modelos lineales mixtos con participantes como efecto aleatorio ajustado por las variables que aparecen en la columna de la izquierda.

Los datos representan la media (95% intervalo de confianza). Los datos fueron transformados logarítmicamente. El parámetro interacción hace referencia el término de interacción [periodo de exposición alta vs. baja] * [control vs. expuestos].

**p < 0,001, *p < 0,05, #p < 0,1

Capítulo 7

DISCUSION

1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Al comparar los dos grupos de trabajadores entre sí (expuestos frente a controles) mostraron diferencias significativas en algunas características que podrían influir sobre los resultados obtenidos (Tabla 30). Durante la fase de diseño del estudio no fue posible controlar dichas diferencias debido a la dificultad de encontrar una Mutua que consintiera la participación de sus trabajadores y, posteriormente, que ellos aceptaran someterse voluntariamente a dos extracciones de sangre en un periodo de tiempo relativamente corto, de varios meses.

En cuanto a las diferencias encontradas destaca la edad, pues los expuestos (trabajadores de invernadero) eran, por término medio, 10 años más jóvenes que los controles ($38,2 \pm 10,4$ frente a $48,4 \pm 8,4$ años, respectivamente); sin embargo, este hecho atenuaría las posibles diferencias que pudieran existir en los parámetros bioquímicos estudiados y que se pudieran ver afectados por la edad, pues serían más acentuados en los controles que en los expuestos. También se observaron diferencias significativas por sexo (Figura 31), ya que los varones predominaban en el grupo de expuestos mientras que en los controles había una mayor proporción de mujeres. Esto, en principio, puede afectar también a algunos resultados ya que algunos parámetros analíticos pueden variar según sexo, no solo por las diferencias genéticas y hormonales sino también por sus diferentes estilos de vida. Además, el grupo expuesto estaba constituido mayoritariamente por marroquíes mientras que el control por españoles, lo cual supone importantes diferencias de tipo cultural, dietético, estilos de vida, genéticas, etc. En cuanto a los estilos de vida, hay una mayor proporción de individuos que no fumaban ni bebían alcohol en el grupo de expuestos que en el control, que mostraban más hábitos tóxicos (Figuras 32 y 33). Al igual que ocurría con la edad, esto favorece que los controles puedan presentar más alteraciones relacionadas con el consumo de tabaco y alcohol que los expuestos, lo cual disminuiría la fuerza de asociación o daría lugar a falsos resultados negativos, pero los hallazgos no se atribuirían putativamente a la exposición a plaguicidas. En cuanto al IMC, ambos grupos mostraron valores muy parecidos, por lo que en principio esta variable no ejercería efecto sobre las posibles diferencias que se pudieran observar.

En vista de lo anterior, en el presente estudio, además de realizar análisis estadísticos bivariantes, los parámetros analíticos se analizaron mediante modelos mixtos lineales, que permiten tener en cuenta varias medidas de un biomarcador y de un mismo individuo en dos periodos de tiempo diferentes (alta y baja exposición) y ajustar por variables potencialmente confusoras.

En un estudio preliminar sobre la misma población de trabajadores (García-García, 2016) se comparó la dieta de los trabajadores de invernadero con la de los controles, ya que la ingestión de residuos de plaguicidas a través de alimentos podría contribuir a una mayor exposición en alguno de los grupos e introducir así cierta distorsión en las asociaciones encontradas. No obstante, la importancia de la dieta como posible factor de confusión sobre la exposición a plaguicidas se consideró mínima ya que según el programa de monitorización de residuos de plaguicidas en alimentos realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el año en que se llevó a cabo el estudio (2011), el 97.5% de las muestras de alimentos analizadas no contenían residuos de plaguicidas o estos se encontraban por debajo de los límites máximos permitidos por la legislación comunitaria (*European Food Safety Authority*, 2014). Sin embargo, a través de la dieta se pueden ingerir también otros contaminantes ambientales o incluso sustancias que se producen durante el procesado de los alimentos y que pueden producir un efecto perjudicial sobre la salud. Esto representa una dificultad añadida a la hora de determinar si alguno de los efectos observados en este estudio se debe a la exposición a plaguicidas o a otras sustancias químicas presentes en la dieta y que es difícil de evaluar. García-García (2016) observó que los trabajadores de invernadero consumían significativamente más carnes (rojas y blancas) y huevos que los controles, pero menos embutidos, verduras, legumbres, productos lácteos y pan, no existiendo diferencias en cuanto al consumo de frutas o zumos de frutas. De este hallazgo no se puede inferir que el tipo de dieta ejerza un efecto relevante sobre los biomarcadores estudiados. García-García (2016) también concluyó que la dieta no parecía influir sobre los síntomas o signos clínicos de los dos grupos de estudio así como sobre los niveles de sus parámetros analíticos (hemograma y bioquímica estándar).

2. BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

2.1. Metabolitos de compuestos organofosforados (dialquilfosfatos, DAPs)

Tanto la población total como los controles y trabajadores de invernadero no mostraron diferencias significativas de todos los DAPs entre los periodos de alta y baja exposición, a excepción del DEDTP, Σ DMs, Σ DEs y Σ DAPs, cuyos niveles eran significativamente más altos en el periodo de alta exposición que en el de baja (Tabla 31). Además, los niveles de metabolitos dimetilos fueron mayores que los de metabolitos dietilos, fenómeno que se produce a expensas principalmente del DMP, que es el metabolito que presenta valores más altos. Esto hace suponer que la exposición ha sido mayor a compuestos OPs metilos que a OPs etilos (Aguilar-Garduño et al., 2013). Este hallazgo es consistente

con lo publicado previamente, ya que el DMP es el metabolito más comúnmente detectado, sobre todo tras la exposición ocupacional a plaguicidas OPs (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Kokkinaki et al., 2014). Los niveles urinarios de DAPs varían con el tipo de aplicación de campo, el uso estacional del insecticida padre y muestran una importante variabilidad en función de la hora del día o del día concreto en que se analicen, lo que indica la importancia no solo de la exposición a plaguicidas OPs padre sino también el momento de la recogida de la muestra de orina y su cinética de eliminación, ya que la vida media de eliminación de DAPs en mamíferos es de horas a semanas (CDC, 2016).

No obstante, la presencia de DAPs en frutas y verduras puede confundir los resultados de estudios de biomonitorización relacionados con la exposición a los insecticidas OPs y también la evaluación del riesgo. La hidrólisis abiótica, la fotólisis y el metabolismo de las plantas pueden convertir los residuos de plaguicidas OPs presentes en frutas y hortalizas en DAPs (Zhang et al., 2008). Si se hace abstracción de los metabolitos DAPs preformados en el ambiente y que se han podido absorber tal cual a través de la dieta o exposición ambiental (Lu et al., 2005), la existencia de niveles más altos de DMP que de DMTP indicaría que los plaguicidas OPs padre absorbidos han sufrido reacción de desulfuración oxidativa hacia el correspondiente oxón dentro del organismo y que posteriormente han sido hidrolizados a metabolitos DMP vía PON1. De los 11 plaguicidas OPs autorizados actualmente por la Comisión Europea para su uso en agricultura, 6 producen metabolitos metilos y tan solo uno (clorpirifós) metabolitos etilos (Tabla 4), si bien este último es uno de los OPs más usados como fitosanitario. Esto podría explicar el hecho de encontrar mayores niveles de metabolitos dimetilo que de dietilos en toda la población de estudio, independientemente de que sean trabajadores o controles. Por su parte, en EEUU la US-EPA tiene registrados unos 40 compuestos OPs en diversas formulaciones comerciales (CDC, 2016), la mayoría de los cuales producen metabolitos dimetilos.

Por otro lado, el que los controles presenten niveles más altos de DAPs que los expuestos indica un origen no ocupacional sino muy probablemente alimentario y, en menor medida, ambiental. Hay que tener en cuenta que este estudio se realizó sobre trabajadores de invernadero que cultivaban tomates, pepinos y calabacines y que no había evidencias agronómicas de que en el marco temporal estudiado se utilizaran compuestos OPs como fitosanitarios (García-García et al., 2016). El hecho de que los españoles presenten niveles de DAPs más altos que los marroquíes (Tabla 34) parece indicar que los hábitos dietéticos de ambos grupos son diferentes, siendo probable que los primeros ingieran mayor cantidad de frutas y verduras, que son los alimentos que presentan más residuos de estos plaguicidas. Asimismo, la existencia de niveles más altos de DAPs en el periodo de alta exposición (Tabla 34) sugiere que esa época (noviembre y diciembre de 2011) se hizo un mayor consumo de estos alimentos que el periodo de baja exposición (mayo-junio de 2011).

El aumento de los niveles de DAPs en orina refleja una exposición reciente a plaguicidas OPs. De hecho, según estudios previos (Griffin et al., 1999; Ueyama et al., 2012), las concentraciones de DAPs en orina alcanzan su nivel máximo 7 horas después de la administración oral de clorpirifós y su vida media de eliminación fue de 15,5 horas, recuperándose el 93% de la dosis oral en el plazo de 5 días. Estos datos sugieren que las concentraciones urinarias de DAP no reflejarían exposición a OPs, ocupacional o de cualquier otro tipo, más allá de 2 o 3 días.

Como ya se ha mencionado anteriormente (Figura 11), la biotransformación de los plaguicidas ocurre por diferentes vías metabólicas y a una velocidad también diferente. En líneas generales, los OPs se metabolizan en el hígado a su derivado oxón, que es el que posee actividad insecticida y tóxica para humanos, el cual posteriormente se hidroliza a diversos DAPs (DMP, DEP). Alternativamente, el plaguicida intacto (compuesto padre) puede sufrir una rotura oxidativo del grupo saliente, generando otros DAPs. Al comparar los dos grupos de trabajadores entre sí (expuestos frente a controles) mostraron diferencias significativas en algunas características que podrían influir sobre los resultados obtenidos (Tabla 30). Durante la fase de diseño del estudio no fue posible controlar dichas diferencias debido a la dificultad de encontrar una Mutua que consintiera la participación de sus trabajadores y, posteriormente, que ellos aceptaran someterse voluntariamente a dos extracciones de sangre en un periodo de tiempo relativamente corto, de varios meses.

En cuanto a las diferencias encontradas destaca la edad, pues los expuestos (trabajadores de invernadero) eran, por término medio, 10 años más jóvenes que los controles ($38,2 \pm 10,4$ frente a $48,4 \pm 8,4$ años, respectivamente); sin embargo, este hecho atenuaría las posibles diferencias que pudieran existir en los parámetros bioquímicos estudiados y que se pudieran ver afectados por la edad, pues serían más acentuados en los controles que en los expuestos. También se observaron diferencias significativas por sexo (Figura 31), ya que los varones predominaban en el grupo de expuestos mientras que en los controles había una mayor proporción de mujeres. Esto, en principio, puede afectar también a algunos resultados ya que algunos parámetros analíticos pueden variar según sexo, no solo por las diferencias genéticas y hormonales sino también por sus diferentes estilos de vida. Además, el grupo expuesto estaba constituido mayoritariamente por marroquíes mientras que el control por españoles, lo cual supone importantes diferencias de tipo cultural, dietético, estilos de vida, genéticas, etc. En cuanto a los estilos de vida, hay una mayor proporción de individuos que no fumaban ni bebían alcohol en el grupo de expuestos que en el control, que mostraban más hábitos tóxicos (Figuras 32 y 33). Al igual que ocurría con la edad, esto favorece que los controles puedan presentar más alteraciones relacionadas con el consumo de tabaco y alcohol que los expuestos, lo cual disminuiría la fuerza de asociación o daría lugar a falsos resultados negativos, pero los hallazgos no se atribuirían

putativamente a la exposición a plaguicidas. En cuanto al IMC, ambos grupos mostraron valores muy parecidos, por lo que en principio esta variable no ejercería efecto sobre las posibles diferencias que se pudieran observar.

En vista de lo anterior, en el presente estudio, además de realizar análisis estadísticos bivariantes, los parámetros analíticos se analizaron mediante modelos mixtos lineales, que permiten tener en cuenta varias medidas de un biomarcador y de un mismo individuo en dos periodos de tiempo diferentes (alta y baja exposición) y ajustar por variables potencialmente confusoras.

En un estudio preliminar sobre la misma población de trabajadores (García-García, 2016) se comparó la dieta de los trabajadores de invernadero con la de los controles, ya que la ingestión de residuos de plaguicidas a través de alimentos podría contribuir a una mayor exposición en alguno de los grupos e introducir así cierta distorsión en las asociaciones encontradas. No obstante, la importancia de la dieta como posible factor de confusión sobre la exposición a plaguicidas se consideró mínima ya que según el programa de monitorización de residuos de plaguicidas en alimentos realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el año en que se llevó a cabo el estudio (2011), el 97.5% de las muestras de alimentos analizadas no contenían residuos de plaguicidas o estos se encontraban por debajo de los límites máximos permitidos por la legislación comunitaria (*European Food Safety Authority*, 2014). Sin embargo, a través de la dieta se pueden ingerir también otros contaminantes ambientales o incluso sustancias que se producen durante el procesado de los alimentos y que pueden producir un efecto perjudicial sobre la salud. Esto representa una dificultad añadida a la hora de determinar si alguno de los efectos observados en este estudio se debe a la exposición a plaguicidas o a otras sustancias químicas presentes en la dieta y que es difícil de evaluar. García-García (2016) observó que los trabajadores de invernadero consumían significativamente más carnes (rojas y blancas) y huevos que los controles, pero menos embutidos, verduras, legumbres, productos lácteos y pan, no existiendo diferencias en cuanto al consumo de frutas o zumos de frutas. De este hallazgo no se puede inferir que el tipo de dieta ejerza un efecto relevante sobre los biomarcadores estudiados. García-García (2016) también concluyó que la dieta no parecía influir sobre los síntomas o signos clínicos de los dos grupos de estudio así como sobre los niveles de sus parámetros analíticos (hemograma y bioquímica estándar).

Todos esos metabolitos se excretan finalmente por la orina (Barr et al., 2004). Por eso, una exposición a plaguicidas OPs produce, a corto plazo y de una manera proporcional, un aumento en la excreción urinaria de DAPs que, dependiendo de cuál sea el OPs del que proceda, será de una naturaleza u otra (Tabla 26).

En definitiva, se puede concluir que al no existir evidencias agronómicas de que la población de estudio estuviera expuesta de forma ocupacional a plaguicidas OPs durante el marco temporal estudiado, los niveles de DAPs observados en orina se deben a la ingesta a través de la dieta de metabolitos preformados. Existen estudios que indican que la exposición a OPs a largo plazo y a través de la dieta da lugar a mayores niveles de OPs en el organismo (Curl et al., 2015). Estos resultados son coherentes con estudios recientes que sugieren que los consumidores habituales de fruta y verdura presentan una exposición a plaguicidas OPs significativamente mayor que los consumidores de productos ecológicos, por lo que sus niveles urinarios de DAPs son más elevados (Berman et al., 2016; Curl et al., 2015; Oates et al., 2014).

2.2. Esterasas

2.2.1. Colinesterasas sanguíneas

Las colinesterasas sanguíneas se han utilizado como biomarcadores para evaluar la exposición a insecticidas OPs y, en menor medida, *N*-metilcarbamatos, si bien su utilidad es mayor en exposiciones agudas a dosis altas que en a dosis bajas (McCauley et al., 2006). En el presente estudio, la actividad AChE mostró niveles significativamente más bajos en el periodo de alta exposición que en el de baja y al estratificar por exposición los trabajadores de invernadero tenían niveles significativamente más bajos que los controles (Tabla 35). Como los trabajadores no estaban expuestos a compuestos OPs, una posible explicación al descenso de AChE puede ser que numerosos plaguicidas tienen la capacidad de generar, de manera indirecta, moléculas oxidantes capaces de atacar a los lípidos de las membranas celulares, incluida la de los eritrocitos, e inducir peroxidación lipídica, que altera la permeabilidad e integridad de las membranas (El-Demerdash, 2011) así como la actividad de los enzimas asociados a ellas. La AChE, que se encuentra en la superficie de los eritrocitos y se encarga de mantener la integridad de los mismos, puede ser inhibida como consecuencia de la peroxidación lipídica de la membrana (Aloni y Livne, 1974). La AChE es una enzima con una alta sensibilidad al estrés nitro/oxidativo y que se inhibe en condiciones oxidativas (Milatovic et al., 2006; Weiner et al., 1994). Esto es lo que ocurre con los plaguicidas, los cuales son capaces de alterar la homeostasis oxidativa por la generación de radicales libres, peroxidación de lípidos o alteración de sistemas enzimáticos antioxidantes que actuarían a modo de *scavenging* de estas moléculas altamente reactivas (Mostafalou y Abdollahi, 2013; Singh et al., 2007). En particular, los piretroides provocan una disminución de la AChE en eritrocitos y cerebro como consecuencia de un aumento de la peroxidación de lípidos (El-Demerdash, 2007). Estudios experimentales también han mostrado disminuciones

significativas de la actividad de AChE con diversos fungicidas triazólicos (Zhu et al., 2014). En un estudio previo, también se encontró una actividad AChE significativamente más baja en trabajadores expuestos tanto a plaguicidas OPs como no OPs (Hernández et al., 2005). Del mismo modo, estudios posteriores llevados a cabo en trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas, como es nuestro caso, también encontraron un descenso significativo de la AChE asociado a la exposición (Bernal-Hernández et al., 2014; Miranda-Contreras et al., 2013; Quandt et al., 2015). Por tanto, la AChE puede considerarse como un biomarcador de utilidad para evaluar la exposición crónica a plaguicidas (sean o no OPs) en trabajadores de invernadero. En este último caso, la actividad AChE actuaría como un marcador sustituto de estrés oxidativo en trabajadores expuestos a plaguicidas (Hernández et al., 2013a; López, 2005).

En contraposición a la AChE, las colinesterasas séricas estudiadas mostraron un comportamiento dependiente del sustrato utilizado. Así, la BuChE presentó una mayor actividad en la población expuesta que en los controles independientemente del periodo de estudio (Tablas 35 y 38). Por su parte, la BeChE de los expuestos presentaba niveles significativamente más bajos (alrededor de un 20%) en el periodo de alta exposición que en el de baja, mientras que la de los controles permaneció prácticamente inalterada (Tabla 38). La falta de oscilaciones en la BeChE en los controles permite excluir posibles variaciones estacionales o de otro tipo, por lo que la variación observada en los trabajadores de invernadero puede atribuirse a la exposición a plaguicidas. Sin embargo, esto no sucede con la BuChE, pues sus niveles fueron significativamente mayores en el periodo de alta exposición que en el de baja (Tablas 35 y 38). Los niveles de BeChE y BuChE pueden afectarse no solo por la exposición a plaguicidas anticolinesterásicos sino también por el consumo de algunos fármacos (anticonceptivos orales, morfina, codeína, citostáticos, IMAO) o por determinadas enfermedades (hepatopatía, inflamación, infección, cáncer, malnutrición, infarto de miocardio) (Hernández Jerez, 2012). Pero la población de estudio no consumía ninguno de esos medicamentos ni tampoco presentaba esas enfermedades (pues eran criterios de exclusión del estudio), por lo que se puede asumir que el descenso de BeChE observado en el presente estudio no tiene una causa que no sea la exposición a plaguicidas.

En un estudio previo también se observó un aumento significativo de la actividad BeChE en el periodo de mayor exposición a plaguicidas que se atribuyó a una mayor expresión de BeChE como un mecanismo natural de defensa frente a la exposición crónica a dosis subtóxicas de plaguicidas (Hernández et al., 2013a). Una explicación alternativa es que ambas colinesterasas (plasmática y eritrocitaria) no actúan de manera aislada sino coordinada, de manera que están correguladas o contrarreguladas, con objeto de mantener una adecuada actividad catalítica que regule

homeostáticamente los niveles de acetilcolina en tejidos neuronales y extraneuronales (Bodur y Layer, 2011). Como la activación del sistema colinérgico por niveles altos de acetilcolina conduce a una supresión de la respuesta inflamatoria, la AChE desempeña un papel fundamental en la terminación de la denominada vía antiinflamatoria colinérgica (Hoover, 2017; Pohanka, 2014). La pseudocolinesterasa plasmática (BChE) refuerza y compensa, en parte, esta función (Sridhar et al., 2006). Por lo tanto, una mayor actividad BChE disminuiría los niveles de acetilcolina de manera que favorecería una ligera respuesta inflamatoria sistémica que representaría un mecanismo inespecífico del organismo para responder frente a estresores ambientales, como sería el caso de la exposición a plaguicidas. No obstante, en una primera fase la exposición a plaguicidas podría dar lugar a estrés oxidativo como consecuencia de la liberación de moléculas reactivas por leucocitos y macrófagos (Sicinska et al., 2017), que reduciría la actividad AChE (López et al., 2007; Ranjbar et al., 2002a; Rastogi et al., 2009) y BChE (Sicinska et al., 2017; Tagliari et al., 2010). Así, por ejemplo, los OPs inducen estrés oxidativo e inflamación ya que las vías de señalización oxidativa e inflamatoria/inmunológica están interconectadas a través de factores de transcripción y receptores nucleares, entre ellos NF- κ B y AP-1 (Jowzi et al., 2016). Posteriormente, en una segunda fase se produciría una mayor expresión de BChE para promover una respuesta inflamatoria sistémica inespecífica para afrontar esta agresión química ambiental. Esta hipótesis encuentra cierto apoyo en el hecho de que se ha asociado una alta actividad BChE plasmática con estados de inflamación crónica de baja intensidad, como obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Jońca et al., 2015). En el presente estudio, BuChE y BeChE mostraron una asociación directa y significativa con el IMC (Tabla 40), que, hasta cierto punto, constituye un indicador de obesidad.

2.2.2. Paraoxonasa-1 (PON1)

Las diversas actividades PON1 estudiadas fueron significativamente más altas en los trabajadores de invernadero que en los controles, a excepción de la DHCasa (Tabla 36). Sin embargo, tras ajustar los modelos mixtos por una serie de covariables, se observaron niveles significativamente más altos de POasa y AREasa en expuestos que en controles y en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, siendo el término de interacción estadísticamente significativo en ambos casos; asimismo, los expuestos presentaron niveles significativamente más bajos de DHCasa (Tablas 38 y 40). Estos hallazgos son congruentes con los resultados de un estudio previo de nuestro grupo que también encontró mayores niveles de POasa en los trabajadores de invernadero (ya fueran aplicadores de plaguicidas o no aplicadores) que los sujetos no expuestos tras la exposición (Hernández et al., 2004).

Este hallazgo se consideró como una respuesta biológica adaptativa de la PON1 tras la exposición crónica a plaguicidas.

La mayor actividad PON1 observada en los sujetos expuestos se puede explicar como consecuencia de una mayor expresión de esta enzima tras la interacción de los plaguicidas con diferentes receptores nucleares como también ocurre con otros productos químicos, tales como polifenoles y estatinas (Mackness y Mackness, 2015). Los receptores nucleares, que son considerados también como factores de transcripción, pueden ser activados por diversos xenobióticos que actúan como ligandos de los mismos. En los últimos años se ha demostrado que ciertos receptores nucleares, tales como el receptor de glucocorticoides (GR), los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) y el receptor pregnano X (PXR) están localizados en la región promotora de PON1, por lo que regulan su expresión (Dail et al., 2014). De todos ellos, el PXR es un componente importante del mecanismo de defensa del organismo frente a sustancias tóxicas, ya que puede unirse a numerosas moléculas no relacionadas estructuralmente entre sí. Así, se ha visto que los plaguicidas OCs, piretroides, triazoles y OPs son ligandos de PXR (Kliwer et al., 2002; Kojima et al., 2011; Lemaire et al., 2006). Por otro lado, se ha sugerido que ciertos plaguicidas y herbicidas activan el PPAR α en ratones (Takeuchi et al., 2006), dando lugar a un aumento en la expresión de PON1, de donde se infiere que la exposición a determinados plaguicidas (o sus metabolitos) podría conducir a una mayor expresión de PON1 (Turay et al., 2000). Por su parte, y aunque la evidencia es limitada, los plaguicidas puedan activar también el PPAR γ (Bhaskar y Mohanty, 2014; Takeuchi et al., 2006), lo cual contribuye a una mayor expresión de PON1 (Camps et al., 2012).

La PON1 tiene un papel antioxidante que resulta crucial para compensar el estrés oxidativo inducido por plaguicidas (Mostafalou y Abdollahi, 2013). Así, la PON1 protege frente al estrés oxidativo uniéndose covalentemente a moléculas oxidantes a través de su grupo sulfhidrilo libre presente en el residuo cisteína 284, lo que disminuye su actividad catalítica y se acumulan moléculas oxidantes. Por ello, los individuos con bajos niveles de PON1 son más propensos al daño oxidativo. La respuesta homeostática del organismo frente a un descenso de la actividad PON1 puede ser iniciar un mecanismo de retroalimentación positivo para aumentar la expresión y la síntesis de PON1 que le permita defenderse mejor frente a estrés oxidativo (Lozano-Paniagua et al., 2016).

Por último, la PON1 está interrelacionada con otras proteínas entre las que se encuentran ambas colinesterasas (Sridhar et al., 2010). Estudios previos sugieren que los genes que codifican PON1 y AChE se encuentran muy próximos entre sí en el cromosoma 7q21-22, por lo que cualquier alteración que se produzca en estos genes adyacentes puede afectar a su expresión. Así, se ha observado una

relación inversa entre las actividades de estas enzimas, lo que indicaría que la PON1 puede proteger la AChE plasmática de su inactivación, disminuyendo así el estrés oxidativo (Bryk et al., 2005; Devarajan et al., 2014). En este sentido, el descenso de AChE observado en los trabajadores de invernadero puede haber conducido a un aumento de la expresión de PON1 para compensar la menor actividad AChE. Por otro lado, la PON1 también está interrelacionada con la BChE, ya que ambas proteínas constituyen dos importantes *scavengers* enzimáticos implicados en la regulación de la inflamación, del estrés oxidativo y el metabolismo lipídico (Shahmohamadnejad et al., 2015; Sridhar et al., 2010).

La actividad lactonasa (DHCasa) de PON1 y su capacidad para prevenir la oxidación de LDL se afectan cuando se altera el grupo sulfhidrilo libre del residuo cisteína 284 (McDaniel et al., 2014). En el presente estudio, el descenso de actividad DHCasa en los trabajadores de invernadero puede explicarse por este fenómeno, pues la inducción de estrés oxidativo producido por la exposición a numerosos plaguicidas puede atacar ese grupo sulfhidrilo de PON1 y ocasionar una menor actividad lactonasa. Este hallazgo, si se confirma en posteriores estudios, podría tener utilidad en la biomonitorización de poblaciones expuestas a plaguicidas. Desde el punto de vista clínico, la actividad lactonasa en suero se ha correlacionado de forma inversa con los niveles de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y aterosclerosis (Rupérez et al., 2013). En todas estas situaciones existe un importante componente de estrés oxidativo.

En definitiva, el aumento de algunas actividades de PON1 (POasa y AREasa) observado en trabajadores de invernadero expuestos a plaguicidas podría ser consecuencia de una mayor expresión de PON1 para contrarrestar tanto el estrés oxidativo como el descenso de AChE inducido por plaguicidas.

3. BIOMARCADORES DE EFECTO TÓXICO

3.1. Biomarcadores de estrés oxidativo

De las diversas metodologías utilizadas para evaluar estrés oxidativo, y en particular peroxidación lipídica, en poblaciones expuestas a diferentes agentes químicos, la más utilizada es el ensayo de sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Yin et al., 2011; Zepeda-Arce et al., 2017). En el presente estudio los trabajadores de invernadero presentaron niveles significativamente más elevados de TBARS durante el período de alta exposición con respecto al de baja y también con

respecto a la población control (Tablas 41 y 43). Este hallazgo podría explicarse por la mayor formación de peróxidos lipídicos y la reducción de los niveles de antioxidantes dentro del compartimiento hidrofóbico de las células de la población expuesta. El MDA es un compuesto que, al igual que ocurre con otras sustancias, aparecen como consecuencia de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. En un ambiente oxidativo, tal y como sucede durante la biotransformación de ciertos plaguicidas, las especies reactivas generadas pueden oxidar los ácidos grasos de las membranas celulares y subcelulares produciendo una desestabilización y desintegración de las mismas.

Estudios previos indican que diversos tipos de plaguicidas (incluyendo OCs, OPs, carbamatos y piretroides) son capaces de producir estrés oxidativo, bien por generar moléculas oxidantes o por interferir los sistemas de defensa antioxidante de las células (Abdollahi et al., 2004; López et al., 2007). Así, por ejemplo, los piretroides pueden generar de manera indirecta diversos radicales superóxido y especies reactivas de nitrógeno, tales como peroxinitrito, óxido nítrico y radicales hidroxilo, capaces de producir daño oxidativo en la membrana celular (El-Demerdash, 2011, 2007). Del mismo modo, los compuestos OPs provocan un aumento de la peroxidación lipídica a través de su interferencia con procesos dependientes de la membrana (El-Demerdash, 2011). Por otro lado, numerosos estudios indican que la exposición a mezclas de plaguicidas produce un aumento en el estrés oxidativo debido al aumento de TBARS (Madani et al., 2016; Wafa et al., 2013). Todos los estudios descritos en el apartado antecedentes muestran una elevación de MDA asociado a la exposición a plaguicidas OPs, piretroides, carbamatos y mezclas (Tabla 13), indicativa de estrés oxidativo. Tan solo en un estudio no se alteraban los niveles de MDA (Shadnia et al., 2005).

La medida de la capacidad antioxidante total (FRAS) y de los grupos tioles totales (SHT) son dos marcadores eficaces para estudiar la relación entre radicales libres y las defensas antioxidantes del organismo (Ranjbar et al., 2002a). En el presente estudio, los trabajadores de invernadero presentaron niveles significativamente más altos de FRAS que los controles en el periodo de alta exposición pero no en el de baja (Tabla 41). Sin embargo, el análisis de modelos mixtos mostró una disminución de FRAS en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, pero sin observar diferencias significativas entre los expuestos y controles. Por tanto, estos resultados no son concluyentes. En el apartado de Antecedentes, la Tabla 13 muestra que, de todos los estudios revisados, 4 abordan este parámetro y todos ellos encuentran un descenso de FRAS asociado a la exposición a OPs, paraquat y mezclas de plaguicidas (Akram Ranjbar et al., 2002; Astiz et al., 2011; Bayrami et al., 2012; Sharma et al., 2013), lo que sugiere una disminución de la capacidad antioxidante total del organismo. Dado que el estrés oxidativo es un equilibrio entre la producción de radicales libres y la actividad antioxidante, una disminución en el valor del FRAS puede reflejar un aumento del estrés oxidativo (Ranjbar et al.,

2002a). Una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno podría explicar la reducción de la capacidad antioxidante evaluada mediante el ensayo FRAS (Arnal et al., 2011; Bayrami et al., 2012). Así, las especies oxidantes producidas en el metabolismo de los plaguicidas hacen que disminuyan los niveles de sustancias antioxidantes del suero al reaccionar con ellas. Esto provoca que la cantidad de sustancias capaces de reducir el complejo formado por el hierro férrico a ferroso que están presentes en el suero sea menor y, en consecuencia, desciende el FRAS (Pinchuk et al., 2012).

Por su parte, el SHT mide los niveles de glutatión que no se pueden determinar a través del ensayo FRAS. En el presente estudio, los trabajadores de invernadero mostraron niveles significativamente más bajos de SHT en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, hallazgo que no presentaron los controles. Sin embargo, presentaron niveles de SHT significativamente mayores que los controles en los dos periodos de estudio (Tabla 41). El análisis de modelos mixtos tampoco mostró diferencias significativas en relación a este parámetro, excepto para el término de interacción ya que los trabajadores expuestos presentaban niveles más altos que los controles en el periodo de alta exposición (Tabla 43). Por el contrario, estudios previos han encontrado que la exposición a plaguicidas produce un descenso de los grupos tioles libres, lo que contribuye a atenuar el estrés oxidativo. Una posible explicación a los hallazgos del presente estudio es que los niveles plasmáticos de glutatión, principal contribuyente de los niveles de tioles del organismo, se consiguieron mantener mediante una respuesta adaptativa de las células desencadenada por las condiciones de estrés oxidativo inducido por la exposición a plaguicidas (Astiz et al., 2011).

El sistema enzimático antioxidante es la primera línea del sistema de defensa del organismo frente a los daños causados por los radicales libres, incluyendo SOD, CAT y en general enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, como la GGT, que se opone a los procesos de oxidación (Abdollahi et al., 2004). La GGT forma parte del ciclo del γ -glutamilo y es una de las enzimas más importantes implicadas en la defensa antioxidante, ya que está estrechamente relacionada con el metabolismo del glutatión (GSH), la molécula antioxidante intracelular más abundante del organismo. En el presente estudio se observó que los individuos expuestos tenían niveles más altos de GGT que los controles, siendo las diferencias significativas solo en el periodo de baja exposición (Tabla 41). El análisis de modelos mixtos corrobora esta observación al mostrar niveles significativamente más altos de GGT en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y en los individuos expuestos frente a los controles (Tabla 44). El GSH está sujeto a una constante síntesis y degradación, sobre todo en el hígado pero también en riñones, pulmones, corazón, intestinos y músculos, que son los principales órganos responsables de su homeostasis. La GGT es un enzima localizada en la membrana celular que juega un papel importante en la síntesis *de novo* del glutatión a nivel intracelular, de tal modo que una mayor actividad GGT

aumenta los niveles intracelulares de GSH (Lee y Jacobs, 2009; Sreeram et al., 2015). En situaciones de estrés oxidativo se consume el GSH extracelular y aumenta el glutati3n oxidado (GSSG), lo cual induce la GGT hepática que rescata el GSSG circulante acoplando el residuo γ -glutamilo a un aceptor de aminoácidos adecuado que lo transporta al interior de la célula donde posteriormente es convertido a GSH. Por tanto, la GGT desempeña un papel importante como sistema de defensa antioxidante a nivel celular, de manera que puede ser útil como marcador de estrés oxidativo. Así, el aumento de GGT sérica observado en el presente estudio podría interpretarse como un mecanismo de defensa para restaurar los niveles de GSH (Irie et al., 2012; Lee et al., 2004). En este sentido, estudios previos mostraron que la concentración sérica GGT estaba asociada de forma inversa con los niveles séricos de diversos antioxidantes tras ajustar por raza, sexo, edad y colesterol total (Lim et al., 2004).

Por otro lado, los niveles de GGT se han correlacionado con la PON1 de manera que ambas enzimas (PON1 y GGT) pueden interactuar entre sí para inducir simultáneamente la detoxificación de plaguicidas y contribuir al mecanismo de defensa antioxidante total para proteger al organismo del estrés oxidativo inducido por plaguicidas (Araoud et al., 2010). En el presente estudio, el análisis de Spearman mostró una correlación directa de la AREasa, DZOasa y DHCasa con la GGT en el periodo de alta exposición; sin embargo, en el de baja exposición, la correlación directa se restringía a la POasa y AREasa, mostrando la DHCasa una correlación inversa con la GGT (datos no presentados).

3.2. Biomarcadores de nefrotoxicidad

3.2.1. Biomarcadores clásicos (creatinina e IFG)

La creatinina es uno de los productos residuales del metabolismo de las proteínas que se excreta por el riñ3n a través de la orina y es ampliamente utilizado en clínica para evaluar la funci3n renal. Si la funci3n renal es anormal aumentan sus niveles en sangre lo que indica fundamentalmente un daño glomerular. Por el mismo mecanismo se afectarían otros biomarcadores de daño renal, como la cistatina C sérica, que tendría un comportamiento similar al de la creatinina (es decir, aumentaría su concentraci3n) y el índice de filtraci3n glomerular, que descendería. En el presente estudio, aunque los trabajadores de invernadero presentan niveles más altos de creatinina sérica en el periodo de alta exposici3n con respecto al de baja, sus niveles son menores que los de los controles (Tablas 45 y 48). Estos resultados van en direcci3n opuesta a la esperada, de donde se puede inferir que los trabajadores expuestos a plaguicidas no presentan alteraci3n de la funci3n renal en base al comportamiento de este parámetro. Sin embargo, otros estudios sí han encontrado aumentos en los niveles de creatinina sérica

en poblaciones expuestas a plaguicidas (Tabla 14) (Patil et al., 2009; Singh et al., 2011c), incluyendo algunos de nuestro propio grupo (Hernández et al., 2006). No obstante, también se encuentran resultados contradictorios en los que no se observan cambios o incluso encuentran niveles bajos de creatinina (Araoud et al., 2012; Malekirad et al., 2013).

Por su parte, el IFG se encuentra aumentado en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles (Tablas 46 y 48). Este resultado es también el opuesto al que cabría esperar pues si hubiera una afectación renal disminuiría el IFG. Además, como el IFG se calcula mediante una fórmula que tiene en cuenta el valor de creatinina en el denominador, un aumento de la creatinina sérica provoca un descenso del aclaramiento de creatinina y en consecuencia del IFG. Por tanto, si la exposición a plaguicidas afectara la función renal, se observaría una disminución del IFG, no un aumento como muestran los resultados del presente estudio. El único estudio encontrado que evalúa el IFG en población expuesta a plaguicidas observa una disminución del mismo tras la exposición a insecticidas OCs en población no ocupacional. Sin embargo, otros estudios que evalúan la asociación entre IFG y metales pesados muestran resultados contradictorios, pues mientras aumenta en unos en otros disminuye e incluso hay otros en los que no experimenta alteración (Tabla 15).

3.2.2. Nuevos biomarcadores (albúmina, β 2M, cistatina C, NGAL, OPN, TFF3)

En los últimos años se ha propuesto la determinación de cistatina C en suero como biomarcador alternativo a la creatinina para evaluar la función renal. Esto se debe a que la cistatina C no es secretada por el túbulo y no regresa al torrente sanguíneo sino que, tras filtrarse por el glomérulo, se reabsorbe por las células epiteliales del túbulo renal y se degrada en su interior. Por eso, su determinación evita la interferencia de procesos no renales que sí afectan a la creatinina, tales como masa muscular, edad o sexo. Por tanto, el comportamiento y significado funcional de la cistatina C sérica sería análogo al de la creatinina, pero su ventaja radica en su mayor especificidad. En el presente estudio, el comportamiento de la cistatina C sérica es superponible al de la creatinina, pues aumenta en el periodo de alta exposición con respecto al de baja en toda la población de estudio pero sus niveles son más bajos en los trabajadores de invernadero que en los controles, aunque de forma significativa solo en el periodo de alta exposición (Tabla 46), hallazgos que se confirman con el análisis de modelos mixtos (Tabla 48). Al comparar con otros estudios que han evaluado este parámetro (Tabla 17), se observa un aumento de la cistatina C sérica asociado a la exposición a diversos elementos inorgánicos, preferentemente metales pesados, y a paraquat (Roberts et al., 2011). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio con la cistatina C y creatinina son congruentes entre sí pero van en

la dirección opuesta a la esperada, por lo que no indican que la exposición a plaguicidas afecte la función renal, especialmente la glomerular.

La albúmina es una proteína de alto peso molecular que clásicamente se ha determinado en orina para evaluar la presencia de albuminuria, un hallazgo indicativo de aumento de la permeabilidad del glomérulo (Brouwer et al., 1991). En el presente estudio se ha estudiado mediante una técnica novedosa que permite detectar microalbuminuria junto a otros biomarcadores renales. Los resultados sin embargo no son concluyentes ya que, aunque se ha observado un aumento de microalbuminuria urinaria en el periodo de alta exposición con respecto al de baja en toda la población de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre trabajadores expuestos y controles. Por eso, estos hallazgos, al igual que ocurría con la creatinina y cistatina C, permiten descartar la existencia de afectación glomerular asociada con la exposición a plaguicidas. Sin embargo, otros estudios, como los reflejados en la Tabla 16, encuentran un aumento de albúmina urinaria con la exposición a plomo, cadmio, dicromato potásico y 1-3 dicloropropano, único plaguicida que muestra esta asociación. No obstante, tal y como se puede ver en esa misma tabla, existen otros estudios en los que la exposición ocupacional a plomo no mostró alteraciones significativas en los niveles de albúmina urinaria.

Otros biomarcadores de daño renal que se están usando cada vez más en estudios preclínicos y clínicos son los niveles urinarios de determinadas proteínas de bajo peso molecular, tales como NGAL, β 2M, cistatina C, OPN o TFF3. Estas proteínas circulan en plasma y son filtradas por el glomérulo y posteriormente reabsorbidas, casi en su totalidad, por las células tubulares. El aumento de los niveles de estas proteínas en orina puede atribuirse a un daño tubular pues, en este caso no serían reabsorbidas y posteriormente degradadas por las células tubulares, sino que continuarían su paso hacia la orina. En el presente estudio, de todas las proteínas de bajo peso molecular citadas, tan solo se observaron diferencias significativas con la OPN y TFF3 (Tablas 46, 48 y 49). En concreto, ambas proteínas mostraron un aumento de sus niveles urinarios en el periodo de alta exposición con respecto al de baja (tanto en la población total como en los trabajadores expuestos). Además, los modelos mixtos mostraron un término de interacción estadísticamente significativo, pues los expuestos tenían niveles significativamente más altos de ambas proteínas (OPN y TFF3) que los controles y para cada una de ellas los niveles eran mayores en el periodo de alta exposición con respecto al de baja (Tabla 48). En la revisión bibliográfica efectuada no se encontraron estudios que abordasen el TFF3; sin embargo se identificaron tres estudios que evaluaron la OPN, dos de ellos en relación con la exposición a asbesto y el tercero a nanotubos de carbono (Tabla 16), aunque en ninguno de esos casos se observaron alteraciones significativas. En el presente estudio no se observaron diferencias significativas de la β 2M, cistatina C y NGAL urinarias, pero la revisión bibliográfica efectuada sí mostró

aumentos significativos en relación con la exposición a metales pesados, humos de soldadura y paraquat, este último asociado a niveles elevados de cistatina C y NGAL en orina. En definitiva, los resultados del presente estudio son sugerentes de una posible afectación tubular renal, aunque con cierta cautela ya que esto se apoya solo con datos de dos de las proteínas estudiadas (OPN y TFF3), pero no con las tres restantes que también sirven como biomarcadores de daño renal (β 2M, cistatina C y NGAL).

En conclusión, los resultados de los biomarcadores de daño renal sugieren que los trabajadores de invernadero no presentan afectación glomerular (ya que no se observan alteraciones en microalbuminuria, IFG, creatinina y cistatina C séricas), por lo que en principio se podría descartar que la exposición a plaguicidas pueda producir una lesión glomerular renal. Por el contrario, sí se observan indicios de posible afectación tubular de carácter bioquímico, aunque esta se apoya solo en los hallazgos de algunos biomarcadores (OPN y TFF3), pero no de todos. El posible mecanismo subyacente puede ser doble, o bien las proteínas afectadas no son reabsorbidas por el túbulo o bien experimentan una mayor expresión como consecuencia de un daño tubular renal de origen presumiblemente tóxico.

3.3. Biomarcadores de hepatotoxicidad

3.3.1. Aminotransferasas (transaminasas)

En el presente estudio se consideraron las transaminasas ya que son los biomarcadores más utilizados para evaluar el daño hepatocelular. Una lesión de hepatocitos daría lugar a una alteración de la permeabilidad de su membrana celular ocasionando así un vertido de transaminasas al plasma. Los hepatocitos periportales (zona 1) tienen relativamente más ALT, mientras que los cercanos a la vena central (zona 3) tienen más AST (Kasarala y Tillmann, 2016). Los resultados obtenidos mostraron que los trabajadores de invernadero presentaban niveles significativamente más bajos de ALT en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, pero en el caso de la AST no había diferencias significativas (Tabla 50). Tampoco se observaron diferencias entre trabajadores expuestos y controles en ninguno de los dos periodos de estudio (Tabla 53). No obstante, el término de interacción de los modelos mixtos mostró diferencias de medias de AST significativas debido a los mayores niveles de los expuestos con respecto a los controles en ambos periodos de estudio, pero más acentuadas en el de alta exposición (Tabla 52). Aunque las enzimas hepáticas no son completamente específicas, la determinación de sus niveles en suero puede ser de gran valor como marcadores de exposición crónica a plaguicidas, ya que un aumento en los niveles de ambas transaminasas puede ser indicativo de daño hepatocelular activo

(Gomes et al., 1999). Los resultados obtenidos no son congruentes con lo que cabría esperar, por lo que no hay indicios (o estos son poco consistentes) de aumento de la permeabilidad de la membrana hepatocitaria o de necrosis hepatocelular como consecuencia de una lesión tóxica que facilite la liberación de enzimas citosólicas al suero (Duysen y Lockridge, 2011; Gores et al., 1990). Un estudio previo realizado en trabajadores expuestos a una mezcla de plaguicidas encontró también una disminución de las transaminasas (Malekirad et al., 2013). Asimismo, el herbicida paraquat también parece causar una reducción de estas enzimas de manera dependiente de la dosis y del tiempo de la actividad (Podprasart et al., 2007). No obstante, la mayoría de los estudios revisados (Tabla 18) encuentran una elevación de ambas transaminasas y, en algunos casos, niveles normales tras la exposición a diversos plaguicidas, lo cual se puede interpretar como una lesión tóxica inducida por plaguicidas o por alguno de sus metabolitos reactivos, que ocasionan un aumento de permeabilidad o incluso necrosis hepatocelular. Sin embargo, el descenso de actividad de transaminasas es difícil de explicar salvo que se trate de un efecto directo del agente químico sobre estas enzimas.

3.3.2. Enzimas de colestasis

En el presente estudio, los trabajadores de invernadero presentaron niveles significativamente más bajos de ALP que los controles pero solo en el periodo de baja exposición (Tabla 50). Sin embargo, el análisis de modelos mixtos mostró niveles significativamente más altos de GGT en los expuestos con respecto a los controles; por el contrario la ALP mostró el comportamiento inverso, con niveles significativamente más bajos en alta exposición y en los expuestos con respecto a baja exposición y controles, respectivamente (Tabla 53). Estos resultados no son sugerentes de afectación colestásica. Por el contrario, la mayoría de estudios previos que han evaluado estos mismos biomarcadores muestran elevaciones de ALP y resultados inconcluyentes sobre GGT en relación a la exposición a los plaguicidas más frecuentes (OPs, carbamatos y piretroides). Esta discordancia puede radicar en los diferentes plaguicidas usados, ya que en el presente estudio no hay indicios de que se usaran OPs y muy pocos *N*-metilcarbamatos y piretroides, de manera que el aumento de GGT observado se puede atribuir más al efecto del estrés oxidativo que a alteración colestásica, pues no se observó un aumento paralelo de ALP sino todo lo contrario, un descenso de la misma que es difícil de explicar salvo por una menor expresión de la misma o por un efecto directo de la exposición a algunos plaguicidas sobre esta enzima.

3.3.3. Enzimas del ciclo de la urea

En el presente estudio se evaluaron varias enzimas del ciclo de la urea, ya que su aumento en plasma es indicativo de daño de hepatocitos periportales, que son los que están especializados en el ciclo de la urea. Sin embargo, los resultados obtenidos son otra vez inconcluyentes. Se observaron niveles significativamente más altos de OTC y bajos de arginasa I en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y ello tanto en trabajadores expuestos como en controles (Tabla 50). Además, los expuestos presentaron niveles más bajos de OTC y de arginasa I que los controles en los periodos de alta y baja exposición, respectivamente (Tabla 50). Estos resultados prácticamente se confirmaron con el análisis de modelos mixtos, aunque en ellos solo la arginasa I mostró niveles significativamente más bajos en los trabajadores expuestos que en los controles (Tabla 53). Una posible explicación a los valores más bajos de OTC en los expuestos (observado en el análisis bivariante pero no confirmado por los modelos mixtos) es que, tal y como se ha demostrado en células intactas (Wright et al., 2001), las condiciones oxidantes pueden conducir a una disminución de la actividad OTC gracias a la alteración del procesamiento mitocondrial. Esto puede suponer una regulación fisiológica que permita a la mitocondria responder a condiciones de estrés oxidativo localizadas.

La observación de menores niveles de arginasa I, enzima que se encuentra en el exterior de las mitocondrias, va en contra de lo esperado, pues si ocurriera una afectación tóxica hepatocelular sus niveles séricos aumentarían de forma análoga a las transaminasas. Esto puede deberse al corto periodo de vida media de esta enzima en la circulación sanguínea, que es inferior a una hora (Díaz-Muñoz y Hernández-Muñoz, 2010; Murayama et al., 2008), de manera que su rápida eliminación dificultaría su detección en plasma, salvo que el daño hepático periportal sea continuado, ya que sus niveles basales se recuperarían de una manera rápida.

3.3.4. GST- α

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles de GST- α de los trabajadores de invernadero en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Sin embargo, sí mostraron niveles significativamente más bajos que los controles en el periodo de alta exposición a plaguicidas (Tabla 50). El análisis de modelos mixtos mostró una GST- α significativamente más baja en los trabajadores expuestos con respecto a los controles (Tabla 53). La GST- α es una enzima fundamental en los procesos de detoxificación ya que se encarga de conjugar especies reactivas, capaces de producir daño celular, con el glutatión reducido, convirtiéndolas así en moléculas menos

reactivas (Hernández et al., 2013a). Además, como la GST- α se expresa preferentemente en hepatocitos próximos a la vena central, el aumento de sus niveles plasmáticos indicaría afectación de la zona centrolobulillar hepática. En el presente estudio se ha observado justo lo contrario por lo que, según este biomarcador, no hay indicios que sugieran daño hepatocelular.

Al analizar de manera conjunta todas las enzimas de hepatotoxicidad estudiadas se observa un descenso de la ALP, arginasa I y GST- α en la población expuesta con respecto a la población control. Por tanto, en general se puede descartar un posible daño hepatocelular como consecuencia de la exposición a plaguicidas, probablemente debido a que los agentes utilizados por los trabajadores de invernadero revisten menos toxicidad que los plaguicidas tradicionales. No obstante, resulta llamativo el descenso en la concentración plasmática de esas tres enzimas en los individuos expuestos, lo cual podría atribuirse a un mecanismo complejo que regule su expresión de una manera más o menos coordinada, algo difícil de sostener. También podría pensarse en un efecto directo de alguno de los plaguicidas usados sobre las actividades catalíticas de estas enzimas, pero se puede descartar ya que dos de ellas se han evaluado mediante técnicas de ELISA que miden concentración plasmática, no actividad catalítica.

3.4. Biomarcadores de neurotoxicidad

En este estudio se han evaluado dos biomarcadores de neurotoxicidad, uno relacionado con daño neuronal (pNF-H) y el otro con daño glial (S100B) para dar así una mayor cobertura a una posible afectación neurotóxica. Los trabajadores de invernadero mostraron niveles significativamente más bajos de pNF-H en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y también niveles significativamente más bajos que los controles pero sólo en el periodo de alta exposición (Tabla 54). Sin embargo, según los modelos mixtos los trabajadores expuestos presentaban niveles más altos que los controles (Tabla 57). Una posible explicación para este aparente aumento de pNF-H podría ser que los plaguicidas pueden atravesar la barrera hematoencefálica (o incluso afectarla y así aumentar su permeabilidad) y alcanzar a los axones neuronales de manera que, al dañarlos, saldría el pNF-H de su interior, atravesaría la barrera hematoencefálica dañada y se vertería a la sangre. No se ha encontrado en la literatura científica ningún estudio en humanos que evalúe este parámetro; sin embargo, estudios realizados en animales de experimentación mostraron un aumento de pNF-H tras la exposición a los agentes neurotóxicos sarín y soman y a didesoxicitidina, un fármaco antiretroviral (RamaRao et al., 2011; Sanna et al., 2016). Al estar fosforilado, el pNF-H es resistente a proteasas y permanece sin apenas modificación en este medio (Li et al., 2016). Como el pNF-H es una proteína

importante en el citoesqueleto axonal (Sumitani et al., 2016) que desempeña un papel crucial para la integridad morfológica y la conducción de los impulsos nerviosos, su afectación tóxica produciría cambios en diversas proteínas neurales y también estrés oxidativo en el citoesqueleto. Esto daría lugar a anomalías neurológicas a través de la pérdida de la función neuronal (RamaRao et al., 2011).

Por otro lado, la respuesta toxica puede ser mayor en caso de exposición del sistema nervioso durante la etapa de desarrollo y diferenciación celular (Funchal et al., 2006; Sindi et al., 2016). Así, la hiperfosforilación de NF-H puede provocar alteraciones de las proteínas del citoesqueleto y conducir a la desorganización de la estructura celular en las etapas iniciales del neurodesarrollo. La posibilidad de que ocurra esto sería mayor en caso de exposición a plaguicidas OPs, debido a su capacidad de fosforilar, pero en el presente estudio no había evidencias agronómicas de que se utilizaran estos compuestos. Tampoco hay que confundir una mayor fosforilación de este neurofilamento con un aumento de sus niveles.

En cuanto a la proteína S100B, en el presente estudio se observó que los trabajadores de invernadero presentaban niveles significativamente más bajos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. También mostraron niveles más bajos que los controles, pero solo en el periodo de baja exposición (Tablas 54). Sin embargo, el análisis de modelos mixtos no encontró diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 57) aunque el término de interacción fue marginalmente significativo debido a que los expuestos presentaban niveles más altos que los controles en el periodo de alta exposición (y a la inversa en el de baja exposición). Estos resultados podrían indicar cierta afectación de células gliales, pero en la búsqueda bibliográfica realizada no se ha encontrado ningún estudio epidemiológico o experimental que evalúa el comportamiento de la proteína S100B tras la exposición a plaguicidas (Tabla 20). No obstante, estudios realizados en pacientes con intoxicaciones agudas por CO (Brvar et al., 2004; Cakir et al., 2010; Yordan et al., 2009) y en población expuesta a metales (Liu et al., 2014; Yilmaz et al., 2014) o a anestésicos (Yan et al., 2014) mostraron un aumento de los niveles de S100B en sangre.

Además, hay que tener en cuenta un aspecto metodológico como es la poca estabilidad térmica de esta proteína. Debido al proceso térmico de congelación y descongelación, los epítomos de la S100B pueden ser modificados, tal y como ocurre con la pasteurización en la leche materna (Peila et al., 2017), lo que limitaría la precisión en la medición cuantitativa de proteínas. No obstante, en nuestro estudio este fenómeno habría afectado tanto a las muestras congeladas de los expuestos como a las de los controles, pues no hay ningún indicio de que produzca una afectación diferencial. Por otro lado, la vida media de la proteína S100B en sangre tras un traumatismo craneal menor es de 97 min (Townend

et al., 2006), lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar estudios que pretendan establecer una relación entre los niveles séricos de S100B con lesiones astrogliales y su gravedad. También podría ocurrir que la exposición crónica a plaguicidas, al igual que ocurre en consumidores crónicos de cocaína (Kessler et al., 2007), no produzca un daño importante en los sujetos, de manera que no origine lesiones neurobiológicas y fisiológicas que se traduzcan en aumentos significativos de la proteína S100B. En este caso, los niveles de S100B solo aumentarían en caso de que la exposición fuese a dosis elevadas, muy superiores a las que tienen lugar en exposiciones ocupacionales.

Una última posibilidad, es que se desconoce el período de tiempo durante el cual los niveles de S100B pueden permanecer alterados después de la exposición. Estudios previos indican que los niveles de S100B se incrementan principalmente en las primeras horas tras la exposición a ciertos xenobióticos (Kessler et al., 2007) o en las etapas iniciales de ciertas enfermedades (Lara et al., 2001; Machado-Vieira et al., 2004; Schmitt et al., 2005; Walz et al., 2000), pero al tener una baja vida media en sangre, su ventana de detección sería muy corta de manera que en el momento de recoger las muestras de sangre el biomarcador puede haberse normalizado. Esto hace más difícil interpretar los resultados.

En definitiva, aunque el comportamiento de los dos biomarcadores de daño neurotóxico estudiados parece indicar ciertos indicios de afectación neurológica, especialmente glial, como consecuencia de la exposición a plaguicidas, estos no son muy sólidos. No obstante, de los resultados obtenidos tampoco se puede descartar la inexistencia de daño neurotóxico a nivel bioquímico. Hay que tener en cuenta que los trabajadores de invernadero estaban expuestos a plaguicidas que no son intrínsecamente neurotóxicos, pues no usaron OPs, muy pocos *N*-metilcarbamatos y tan solo algunos piretroides, por lo que los posibles efectos neurotóxicos serían mínimos, aunque no inexistentes.

3.5. Parámetros inmunológicos

La inflamación es un conjunto de respuestas del organismo frente a un trauma o agresor externo como sería la exposición a compuestos tóxicos. Estos pueden desencadenar una respuesta inflamatoria anormal por diversas vías y afectar así el funcionamiento normal de células y tejidos. Por eso, aunque la inflamación juega un papel importante en el mecanismo de defensa en los sistemas biológicos, también puede dar lugar a daños aparentes en caso de producirse una respuesta excesiva (Medzhitov, 2008).

3.5.1. Citoquinas inmunorreguladoras

Los resultados del presente estudio muestran que los trabajadores expuestos no presentaban diferencias significativas para IL-2, IL-7, IL-9, IL-1ra y TNF- α en el periodo de alta exposición frente al de baja, pero para el resto de citoquinas sí, salvo la IL-15, que mostraba niveles más bajos en el periodo de alta exposición (Tabla 57). Asimismo, y de forma general, los expuestos mostraron niveles más altos de casi todas las citoquinas que los controles y en ambos periodos de estudio, con algunas excepciones que se pueden ver en la Tabla 57. El análisis de modelos mixtos, por su parte, mostró un aumento significativo de todas las citoquinas en el periodo de alta exposición frente al de baja y en los trabajadores expuestos con respecto a los controles (Tabla 60). Estos resultados sugieren que la exposición a plaguicidas puede provocar una respuesta inflamatoria debido a la liberación de numerosas citoquinas proinflamatorias (especialmente la IL-1 β , TNF- α e IFN- γ). Sin embargo, también se observó un aumento de la única citoquina exclusivamente antiinflamatoria, el antagonista del receptor IL-1ra.

El TNF- α desempeña funciones biológicas relevantes, como la activación de leucocitos, la liberación de diversas citoquinas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (McKellar et al., 2009). Una vez se une a su receptor, se produce una cascada de señalización celular en la que se fosforila el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, lo que conlleva la liberación y translocación del mismo hacia el núcleo. Allí se une a secuencias específicas de ADN y promueve la síntesis de proteínas relacionadas con la inflamación, tales como IL-6 o IL-1 (Horiuchi et al., 2010; Wajant et al., 2003).

El IFN- γ es uno de los principales reguladores de las células del sistema inmunitario que desencadena respuestas inmunológicas adaptativas a través de la vía de señalización JAK-STAT (Janus kinasa y transductor de señal y activador de transcripción). La producción de IFN- γ aumenta bajo ciertas circunstancias patológicas, entre ellas la exposición a plaguicidas (Mata-Espinosa y Hernández-Pando, 2008). Niveles elevados de IFN- γ inhiben la proliferación de linfocitos Th2 (Gajewski y Fitch, 1988) y su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células Th1, favoreciendo así la respuesta inflamatoria (Kaiko et al., 2008; Luckheeram et al., 2012). Por su parte, la IL-12p70 es un inductor del IFN- γ y su elevación puede ser debida a la proliferación de linfocitos T y células NK para producir IFN- γ en respuesta a patógenos intracelulares (Ma et al., 2015).

El aumento de la IL-1 β también contribuye a una respuesta inflamatoria. Entre sus principales funciones se encuentra la liberación de histamina por los mastocitos, que produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación (Krystel-Whittemore et al., 2016).

De igual modo, la IL-6 posee efectos proinflamatorios ya que, al igual que ocurre con la IL-1 β , es capaz de liberar histamina en los mastocitos y promover la diferenciación de linfocitos B, lo que facilita la maduración de precursores hematopoyéticos (Krystel-Whittemore et al., 2016; Theoharides et al., 2012).

Estudios previos muestran resultados aparentemente contradictorios pues mientras la exposición a algunos plaguicidas produce un aumento de determinadas citoquinas, la exposición a otros produce un descenso o incluso no origina ningún efecto significativo (Tabla 21). De forma llamativa, el DDT y su metabolito DDE se asociaron en líneas generales a un aumento de citoquinas (Daniel et al., 2002) mientras que los compuestos OCs, se asociaron a un descenso sistemático de citoquinas (Seldén et al., 2008). Un estudio realizado en trabajadores de invernadero expuestos a cipermetrina encontró niveles normales o descendidos de la mayoría de las citoquinas estudiadas (Costa et al., 2013), lo que fue interpretado como que la exposición a piretroides puede reducir las defensas del organismo frente a la infección y cáncer. Por el contrario, otros estudios mostraron que los contaminantes orgánicos persistentes pueden inducir una respuesta inflamatoria (Cheon et al., 2007; Nishino et al., 2013; Peltier et al., 2013) y que los consumidores de arroz contaminado por estos compuestos, incluidos los PCBs, presentaban mayores niveles séricos de IL-17, IL-1 β y TNF- α (Kuwatsuka et al., 2013).

3.5.2. Factores de crecimiento

En el presente estudio se observaron concentraciones séricas muy bajas de factores estimulantes de colonias (GM-CSF y G-CSF), como indica el alto porcentaje de individuos con valores por debajo del LOD. Por eso no se pudo realizar el análisis de modelos mixtos. En cualquier caso, de todos los factores estimulantes de la hematopoyesis estudiados, el GM-CSF presentó valores más bajos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, pero con diferencias significativas solo en los controles, no en los trabajadores expuestos (Tabla 61). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas para el G-CSF.

Los neutrófilos constituyen la principal defensa del organismo frente a la inflamación. Un aumento del GM-CSF constituye una señal dirigida a los macrófagos y células dendríticas para estimular la producción y maduración de neutrófilos. Un exceso en el proceso de maduración de estas células podría conducir a una situación de autoinmunidad (Wang et al., 2008). Por tanto, un aumento de los factores estimulantes de colonias incrementa la producción de neutrófilos y, a su vez, activa un mecanismo por el que se liberan mediadores de la inflamación que estimulan otras células

inmunitarias para que liberen más mediadores inmunológicos que contribuyen a combatir la inflamación, perpetuando así el fenómeno inflamatorio y dando lugar a una inflamación crónica (Cain et al., 2011). Sin embargo, en el presente estudio el alto porcentaje de valores no detectados de factores estimulantes de colonias, especialmente en el caso del GM-CSF, sugiere que la población de estudio no presenta un estado inflamatorio de suficiente envergadura; es decir, que la inflamación que se produce es de baja intensidad y no precisa de la formación y maduración de nuevas células, sino que las que existen en el torrente sanguíneo son suficientes para mantener una respuesta inflamatoria de bajo nivel. No obstante resulta llamativo que el número de muestras no detectables de G-CSF fue menor en el periodo de alta exposición con respecto al de baja, lo cual se observó tanto en individuos expuestos como en controles.

Por otro lado, los factores de crecimiento VEGF, b-FGF y PDGF-BB mostraron niveles significativamente más altos en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y en los trabajadores expuestos con respecto a los controles (Tabla 64). El VEGF, al unirse a sus receptores específicos VEGFR1 y VEGFR2, estimula notablemente la proliferación y la migración de las células endoteliales induciendo así angiogénesis/vasculogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos). Los otros dos factores de crecimiento (b-FGF y PDGF-BB) también tienen un efecto proangiogénico significativo (Raica y Cimpan, 2010). Estos mediadores son secretados por una amplia variedad de células que participan en el proceso inflamatorio y, si sus niveles son excesivos, pueden desencadenar una angiogénesis patológica. La rapidez con la que las plaquetas acuden a los tejidos donde existe inflamación las convierte en una fuente fundamental de mediadores mitogénicos (Blair y Flaumenhaft, 2009). Estudios previos mostraron que cerdos expuestos a los OPs paratión, clorpirifós y diazinón aumentaron la expresión de PDGF-BB de una forma dependiente de la dosis (Proskocil et al., 2014). Este hecho favorece la migración y proliferación de los fibroblastos, células musculares lisas y monocitos hacia zonas con inflamación.

Los resultados del presente estudio sugieren que el aumento de los tres factores de crecimiento hematopoyéticos (VEGF, b-FGF y PDGF-BB) puede deberse a la existencia de un cierto estado inflamatorio sistémico asociado a una respuesta adaptativa e inespecífica del organismo frente a la exposición a plaguicidas. La mayor liberación de estos factores induce la proliferación y activación de células endoteliales y angiogénesis en aquellos tejidos que presentan respuesta inflamatoria. La activación de células endoteliales conlleva, a su vez, la secreción de determinadas citoquinas y factores de crecimiento responsables de la proliferación y migración de células inmunitarias necesarias para la formación de nuevos epitelios.

3.5.3. Quimioquinas

En el presente estudio se observó un aumento significativo de las quimioquinas MIP- α , MCP-1, IL-8, RANTES y eotaxina en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles (Tabla 68).

Las quimioquinas pueden ser inducidas en estados de inflamación y su función consiste en regular el tráfico linfocitario, reclutando las células inmunitarias en los tejidos donde se ha producido dicha inflamación. Se inducen rápidamente en respuesta a diversos estímulos inflamatorios y mitogénicos. Además, tienen efectos angiogénicos sobre células endoteliales y del sistema nervioso (Taub y Oppenheim, 1994). Por eso, los resultados del presente estudio sugieren que el incremento generalizado de los niveles de quimioquinas en sangre puede deberse a una respuesta inflamatoria sistémica asociada a la exposición a plaguicidas y que favorece la migración de células inflamatorias hacia tejidos que presentan el proceso inflamatorio. Como se ha mencionado anteriormente, los plaguicidas pueden originar esta respuesta estimulando la producción de diversos mediadores de inflamación y favoreciendo la migración de células inmunes (principalmente monocitos, neutrófilos y eosinófilos) a las zonas donde se encuentra el estímulo inflamatorio inicial.

Las quimioquinas α (CXCL) y β (CCL) están implicadas en las reacciones inflamatorias agudas y crónicas, supresión de la hematopoyesis, modulación de la angiogénesis y fibroplasia. Las quimioquinas α actúan activando neutrófilos mientras que las β lo hacen sobre otras células, principalmente monocitos. Las quimioquinas que actúan sobre linfocitos T (RANTES) influyen en el reclutamiento de células inmunocompetentes en sitios inflamatorios (Taub y Oppenheim, 1994). En un estudio previo sobre individuos intoxicados por malatión durante el control del dengue se observó una mayor expresión de MIP-1 α , que sintetiza proteínas inflamatorias de macrófagos, y de RANTES, que codifica una proteína encargada de reclutar neutrófilos (Ye et al., 2013).

La inflamación periférica es capaz de estimular las vías neuroinflamatorias mediante la activación de células gliales, neuronas y una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Gracias a esta mayor permeabilidad, las células inmunes e inflamatorias periféricas pueden migrar al cerebro y proliferar en el sitio de inflamación, contribuyendo así a incrementar la neuroinflamación ya sea directamente o a través de células gliales y neuronas (Kempuraj et al., 2016).

La MCP-1 se expresa en astrocitos, microglía y neuronas y está implicada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. Su síntesis puede actuar como un mecanismo neuroprotector ya que recluta leucocitos en caso de inflamación en alguna zona del cerebro. Sin embargo, un aumento

excesivo de MCP-1 podría dar lugar a una infiltración excesiva de células inflamatorias, activando vías de neuroinflamación y produciendo eventualmente muerte neuronal y un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Así, la neuroinflamación induce neurodegeneración y los procesos neurodegenerativos aumentan la neuroinflamación, dando lugar a un círculo vicioso (Kempuraj et al., 2016). Por eso, la posible afectación del sistema nervioso como consecuencia de la exposición a plaguicidas no necesariamente obedece a fenómenos genuinamente neurotóxicos sino que también puede ser el resultado de neuroinflamación y daño a la barrera hematoencefálica.

4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio, dada su naturaleza, presenta una serie de limitaciones que hay que tener en cuenta para realizar una correcta interpretación del mismo y extraer las conclusiones de forma prudente. Entre ellas destacan las siguientes:

- Los sujetos de estudio no se seleccionaron al azar sino que eran voluntarios de los programas de vigilancia de la salud ocupacional reclutados durante su evaluación anual de salud. Aunque su tasa de participación fue bastante elevada, los resultados no pueden generalizarse a todos los trabajadores de agricultura intensiva bajo invernadero ni a cualesquiera otros trabajadores expuestos a plaguicidas.
- Dentro de la población expuesta, la gran mayoría de los trabajadores eran marroquíes, que presentan importantes diferencias culturales, genéticas y de estilos de vida (incluyendo hábitos tóxicos y alimentación) que la población control, compuesta exclusivamente por españoles. Aunque los modelos lineales múltiples se ajustaron por este factor, no se puede descartar cierta distorsión de los resultados.
- La mayoría de los trabajadores de invernadero desconocían el tipo de plaguicida que estaban empleando o que se había aplicado en los cultivos, lo que supone una importante limitación en cuanto a información sobre la exposición a plaguicidas. Por este motivo fue necesario consultar a ingenieros agrónomos para que proporcionaran información sobre los plaguicidas utilizados en los cultivos de invernadero seleccionados para el presente estudio (Tabla 23). El 64 % de esos plaguicidas (16 de 25) coinciden con los más utilizados en cultivos de frutas y hortalizas en España (Glass et al., 2012). En la tabla 23 se observa que no se utilizaron plaguicidas OPs y tan solo había

un inhibidor de la colinesterasa (metomilo). Sin embargo, esta información se desconocía en la fase del diseño del estudio.

Capítulo 8

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Primera. De los metabolitos dialquilfosfato (DAPs) estudiados, se observaron niveles significativamente más altos de DMP, DMTP, Σ DMs y Σ DAPs en el periodo de alta exposición a plaguicidas que en el de baja. Asimismo, los trabajadores de invernadero mostraron niveles significativamente más bajos de DMP, Σ DMs y Σ DAPs que los controles. Esto indica que la exposición se produce principalmente a metabolitos preformados en el ambiente y presentes en alimentos, sobre todo a expensas de organofosforados dimetilos, que son la mayoría de los que actualmente están autorizados para su uso agrícola en la Unión Europea. No hay indicios de que los trabajadores presentaran exposición ocupacional a organofosforados en base a la encuesta epidemiológica administrada y a la información agronómica sobre los productos hortofrutícolas cultivados en los invernaderos durante el periodo de estudio.

Segunda. El descenso de actividad AChE que presentaban los trabajadores de invernadero con respecto a los controles en el periodo de alta exposición puede atribuirse a un incremento de estrés oxidativo y ulterior peroxidación lipídica de membranas eritrocitarias inducido por la exposición a plaguicidas. Dicho efecto no parece estar relacionado con la exposición a organofosforados por lo comentado en la conclusión anterior. Por su parte, los mayores niveles de colinesterasas plasmáticas observados en el periodo de alta exposición con respecto al de baja y en los trabajadores de invernadero frente a los controles se puede interpretar como un mecanismo homeostático para regular los niveles de acetilcolina, encargada de suprimir la respuesta inflamatoria y mantener así un bajo nivel de inflamación sistémica como mecanismo de defensa reactivo frente a la exposición a plaguicidas. Ambas colinesterasas (plasmática y eritrocitaria) actuarían, por tanto, de manera coordinada en la terminación de la vía antiinflamatoria colinérgica.

Tercera. En cuanto a la PON1, los trabajadores de invernadero presentaron niveles significativamente más altos de POasa y AREasa que los controles y en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Esta mayor actividad PON1 es dependiente del sustrato (con la DHCasa se observa un descenso en lugar de un aumento) y podría ser resultado de una mayor expresión del enzima a través de receptores nucleares para contrarrestar la disminución de la actividad AChE atribuida al estrés oxidativo inducido por plaguicidas, de manera que ambas enzimas (PON1 y AChE) podrían actuar de forma coordinada.

Cuarta. Los resultados obtenidos con los biomarcadores de estrés oxidativo no son totalmente uniformes. Los niveles de TBARS y SHT son mayores en los trabajadores de invernadero y en el periodo de alta exposición a plaguicidas. Sin embargo, el hallazgo más consistente fue el aumento de GGT en los trabajadores expuestos y en el periodo de alta exposición. Estos resultados parecen indicar un

ligero aumento de estrés oxidativo asociado a la exposición a plaguicidas, debido probablemente a que el metabolismo de la mayoría de plaguicidas induce la aparición de sustancias oxidantes (que terminan produciendo peroxidación lipídica) o interfieren con los sistemas de defensa antioxidante del organismo. Del presente estudio se desprende que la GGT puede ser un biomarcador sensible de estrés oxidativo.

Quinta. Los biomarcadores de nefrotoxicidad estudiados no sugieren afectación glomerular ya que los valores de microalbuminuria, IFG, creatinina y cistatina C séricas no se asocian con la exposición a plaguicidas. Sin embargo, sí parece observarse una ligera alteración tubular, debido a las alteraciones de OPN y TFF3, que muestran niveles más altos en los trabajadores expuestos que en los controles y en el periodo de alta exposición con respecto al de baja. Estos resultados sugieren una posible afectación de la reabsorción tubular de ambas proteínas o bien una mayor expresión de las mismas como consecuencia de un daño tubular renal de origen presumiblemente tóxico. No obstante, otros biomarcadores de daño tubular (β 2M, cistatina C urinaria y NGAL) no mostraron alteraciones significativas asociadas con la exposición.

Sexta. El comportamiento de los biomarcadores de hepatotoxicidad no es concluyente. Aunque hay indicios de cierta afectación tóxica hepatocelular debido a un ligero aumento de AST en los trabajadores de invernadero con respecto a los controles en ambos periodos de estudio, los resultados más llamativos muestran un descenso de la fosfatasa alcalina, arginasa I y GST- α en la población expuesta con respecto a la control, lo que habla en contra de un posible daño hepatotóxico tanto en hepatocitos periportales como pericentrales. Ese descenso podría atribuirse a un hipotético mecanismo que regule la expresión de las tres enzimas de una manera coordinada.

Séptima. Los resultados de los biomarcadores de neurotoxicidad estudiados (pNF-H y S100B) muestran ciertos indicios de afectación neurológica asociada a la exposición a plaguicidas, pero no muy sólidos. Esto puede deberse a que los trabajadores de invernadero no estaban expuestos a plaguicidas intrínsecamente neurotóxicos. Es posible, y no se puede descartar, que la ligera afectación observada, sobre todo de la S100B, pueda deberse a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica o a cierto grado de neuroinflamación, en ambos casos, como consecuencia de una respuesta inespecífica frente a la exposición a plaguicidas.

Octava. En relación a los biomarcadores de inmunotoxicidad, se ha observado un aumento significativo de casi todas las citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento estudiados en el periodo de alta exposición frente al de baja y en los trabajadores expuestos con respecto a los controles. Estos

resultados sugieren la existencia de un cierto estado inflamatorio sistémico de bajo nivel asociado a una respuesta adaptativa e inespecífica del organismo frente a la exposición a plaguicidas. La mayor liberación de estos factores induce la proliferación y activación de células inflamatorias e inmunológicas así como su migración a tejidos en los que se ha desencadenado el proceso inflamatorio así como un proceso de angiogénesis en los mismos. Esta inflamación periférica podría aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y estimular las vías neuroinflamatorias, dando lugar a cierta afectación neurotóxica indirecta.

First. Of the dialkylphosphate metabolites (DAPs) studied, DMP, DMTP, Σ DMs and Σ DAPs showed significantly higher levels in the period of high versus low exposure to pesticides. Likewise, greenhouse workers showed significantly lower levels of DMP, Σ DMs and Σ DAPs as compared to controls. These findings indicate that exposure to pesticides likely occurs to preformed metabolites in the environment and present in food, especially at the expense of dimethyl organophosphates which are the majority currently approved for agricultural use in the European Union. There is no evidence that greenhouse workers were occupationally exposed to organophosphates on the basis of the epidemiological survey administered and the agronomic information on horticultural crops grown in greenhouses during the study period.

Second. The decrease in AChE activity observed in greenhouse workers relative to controls during the period of high pesticide exposure can be attributed to an increase in oxidative stress and subsequent induction of lipid peroxidation in erythrocyte membranes as a result of pesticide exposure. However, such an effect does not seem to be related to exposure to organophosphates as discussed in the above conclusion. On the other hand, the higher levels of plasma cholinesterases observed in the period of high exposure to pesticides compared to that of low exposure and in greenhouse workers relative to controls, can be interpreted as a homeostatic mechanism to regulate the levels of acetylcholine, responsible for suppressing the inflammatory response. Thereby, a low level of systemic inflammation can be developed as a reactive mechanism of defense against pesticide exposure. Both cholinesterases (plasma and erythrocyte) would therefore act in a coordinated manner for the termination of the cholinergic antiinflammatory pathway.

Third. Regarding PON1, greenhouse workers had significantly higher levels of POase and AREase than controls and also in the period of high versus low exposure to pesticides. This higher activity was substrate-dependent (as DHCase levels were decreased instead of increased) and could result from an increased expression of PON1 through nuclear receptors to counteract the decrease in AChE activity attributed to pesticide-induced oxidative stress. Thus, both enzymes (PON1 and AChE) would act in a coordinated way.

Forth. The results of the biomarkers of oxidative stress are not fully consistent. TBARS and SHT levels were higher in greenhouse workers than in controls and in the period of high *versus* low pesticide exposure. Nonetheless, the most consistent finding was the increase in GGT in greenhouse workers and in the period of high exposure to pesticides. These results seem to indicate a subtle increase in oxidative stress associated with pesticide exposure, likely because the metabolism of most pesticides induces the generation of oxidizing substances (which end up producing lipid peroxidation) or interfere

with the cellular antioxidant defense systems. The present study suggests that GGT may be a sensitive biomarker of oxidative stress.

Fifth. The biomarkers of nephrotoxicity studied do not suggest glomerular dysfunction as levels of microalbuminuria, GFR, creatinine and serum cystatin C were not associated with pesticide exposure. However, a subtle tubular dysfunction can be inferred based on changes in OPN and TFF3, which show higher levels in the greenhouse workers than in controls and in the period of high versus low exposure to pesticides. These results suggest a possible impairment of tubular reabsorption of both proteins or, alternatively, to a greater expression thereof as a consequence of renal tubular damage of toxic origin. However, other biomarkers of tubular damage (β 2M, urinary cystatin C and NGAL) failed to show significant changes associated with pesticide exposure.

Sixth. The biomarkers of hepatotoxicity studied failed to show robust findings and no conclusion can be drawn. Although there was some evidence of subtle hepatocellular involvement because of a slight increase in AST in greenhouse workers compared to controls in both study periods, the most striking results show a decrease in alkaline phosphatase, arginase I and GST- α in the exposed population relative to controls. This finding does not pinpoint a possible hepatotoxic damage in either periportal or pericentral hepatocytes. The declined levels in alkaline phosphatase, arginase I and GST- α might be accounted for by a hypothetical mechanism that regulates the expression of the three enzymes in a coordinated manner.

Seventh. The biomarkers of neurotoxicity studied (pNF-H and S100B) showed some evidence of neurological involvement associated with pesticide exposure, but results were not robust. This may be due to the fact that greenhouse workers were not exposed to pesticides with intrinsic neurotoxic properties. The subtle changes observed, particularly in S100B, may be due an increased permeability of the blood-brain barrier and/or to some degree of neuroinflammation resulting from a nonspecific response to pesticide exposure.

Eighth. In relation to the biomarkers of immunotoxicity studied, a significant increase was observed in almost all the cytokines, chemokines and growth factors studied in the period of high versus low exposure to pesticides and in greenhouse workers relative to controls. These findings suggest a low level systemic inflammatory state associated to an adaptive and nonspecific response to pesticide exposure. A greater release of these inflammatory factors induces the proliferation and activation of inflammatory/immunological cells as well as their migration to tissues where the inflammatory process has been triggered, along with an angiogenesis process in the same tissues. This peripheral

inflammation may increase the permeability of the blood-brain barrier and stimulate neuroinflammatory pathways, leading to some indirect neurotoxic involvement.

Capítulo 9

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Rasoul, G.M., Abou Salem, M.E., Mechael, A.A., Hendy, O.M., Rohlman, D.S., Ismail, A.A., 2008. Effects of occupational pesticide exposure on children applying pesticides. *Neurotoxicology* 29, 833-838.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10, RA141-7.
- Agarwal, R., Chase, S.D., 2002. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 775, 121-6.
- Aguilar-Garduño, C., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Rodríguez-Barranco, M., Hernández, A.F., Bassol, S., González-Alzaga, B., Cebrián, M.E., 2013. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. *Toxicology* 307, 55-65.
- Åkesson, A., Lundh, T., Vahter, M., Bjellerup, P., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., Samsioe, G., Strömberg, U., Skerfving, S., 2005. Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1627-1631.
- Al-Sarar, A., Abo Bakr, Y., Al-Erimah, G.S., Hussein, H.I., Bayoumi, A.E., 2009. Hematological and Biochemical Alterations in Occupationally Pesticides-Exposed Workers of Riyadh Municipality, Kingdom of Saudi Arabia. *Res. J. Environ. Toxicol.* 3, 179-185.
- Alasia, D.D., Emem-Chioma, P.C., Wokoma, F.S., 2010. Association of lead exposure, serum uric acid and parameters of renal function in Nigerian lead-exposed workers. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 1, 182-90.
- Albert, L., 2002. *Plaguicidas, Curso Basico de Toxixología Ambiental*. LIMOSA.
- Aldridge, W.N., 1953. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53, 110-7.
- Ali, T., Bhalli, J.A., Rana, S.M., Khan, Q.M., 2008. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 374-380.
- Aloni, B., Livne, A., 1974. Acetylcholine esterase as a probe for erythrocyte-membrane intactness. *Biochim. Biophys. Acta* 339, 359-66.
- Aminian, O., Eftekhari, S., Mazaheri, M., Sharifian, S.A., Sadeghniaat-Haghighi, K., 2011. Urinary β 2 microglobulin in workers exposed to arc welding fumes. *Acta Med. Iran.* 49, 748-52.
- Amir Aslani, B., Ghobadi, S., 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 146, 163-73.
- Androutsopoulos, V.P., Kanavouras, K., Tsatsakis, A.M., 2011. Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: Implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 418-424.
- Antoine, D.J., Harrill, A.H., Watkins, P.B., Park, B.K., 2014. Safety biomarkers for drug-induced liver injury - current status and future perspectives. *Toxicol. Res. (Camb)*. 3, 75-85.
- Arango, S., 2012. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 30, 75-82.
- Araoud, M., 2011. Biological Markers of Human Exposure to Pesticides, en: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. pp. 191-212.

Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Hfaiedh, H. Ben, Akrou, M., Hassine, M., Najjar, M.F., Kenani, A., 2012. Adverse effects of pesticides on biochemical and haematological parameters in Tunisian agricultural workers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 243-247.

Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Hfaiedh, H. Ben, Akrou, M., Najjar, M.F., Kenani, A., 2011. Factors influencing plasma butyrylcholinesterase activity in agricultural workers. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 69, 159-166.

Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Najjar, M.F., Kenani, A., 2010. Paraoxonase 1 correlates with butyrylcholinesterase and gamma glutamyl transferase in workers chronically exposed to pesticides. *J. Occup. Health* 52, 383-388.

Arnal, N., Astiz, M., de Alaniz, M.J.T., Marra, C.A., 2011. Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1779-1786.

Aroonvilairat, S., Kespichayawattana, W., Sornprachum, T., Chaisuriya, P., Siwadune, T., Ratanabanangkoon, K., 2015. Effect of Pesticide Exposure on Immunological, Hematological and Biochemical Parameters in Thai Orchid Farmers— A Cross-Sectional Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 5846-5861.

Astiz, M., Arnal, N., de Alaniz, M.J.T., Marra, C.A., 2011. Occupational exposure characterization in professional sprayers: Clinical utility of oxidative stress biomarkers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 249-258.

Astrand, R., Undén, J., Romner, B., 2013. Clinical Use of the Calcium-Binding S100B Protein, en: Heizmann, C.W. (Ed.), *Calcium-Binding Proteins and RAGE: From Structural Basics to Clinical Applications, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 373-384.

Atherton, K.M., Williams, F.M., Egea González, F.J., Glass, R., Rushton, S., Blain, P.G., Mutch, E., 2009. DNA damage in horticultural farmers: a pilot study showing an association with organophosphate pesticide exposure. *Biomarkers* 14, 443-51.

Atwood, D., Paisley-Jones, C., 2017. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008 – 2012 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, 2017 (https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf)

Awad, O.M., El-Fiki, S.A., Abou-Shanab, R.A.I., Hassanin, N.M.A., Abd El Rahman, R., 2014. Influence of exposure to pesticides on liver enzymes and cholinesterase levels in male agriculture workers. *Glob. Nest J.* 16, 1006-1015.

Aydin, S., Aydin, S., Croteau, G., Sahin, Í., Cital, C., 2010. Ghrelin, Nitrite and Paraoxonase/Arylesterase Concentrations in Cement Plant Workers. *J. Med. Biochem.* 29, 78-83.

Bagshaw, S.M., Gibney, R.T.N., 2008. Conventional markers of kidney function. *Crit. Care Med.* 36, S152-S158.

Baharuddin, M.R.B., Sahid, I.B., Noor, M.A.B.M., Sulaiman, N., Othman, F., 2011. Pesticide risk assessment: a study on inhalation and dermal exposure to 2,4-D and paraquat among Malaysian paddy farmers. *J. Environ. Sci. Health. B.* 46, 600-607.

Bailey, W.J., Holder, D., Patel, H., Devlin, P., Gonzalez, R.J., Hamilton, V., Muniappa, N., Hamlin, D.M., Thomas, C.E., Sistare, F.D., Glaab, W.E., 2012. A performance evaluation of three drug-induced liver injury biomarkers in the rat: Alpha-glutathione S-transferase, arginase 1, and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Toxicol. Sci.* 130, 229-244.

- Barr, D.B., Bravo, R., Weerasekera, G., Caltabiano, L.M., Whitehead, R.D., Olsson, A., Caudill, S.P., Schober, S.E., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Jackson, R.J., Needham, L.L., 2004. Concentrations of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population. *Environ. Health Perspect.* 112, 186-200.
- Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J., Sanin, L.H., 2007a. Cancer health effects of pesticides. *Can. Fam. Physician* 53, 1704-1711.
- Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J., Sanin, L.H., Cole, D.C., Bassil, K.L., Vakil, C., Kaur, J.S., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J., Sanin, L.H., 2007b. Non-cancer health effects of pesticides. *Can. Fam. Physician* 53, 1712-1720.
- Bayrami, M., Hashemi, T., Malekirad, A.A., Ashayeri, H., Faraji, F., Abdollahi, M., 2012. Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Ind. Health* 28, 90-96.
- Beckett, G.J., Foster, G.R., Hussey, A.J., Oliveira, D.B., Donovan, J.W., Prescott, L.F., Proudfoot, A.T., 1989. Plasma glutathione S-transferase and F protein are more sensitive than alanine aminotransferase as markers of paracetamol (acetaminophen)-induced liver damage. *Clin. Chem.* 35, 2186-9.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70-6.
- Berman, T., Göen, T., Novack, L., Beacher, L., Grinshpan, L., Segev, D., Tordjman, K., 2016. Urinary concentrations of organophosphate and carbamate pesticides in residents of a vegetarian community. *Environ. Int.* 96, 34-40.
- Bernal-Hernández, Y.Y., Medina-Díaz, I.M., Barrón-Vivanco, B.S., Robledo-Marengo, M. de L., Girón-Pérez, M.I., Pérez-Herrera, N.E., Quintanilla-Vega, B., Cerda-Flores, R., Rojas-García, A.E., 2014. Paraoxonase 1 and its relationship with pesticide biomarkers in indigenous Mexican farmworkers. *J. Occup. Environ. Med.* 56, 281-90.
- Bhalli, J.A., Khan, Q.M., Haq, M.A., Khalid, A.M., Nasim, A., 2006. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis* 21, 143-148.
- Bhaskar, R., Mohanty, B., 2014. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 226-34.
- Blair, P., Flaumenhaft, R., 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23, 177-89.
- Bodur, E., Layer, P.G., 2011. Counter-regulation of cholinesterases: Differential activation of PKC and ERK signaling in retinal cells through BChE knockdown. *Biochimie* 93, 469-476.
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33-S40.
- Bonventre, J. V., Vaidya, V.S., Schmouder, R., Dieterle, P.F. & F., 2010. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* 28, 436-440.
- Brimijoin, S., Chen, V.P., Pang, Y.-P., Geng, L., Gao, Y., 2016. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem. Biol. Interact.* 259, 271-275.
- Brouwer, E.J., Evelo, C.T., Verplanke, a J., van Welie, R.T., de Wolff, F. a, 1991. Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3-dichloropropene: effects on liver and renal function and on glutathione conjugation. *Br. J. Ind. Med.* 48, 167-172.

- Brvar, M., Možina, H., Osredkar, J., Možina, M., Noč, M., Bručan, A., Bunc, M., 2004. S100B protein in carbon monoxide poisoning: A pilot study. *Resuscitation* 61, 357-360.
- Bryk, B., Benmoyal-Segal, L., Podoly, E., Livnah, O., Eisenkraft, A., Luria, S., Cohen, A., Yehezkelli, Y., Hourvitz, A., Soreq, H., 2005. Inherited and acquired interactions between ACHE and PON1 polymorphisms modulate plasma acetylcholinesterase and paraoxonase activities. *J. Neurochem.* 92, 1216-1227.
- Bulat, Z.P., Dukic-Cosic, D., Dokic, M., Bulat, P., Matovic, V., 2009. Blood and urine cadmium and bioelements profile in nickel-cadmium battery workers in Serbia. *Toxicol. Ind. Health* 25, 129-135.
- Bulgaroni, V., Lombardo, P., Rivero-Osimani, V., Vera, B., Dulgerian, L., Cerbán, F., Rivero, V., Magnarelli, G., Guiñazú, N., 2013. Environmental pesticide exposure modulates cytokines, arginase and ornithine decarboxylase expression in human placenta. *Reprod. Toxicol.* 39, 23-32.
- Cain, D.W., Snowden, P.B., Sempowski, G.D., Kelsoe, G., 2011. Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. *PLoS One* 6.
- Cakir, Z., Aslan, S., Umudum, Z., Acemoglu, H., Akoz, A., Turkyilmaz, S., Öztürk, N., 2010. S-100 β and neuron-specific enolase levels in carbon monoxide-related brain injury. *Am. J. Emerg. Med.* 28, 61-67.
- Campion, S., Aubrecht, J., Boekelheide, K., Brewster, D.W., Vaidya, V.S., Anderson, L., Burt, D., Dere, E., Hwang, K., Pacheco, S., Saikumar, J., Schomaker, S., Sigman, M., Goodsaid, F., 2013. The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 1391-408.
- Camps, J., García-Heredia, A., Rull, A., Alonso-Villaverde, C., Aragonès, G., Beltrán-Debón, R., Rodríguez-Gallego, E., Joven, J., 2012. PPARs in regulation of paraoxonases: Control of oxidative stress and inflammation pathways. *PPAR Res.* 2012.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99-117.
- Castillo-Cadena, J., González-Mercado, A.L., Hernández-Caballero, N., Juan, E.R.S., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2013. Immunotoxic damage in floriculturists exposed to pesticide mixtures. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 48, 33-39. .
- Cataño, H.C., Carranza, E., Huamaní, C., Hernández, A.F., 2008. Plasma cholinesterase levels and health symptoms in peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 153-159. .
- Cazorla-Reyes, R., Fernández-Moreno, J.L., Romero-González, R., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2011. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 85, 183-196.
- CDC, 2016. Centers for Diseases Control and Prevention. National Biomonitoring Program. Biomonitoring Summary. Organophosphorus Insecticides: Dialkyl Phosphate Metabolites. https://www.cdc.gov/biomonitoring/op-dpm_biomonitoringsummary.html (acceso 23/12/2016).
- Cerioti, G., 1983. Ornithine Carbamoyltransferase, en: Bergmeyer, H., Bergmeyer, J., Grassi, M. (Eds.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. III. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 319-325.
- Cerit, N., Onuk, A.A., Ellidag, H.Y., Eren, E., Bulbuller, N., Yilmaz, N., 2014. Arylesterase and oxidative stress in operating room personnel. *Adv. Clin. Exp. Med.* 23, 49-55.

- Chakraborty, S., Mukherjee, S., Roychoudhury, S., Siddique, S., Lahiri, T., Ray, M.R., 2009. Chronic exposures to cholinesterase-inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India. *J. Occup. Health* 51, 488-497.
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3-S23.
- Charlton, J.R., Portilla, D., Okusa, M.D., 2014. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 1301-1311.
- Chen, J.J., Lin, W.J., Lu, T.P., 2014. Biomarkers of susceptibility: Pharmacogenomics and toxicogenomics, en: Gupta, R.C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press Oxford, UK, pp. 975-982.
- Cheon, H., Woo, Y., Lee, J.Y., Kim, H.J.H.S., Cho, S., Won, N.H., Sohn, J., 2007. Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages. *Exp. Mol. Med.* 39, 524-34.
- Chia, S.E., Mohamed Ali, S., Yap, P.H.E., Gan, L., Ong, Y.B., Chia, K.S., 2009. Distribution of PON1 polymorphisms-PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate exposure. *Neurotoxicology* 30, 214-219.
- Chuang, K.-J., Pan, C.-H., Su, C.-L., Lai, C.-H., Lin, W.-Y., Ma, C.-M., Ho, S.-C., Bien, M.-Y., Chen, C.-H., Chuang, H.-C., 2015. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with heavy metal exposure in welding workers. *Sci. Rep.* 5, 18048.
- Cobb, C.A., Cole, M.P., 2015. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 84, 4-21.
- Cockcroft, D.W., Gault, M.H., 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16, 31-41.
- Colosio, C., Barcellini, W., Maroni, M., Alcini, D., Bersani, M., Cavallo, D., Galli, A., Meroni, P., Pastorelli, R., Rizzardi, G.P., Soleo, L., Foà, V., 1996. Immunomodulatory effects of occupational exposure to mancozeb. *Arch. Environ. Health* 51, 445-51.
- Corsini, E., Birindelli, S., Fustinoni, S., De Paschale, G., Mammone, T., Visentin, S., Galli, C.L., Marinovich, M., Colosio, C., 2005. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 178-185.
- Corsini, E., Codecà, I., Mangiaratti, S., Birindelli, S., Minoia, C., Turci, R., Viviani, B., Facchi, A., Vitelli, N., Lucchi, L., Galli, C.L., Marinovich, M., Colosio, C., 2007. Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 202-10.
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C.L., Moretto, A., Colosio, C., 2013. Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307, 123-135.
- Costa, C., García-Lestón, J., Costa, S., Coelho, P., Silva, S., Pingarilho, M., Valdiglesias, V., Mattei, F., Dall'Armi, V., Bonassi, S., Laffon, B., Snawder, J., Teixeira, J.P., 2014. Is organic farming safer to farmers' health? A comparison between organic and traditional farming. *Toxicol. Lett.* 230, 166-76.
- Costa, C., Rapisarda, V., Catania, S., Di Nola, C., Ledda, C., Fenga, C., 2013. Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: an observational study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 796-800.
- Costa, L.G., Giordano, G., Guizzetti, M., Vitalone, A., 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front. Biosci.* 13, 1240-1249.

Costa, C.M. Da, Santos, R.C.C. Dos, Lima, E.S., 2006. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 42, 345-350.

Crane, A.L., Rasoul, G.A., Ismail, A.A., Hendy, O., Bonner, M.R., Lasarev, M.R., Al-Batanony, M., Singleton, S.T., Khan, K., Olson, J.R., Rohlman, D.S., Abdel Rasoul, G., Ismail, A.A., Hendy, O., Bonner, M.R., Lasarev, M.R., Al-Batanony, M., Singleton, S.T., Khan, K., Olson, J.R., Rohlman, D.S., 2013. Longitudinal assessment of chlorpyrifos exposure and effect biomarkers in adolescent Egyptian agricultural workers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 23, 356-362.

Curl, C.L., Beresford, S.A.A., Fenske, R.A., Fitzpatrick, A.L., Lu, C., Nettleton, J.A., Kaufman, J.D., 2015. Estimating pesticide exposure from dietary intake and organic food choices: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environ. Health Perspect.* 123, 475-83.

Da Silva, F.R., Da Silva, J., Allgayer, M. da C., Simon, C.F., Dias, J.F., Dos Santos, C.E.I., Salvador, M., Branco, C., Schneider, N.B., Kahl, V., Rohr, P., Kvitko, K., 2012. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *J. Hazard. Mater.* 225-226, 81-90.

Da Silva, F.R., Kvitko, K., Rohr, P., Abreu, M.B., Thiesen, F. V., Da Silva, J., 2014. Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times. *Sci. Total Environ.* 490, 334-341.

Dail, M.B., Pickin, R., Crow, J.A., Chambers, J.E., 2014. The effect of in vitro dieldrin exposure on the rat paraoxonase 1 (pon1) promoter. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 224-31.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623.

Dalvie, M.A., Naik, I., Channa, K., London, L., 2011. Urinary dialkyl phosphate levels before and after first season chlorpyrifos spraying amongst farm workers in the Western Cape, South Africa. *J. Environ. Sci. Health. B.* 46, 163-72.

Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Opelz, G., 1995. Impaired in-vitro lymphocyte responses in patients with elevated pentachlorophenol (PCP) blood levels. *Arch. Environ. Health* 50, 287-92.

Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C., Opelz, G., 2002. Associations of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 Blood Levels with Plasma IL-4. *Arch. Environ. Heal. An Int. J.* 57, 541-547.

Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Conradt, C., Opelz, G., 2001. Associations of blood levels of PCB, HCHS, and HCB with numbers of lymphocyte subpopulations, in vitro lymphocyte response, plasma cytokine levels, and immunoglobulin autoantibodies. *Environ. Health Perspect.* 109, 173-8.

DeGregory, P.R., Tsai, Y.-J., Scida, K., Richards, I., Crooks, R.M., 2016. Quantitative electrochemical metalloimmunoassay for TFF3 in urine using a paper analytical device. *Analyst* 1734-1744.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15, 316-328.

Dessì, M., Noce, A., Dawood, K.F., Galli, F., Taccone-Gallucci, M., Fabrini, R., Bocedi, A., Massoud, R., Fucci, G., Pastore, A., Manca Di Villahermosa, S., Zingaretti, V., Federici, G., Ricci, G., 2012. Erythrocyte glutathione transferase: A potential new biomarker in chronic kidney diseases which correlates with plasma homocysteine. *Amino Acids* 43, 347-354.

Devarajan, A., Shih, D., Reddy, S.T., 2014. Inflammation, infection, cancer and all that...the role of paraoxonases. *Adv. Exp. Med. Biol., Advances in Experimental Medicine and Biology* 824, 33-41.

- Díaz-Muñoz, M., Hernández-Muñoz, R., 2010. Molecular and biochemical features of the mitochondrial enzyme ornithine transcarbamylase: a possible new role as a signaling factor. *Curr. Med. Chem.* 17, 2253-60.
- Ding, X., Zhang, Q., Wei, H., Zhang, Z., 2011. Cadmium-induced renal tubular dysfunction in a group of welders. *Occup. Med. (Chic. Ill)*. 61, 277-279.
- Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., La Du, B.N., 2000. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J. Biol. Chem.* 275, 33435-42.
- Du, T.Y., Luo, H.M., Qin, H.C., Wang, F., Wang, Q., Xiang, Y., Zhang, Y., 2013. Circulating serum trefoil factor 3 (TFF3) is dramatically increased in chronic kidney disease. *PLoS One* 8, 6-11.
- Duysen, E.G., Lockridge, O., 2011. Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 214-220.
- Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N., 1983. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 214-27.
- El-Demerdash, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1346-1352.
- El-Demerdash, F.M., 2007. Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. *Toxicol. Vitr.* 21, 392-397.
- Ellison, C.A., Crane, A.L., Bonner, M.R., Knaak, J.B., Browne, R.W., Lein, P.J., Olson, J.R., 2012. PON1 status does not influence cholinesterase activity in Egyptian agricultural workers exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265, 308-315.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Emeigh Hart, S.G., 2005. Assessment of renal injury in vivo. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 52, 30-45.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2014. The 2011 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA J.* 12, 3942.
- Fahimul-Haq, M., Mahmood, S., Choudhry, N., Shahbaz, T., Akram, S., Yasmin, R., 2013. Study of effect of pesticides on total bilirubin and direct bilirubin levels in blood of workers of pesticide formulation & packing plants in Pakistan: Multiplexing with ALP, ALT and AST. *Pakistan J. Med. Heal. Sci.* 7, 736-739.
- Farahat, F.M., Ellison, C.A., Bonner, M.R., McGarrigle, B.P., Crane, A.L., Fenske, R.A., Lasarev, M.R., Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J., Olson, J.R., 2011. Biomarkers of chlorpyrifos exposure and effect in Egyptian cotton field workers. *Environ. Health Perspect.* 119, 801-806.
- Fareed, M., Pathak, M.K., Bihari, V., Kamal, R., Srivastava, A.K., Kesavachandran, C.N., 2013. Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. *PLoS One* 8, e69755.
- Fatkhutdinova, L.M., Khaliullin, T.O., Vasil'yeva, O.L., Zalyalov, R.R., Mustafin, I.G., Kisin, E.R., Birch, M.E., Yanamala, N., Shvedova, A.A., 2016. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299, 125-131.

- Felten, M.K., Khatab, K., Knoll, L., Schettgen, T., Müller-Berndorff, H., Kraus, T., 2014. Changes of mesothelin and osteopontin levels over time in formerly asbestos-exposed power industry workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 87, 195-204.
- Fenga, C., Gangemi, S., Catania, S., De Luca, A., Costa, C., 2014. IL-17 and IL-22 serum levels in greenhouse workers exposed to pesticides. *Inflamm. Res.* 63, 895-897.
- Ferguson, K.K., Loch-Caruso, R., Meeker, J.D., 2011. Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress: NHANES 1999-2006. *Environ. Res.* 111, 718-726.
- Ferguson, M.A., Vaidya, V.S., Bonventre, J. V., 2008. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology* 245, 182-193.
- Fernández Prieto, R.M., Ramallo Bravo, A., Carmona Carmona, G., Carrasco Jiménez, M.S., 2011. Papel de las colinesterasas plasmáticas. *Actualización. Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación* 58, 508-516.
- Filella, X., Molina, R., Ballesta, A.M., 2003. Estructura y función de las citocinas. *Med. Integr.* 41, 63-71.
- Flaskos, J., 2014. The neuronal cytoskeleton as a potential target in the developmental neurotoxicity of organophosphorothionate insecticides. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 115, 201-208.
- Ford, S.M., 2014. Conventional and emerging renal biomarkers, *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier Inc.
- Foster, J.R., 2001. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 171-192.
- Funchal, C., Moretto, M.B., Vivian, L., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2006. Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* 222, 143-153.
- Gaikwad, A.S., Karunamoorthy, P., Kondhalkar, S.J., Ambikapathy, M., Beerappa, R., 2015. Assessment of hematological, biochemical effects and genotoxicity among pesticide sprayers in grape garden. *J. Occup. Med. Toxicol.* 10, 11.
- Gajewski, T.F., Fitch, F.W., 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140, 4245 LP-4252.
- García-García, C.R., Parrón, T., Requena, M., Alarcón, R., Tsatsakis, A.M., Hernández, A.F., 2016. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci.* 145, 274-283.
- García-García, C.R., 2016. Repercusión clínica y analítica de la exposición ocupacional a plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Gil, F., Hernández, A.F., 2009. Significance of Biochemical Markers in Applied Toxicology, en: Ballantyne, B., Marrs, T.C., Syversen, T. (Eds.), *General and Applied Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 847-857.
- Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245-255.
- Gomes, J., Dawodu, A.H., Lloyd, O., Revitt, D.M., Anilal, S. V., 1999. Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 33-7.

- Gómez-Martín, A., Altakroni, B., Lozano-Paniagua, D., Margison, G.P., de Vocht, F., Povey, A.C., Hernández, A.F., 2015. Increased N7-methyldeoxyguanosine DNA adducts after occupational exposure to pesticides and influence of genetic polymorphisms of paraoxonase-1 and glutathione S-transferase M1 and T1. *Environ. Mol. Mutagen.* 56, 437-445.
- Gordon, C.J., Ward, W.O., 2009. A multianalyte profile of serum proteins to screen for toxicological effects of anticholinesterase insecticides in the rat. *Neurotoxicology* 30, 377-381.
- Gores, G.J., Herman, B., Lemasters, J.J., 1990. Plasma membrane bleb formation and rupture: A common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11, 690-698.
- Glass R, Garthwaite D, Pote A, Kennedy M, Hart A, Trevisan M, et al. 2012. Collection and assessment of data relevant for non-dietary cumulative exposure to pesticides and proposal for conceptual approaches for non-dietary cumulative exposure assessment. *Supporting Publications 2012*; 9(10): EN-346.
- Griffin, P., Mason, H., Heywood, K., Cocker, J., 1999. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. *Occup. Environ. Med.* 56, 10-3.
- Halatek, T., Sinczuk-Walczak, H., Rabieh, S., Wasowicz, W., 2009. Association between occupational exposure to arsenic and neurological, respiratory and renal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 193-199.
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125-130.
- Hanssen, V.M., Nigatu, A.W., Zeleke, Z.K., Moen, B.E., Bråtveit, M., 2015. High Prevalence of Respiratory and Dermal Symptoms Among Ethiopian Flower Farm Workers. *Arch. Environ. Occup. Health* 70, 204-213.
- Haque, Q.S., Jamal, F., Rastogi, S.K., 2012. Effect of Organophosphorus on Biochemical Parameters on Agricultural Workers of Mango Orchards. *Asian J. Biochem.* 7, 37-45.
- Harisa, G.I., Attia, S.M., Ashour, A.E., Abdallah, G.M., Omran, G.A., Touliabah, H.E., 2014. Cigarette Smoking and Hyperglycemia Increase Renal Response to Low Levels of Cadmium in Welders: Cystatin C as a Sensitive Marker. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 289-296.
- Helal, S.F., Elshafy, W.S., 2012. Health hazards among workers in plastic industry. *Toxicol. Ind. Health* 29, 812-819.
- Hernández, A.F., Mackness, B., Rodrigo, L., López, O., Pla, A., Gil, F., Durrington, P.N., Pena, G., Parrón, T., Serrano, J.L., Mackness, M.I., 2003. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 565-74.
- Hernández, A.F., Gómez, 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. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A* 67
- Hernández, A.F., López, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parrón, T., Álvarez, J.C., Lorente, J.A., Pla, A., 2005. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol. Lett.* 159, 13-21.
- Hernández, A.F., Gómez, M.A., Pérez, V., García-Lario, J. V., Peña, G., Gil, F., López, O., Rodrigo, L., Pino, G., Pla, A., 2006a. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environ. Res.* 102, 70-6.
- Hernández, A.F., López, O., Gil, F., Rodrigo, L., 2006b. Biomonitorización de trabajadores con exposición crónica a plaguicidas. Importancia de las esterases sanguíneas. *La Mutua* 16, 35-50.

Hernández, A.F., Lopez, O., Pena, G., Serrano, J.L., Parron, T., Rodrigo, L., Gil, F., Pla, A., 2007. Paraoxonase-1 (PON1) as a Predictor of Biochemical Outcomes in Farmers. *Curr. Enzym. Inhib.* 3, 175-182.

Hernández, A.F., Parrón, T., Serrano, J.L., Marín, P., 2010. *Anticholinesterase Pesticides, Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Hernández, A.F., Parrón, T., Alarcón, R., 2011. Pesticides and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11, 90-96.

Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., Rodríguez-Barranco, M., Gómez-Martin, A., Lozano, D., Pla, A., 2013a. Modulation of the endogenous antioxidants paraoxonase-1 and urate by pesticide exposure and genetic variants of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 61, 164-70.

Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., Rodríguez-Barranco, M., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Parrón, T., Alarcón, R., 2013b. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 61, 144-151.

Hernández, A.F., Lacasaña, M., Gil, F., Rodríguez-Barranco, M., Pla, A., López-Guarnido, O., 2013c. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology* 307, 95-102.

Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O., 2013d. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology* 307, 136-145.

Hernández, A.F., Gil, F., Tsatsakis, A.M., 2014. Biomarkers of chemical mixture toxicity, en: Gupta RC (Ed.), *Biomarkers in Toxicology.* Academic Press Oxford, UK, pp. 655-669.

Hernández Jerez, A., 2012. Toxicología Industrial (IV). Toxicidad de los plaguicidas, en: Gil, F. (Ed.), *Tratado de Medicina del trabajo.* Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 783-796.

Hofmann, J.N., Keifer, M.C., De Roos, A.J., Fenske, R.A., Furlong, C.E., van Belle, G., Checkoway, H., 2010. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. *Occup. Environ. Med.* 67, 375-386.

Hoover, D.B., 2017. Cholinergic modulation of the immune system presents new approaches for treating inflammation. *Pharmacol. Ther.* Article in press.

Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., Shimoda, T., 2010. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 49, 1215-28.

Hotz, P., Guillemin, M.P., Lob, M., 1980. Study of some hepatic effects (induction and toxicity) caused by occupational exposure to styrene in the polyester industry. *Scand. J. Work. Environ. Heal.* 6, 206-215.

Hsiao, P.-K., Lin, Y.-C., Shih, T.-S., Chiung, Y.-M., 2009. Effects of occupational exposure to 1,4-dichlorobenzene on hematologic, kidney, and liver functions. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 1077-1085.

Iañez Pareja, E., 2000. Curso de Inmunología General. <https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/Programa97.htm> (acceso 20/10/2016).

- Irie, M., Sohda, T., Iwata, K., Kunimoto, H., Fukunaga, A., Kuno, S., Yotsumoto, K., Sakurai, K., Iwashita, H., Hirano, G., Ueda, S.I., Yokoyama, K., Morihara, D., Nishizawa, S., Anan, A., Takeyama, Y., Sakamoto, M., Shakado, S., Sakisaka, S., 2012. Levels of the oxidative stress marker gamma-glutamyltranspeptidase at different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *J Int Med Res* 40, 924-933.
- Ishikawa, H., Matsuzawa, T., Ohashi, K., Nagamura, Y., 2003. A novel method for measuring serum ornithine carbamoyltransferase. *Ann. Clin. Biochem.* 40, 264-268.
- Ismail, A.A., Rohlman, D.S., Abdel Rasoul, G.M., Abou Salem, M.E., Hendy, O.M., 2010. Clinical and biochemical parameters of children and adolescents applying pesticides. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 1, 132-43.
- Jin, Z.K., Tian, P.X., Wang, X.Z., Xue, W.J., Ding, X.M., Zheng, J., Ding, C.G., Mao, T.C., Duan, W.L., Xi, M., 2013. Kidney injury molecule-1 and osteopontin: New markers for prediction of early kidney transplant rejection. *Mol. Immunol.* 54, 457-464.
- Jintana, S., Sming, K., Krongtong, Y., Thanyachai, S., 2009. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 833-842.
- Jońca, J., Zuk, M., Wasag, B., Janaszak-Jasiecka, A., Lewandowski, K., Wielgomas, B., Waleron, K., Jasiecki, J., 2015. New insights into butyrylcholinesterase activity assay: Serum dilution factor as a crucial parameter. *PLoS One* 10, 1-10.
- Joshaghani, H.R., Ahmadi, A.R.L.I.R., Mansourian, A.R., 2007. Effects of occupational exposure in pesticide plant on workers' serum and erythrocyte cholinesterase activity. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 20, 381-385.
- Jowzi, N., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Baeri, M., Darvishi, B., Rezvanfar, M.A., Abdollahi, M., 2016. Reduction of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by selected phosphodiesterase inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol.* 128, 57-62.
- Junge, W., Klees, H., 1983. Arylesterase, en: Bergmeyer, H., Bergmeyer, J., Grassi, M. (Eds.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. IV. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 8-14.
- Kachaiyaphum, P., Howteerakul, N., Sujirarat, D., Siri, S., Suwannapong, N., 2010. Serum cholinesterase levels of Thai chilli-farm workers exposed to chemical pesticides: Prevalence estimates and associated factors. *J. Occup. Health* 52, 89-98.
- Kahl, V.F.S., Simon, D., Salvador, M., Branco, C. dos S., Dias, J.F., da Silva, F.R., de Souza, C.T., da Silva, J., 2016. Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. *Environ. Mol. Mutagen.* 57, 74-84.
- Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., Hansbro, P.M., 2008. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.
- Kamal, M., Fathy, M.M., Taher, E., Hasan, M., Tolba, M., 2011. Assessment of the role of paraoxonase gene polymorphism (Q192R) and paraoxonase activity in the susceptibility to atherosclerosis among lead-exposed workers. *Ann. Saudi Med.*
- Kanda, H., Sumi, D., Endo, A., Toyama, T., Chen, C.L., Kikushima, M., Kumagai, Y., 2008. Reduction of arginase I activity and manganese levels in the liver during exposure of rats to methylmercury: A possible mechanism. *Arch. Toxicol.* 82, 803-808.

- Kapka-Skrzypczak, L., Cyranka, M., Skrzypczak, M., Kruszewski, M., 2011. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. *Ann. Agric. Environ. Med.* 18, 294-303.
- Karataş, M.O., Uslu, H., Alici, B., Gökçe, B., Gencer, N., Arslan, O., Arslan, N.B., Özdemir, N., 2016. Functionalized imidazolium and benzimidazolium salts as paraoxonase 1 inhibitors: Synthesis, characterization and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 1392-1401.
- Kasarala, G., Tillmann, H.L., 2016. Standard liver tests. *Clin. Liver Dis.* 8, 13-18.
- Kasperczyk, A., Dziwisz, M., Ostałowska, A., Swietochowska, E., Birkner, E., 2013. Function of the liver and bile ducts in humans exposed to lead. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 787-96.
- Kavvalakis, M.P., Tsatsakis, A.M., 2012. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Sci. Int.* 218, 111-122.
- Keifer, M.C., Firestone, J., 2008. Neurotoxicity of Pesticides. *J. Agromedicine* 37-41.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Fattal, R., Pattani, S., Yang, E., Zaheer, S., Santillan, D.A., Santillan, M.K., Zaheer, A., 2016. Mast Cells Release Chemokine CCL2 in Response to Parkinsonian Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium (MPP(+)). *Neurochem. Res.* 41, 1042-9.
- Kessler, F.H.P., Woody, G., Portela, L.V.C., Tort, A.B.L., De Boni, R., Peuker, A.C.W.B., Genro, V., Diemen, L. Von, Souza, D.O.G. de, Pechansky, F., 2007. Brain injury markers (S100B and NSE) in chronic cocaine dependents. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 29, 134-139.
- Khan, D.A., Hashmi, I., Mahjabeen, W., Naqvi, T.A., 2010a. Monitoring health implications of pesticide exposure in factory workers in Pakistan. *Environ. Monit. Assess.* 168, 231-240.
- Khan, D.A., Shabbir, S., Majid, M., Ahad, K., Naqvi, T.A., Khan, F.A., 2010b. Risk assessment of pesticide exposure on health of Pakistani tobacco farmers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 20, 196-204.
- Khan, D. a, Ahad, K., Ansari, W.M., Khan, H., 2013. Pesticide exposure and endocrine dysfunction in the cotton crop agricultural workers of southern Punjab, Pakistan. *Asia. Pac. J. Public Health* 25, 181-91.
- Khan, D., Qayyum, S., Saleem, S., Khan, F., 2008. Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers. *Toxicol. Ind. Health* 24, 611-618.
- Khan, K., Ismail, A.A., Abdel Rasoul, G., Bonner, M.R., Lasarev, M.R., Hendy, O., Al-Batanony, M., Crane, A.L., Singleton, S.T., Olson, J.R., Rohlman, D.S., 2014. Longitudinal assessment of chlorpyrifos exposure and self-reported neurological symptoms in adolescent pesticide applicators. *BMJ Open* 4, e004177.
- Kimata, A., Kondo, T., Ueyama, J., Yamamoto, K., Mochizuki, A., Asai, K., Takagi, K., Okamura, A., Wang, D., Kamijima, M., Nakajima, T., Fukaya, Y., Shibata, E., Gotoh, M., Saito, I., 2009. Relationship between urinary pesticide metabolites and pest control operation among occupational pesticide sprayers. *J. Occup. Health* 51, 100-105.
- Kisby, G.E., Muniz, J.F., Scherer, J., Lasarev, M.R., Koshy, M., Kow, Y.W., McCauley, L., 2009. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J. Agromedicine* 14, 206-14.
- Kliwer, S.A., Goodwin, B., Willson, T.M., 2002. The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Rev.* 23, 687-702.
- Knipe, D.W., Jayasumana, C., Siribaddana, S., Priyadarshana, C., Pearson, M., Gunnell, D., Metcalfe, C., Tzatzarakis, M.N., Tsatsakis, A.M., 2016. Feasibility of hair sampling to assess levels of organophosphate metabolites in rural areas of Sri Lanka. *Environ. Res.* 147, 207-211.

- Kojima, H., Sata, F., Takeuchi, S., Sueyoshi, T., Nagai, T., 2011. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology* 280, 77-87.
- Kokkinaki, A., Kokkinakis, M., Kavvalakis, M.P., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Maravgakis, G., Babatsikou, F., Fragkiadakis, G.A., Tsatsakis, A.M., 2014. Biomonitoring of dialkylphosphate metabolites (DAPs) in urine and hair samples of sprayers and rural residents of Crete, Greece. *Environ. Res.* 134, 181-187.
- Korfias, S., Papadimitriou, A., Stranjalis, G., Bakoula, C., Antsaklis, A., Sakas, D.E., 2009. Serum biochemical markers of brain injury. *Mini-Reviews Med. Chem.* 9, 227-234.
- Krenz, J.E., Hofmann, J.N., Smith, T.R., Cunningham, R.N., Fenske, R.A., Simpson, C.D., Keifer, M., 2015. Determinants of butyrylcholinesterase inhibition among agricultural pesticide handlers in Washington State: An Update. *Ann. Occup. Hyg.* 59, 25-40.
- Krewski, D., Acosta, D., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J.C., Boekelheide, K., Brent, R., Charnley, G., Cheung, V.G., Green, S., Kelsey, K.T., Kerkvliet, N.I., Li, A.A., McCray, L., Meyer, O., Patterson, R.D., Pennie, W., Scala, R.A., Solomon, G.M., Stephens, M., Yager, J., Zeise, L., 2010. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 13, 51-138.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K.N., Wood, J.G., 2016. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front. Immunol.* 6, 1-12.
- Kuwatsuka, Y., Shimizu, K., Akiyama, Y., Koike, Y., Ogawa, F., Furue, M., Utani, A., 2013. Yusho patients show increased serum IL-17, IL-23, IL-1 β , and TNF α levels more than 40 years after accidental polychlorinated biphenyl poisoning. *J. Immunotoxicol.* 11, 246-249.
- Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco-Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., Gamboa, R., Bassol, S., Cebrian, M.E., 2010a. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 19-26.
- Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco-Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., Gamboa, R., Gonzalez-Alzaga, B., Bassol, S., Cebrian, M.E., 2010b. Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249, 16-24.
- Lara, D.R., Gama, C.S., Belmonte-De-Abreu, P., Portela, L.V.C., Gonçalves, C.A., Fonseca, M., Hauck, S., Souza, D.O., 2001. Increased serum S100B protein in schizophrenia: A study in medication-free patients. *J. Psychiatr. Res.* 35, 11-14.
- Lee, C.H., Kamijima, M., Kim, H., Shibata, E., Ueyama, J., Suzuki, T., Takagi, K., Saito, I., Gotoh, M., Hibi, H., Naito, H., Nakajima, T., 2007. 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocyte and urine according to exposure to organophosphorus pesticides and paraoxonase 1 genotype. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80, 217-227.
- Lee, D.H., Blomhoff, R., Jacobs, D.R., 2004. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic. Res.* 38, 535-539.
- Lee, D.H., Jacobs, D.R., 2009. Serum gamma-glutamyltransferase: new insights about an old enzyme. *J. Epidemiol. Community Health* 63, 884-6.
- Lee, D., Jacobs, D.R., 2009. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radic. Res.* 43, 533-537.

Lees, J.F., Shneidman, P.S., Skuntz, S.F., Carden, M.J., Lazzarini, R. a, 1988. The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *EMBO J.* 7, 1947-55.

Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2006. Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicol. Sci.* 91, 501-509.

Levey, A.S., Greene, T., Kusek, J.W., Beck, G.J., 2000. MDRD Study Group: A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 11, 155A.

Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y.L., Castro, A.F., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Greene, T., Coresh, J., 2009. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* 150, 604-12.

Li, S., Ren, Y., Zhu, W., Yang, F., Zhang, X., Huang, X., 2016. Phosphorylated neurofilament heavy chain levels in paired plasma and CSF of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 367, 269-274.

Li, W.-F., Pan, M.-H., Chung, M.-C., Ho, C.-K., Chuang, H.-Y., 2006. Lead exposure is associated with decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity and genotypes. *Environ. Health Perspect.* 114, 1233-6.

Lim, J.-S., Yang, J.-H., Chun, B.-Y., Kam, S., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., 2004. Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1018-1023.

Limdi, J.K., 2003. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad. Med. J.* 79, 307-312.

Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E., Schettino, T., 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. *Biomed Res. Int.* 2013.

Liu, W., Huo, X., Liu, D., Zeng, X., Zhang, Y., Xu, X., 2014. S100 β in heavy metal-related child attention-deficit hyperactivity disorder in an informal e-waste recycling area. *Neurotoxicology* 45, 185-191.

Llorens, J., 2013. Toxic neurofilamentous axonopathies -- accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *J. Intern. Med.* 273, 478-89.

López, O., Hernández, A.F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parrón, T., Villanueva, E., Pla, A., 2007. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol. Lett.* 171, 146-53.

Lopez Guarnido, O., 2005. Influencia de la 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.

Lozano-Paniagua, D., Gómez-Martín, A., Gil, F., Parrón, T., Alarcón, R., Requena, M., Lacasaña, M., Hernández, A.F., 2016. Activity and determinants of cholinesterases and paraoxonase-1 in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Chem. Biol. Interact.* 259, 160-167.

Lu, C., Bravo, R., Caltabiano, L.M., Irish, R.M., Weerasekera, G., Barr, D.B., 2005. The presence of dialkylphosphates in fresh fruit juices: implication for organophosphorus pesticide exposure and risk assessments. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 68, 209-227.

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B., 2012. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.

- Lurati, A.R., 2013. Organophosphate exposure with pseudocholinesterase deficiency. *Workplace Health Saf.* 61, 243-5.
- Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N., Wei, F., 2015. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research* 4, 1-13.
- Machado-Vieira, R., Schmidt, A.P., Ávila, T.T., Kapczinski, F., Soares, J.C., Souza, D.O., Portela, L.V.C., 2004. Increased cerebrospinal fluid levels of S100B protein in rat model of mania induced by ouabain. *Life Sci.* 76, 805-811.
- Mackness, M., Mackness, B., 2015. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene* 567, 12-21.
- Madani, F.Z., Hafida, M., Merzouk, S.A., Loukidi, B., Taouli, K., Narce, M., 2016. Hemostatic, inflammatory, and oxidative markers in pesticide user farmers. *Biomarkers* 21, 138-45.
- Malekirad, A.A., Faghih, M., Mirabdollahi, M., Kiani, M., Fathi, A., Abdollahi, M., 2013. Neurocognitive, Mental Health, and Glucose Disorders in Farmers Exposed to Organophosphorus Pesticides. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 64, 1-8.
- Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., Fait, A., 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: A review, *Toxicology*.
- Maroni, M., Jarvisalo, J., La Ferla, F., 1986. The WHO-UNDP epidemiological study on the health effects of exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol. Lett.* 33, 115-123.
- Martinez - Cayuela, M., 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharm.* 39, 1-13.
- Mastrangelo, G., Marangi, G., Ballarin, M.N., Michilin, S., Fabricio, A.S., Valentini, F., Lange, J.H., Fedeli, U., Cegolon, L., Gion, M., 2011. Osteopontin, asbestos exposure and pleural plaques: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 11, 220.
- Mata-Espinosa, D.A., Hernández-Pando, R., 2008. Interferón gamma: Aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Rev. Investig. Clin.* 60, 421-431.
- Matamoros, A.J., Baas, P.W., 2016. Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Res. Bull.* 126, 217-225.
- Matsushita, N., Hashimoto, E., Tokushige, K., Kodama, K., Tobari, M., Kogiso, T., Torii, N., Taniai, M., Shiratori, K., Murayama, H., 2014. Investigation of Ornithine Carbamoyltransferase as a Biomarker of Liver Cirrhosis. *Intern. Med.* 53, 1249-1257.
- Mayeux, R., 2004. Biomarkers: Potential uses and limitations. *NeuroRX* 1, 182-188.
- McDaniel, C.Y., Dail, M.B., Wills, R.W., Chambers, H.W., Chambers, J.E., 2014. Paraoxonase 1 Polymorphisms Within a Mississippi USA Population as Possible Biomarkers of Enzyme Activities Associated With Disease Susceptibility. *Biochem. Genet.* 52, 509-523.
- McKellar, G.E., McCarey, D.W., Sattar, N., McInnes, I.B., 2009. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 410-7.
- Mecdad, A.A., Ahmed, M.H., ElHalwagy, M.E.A., Afify, M.M.M., 2011. A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticide-sprayers. *Egypt. J. Forensic Sci.* 1, 93-98.

Medina-Díaz, I.M., Rubio-Ortíz, M., Martínez-Guzmán, M.C., Dávalos-Ibarra, R.L., Rojas-García, A.E., Robledo-Marenco, M.L., Barrón-Vivanco, B.S., Girón-Pérez, M.I., Elizondo, G., 2011. Organophosphate pesticides increase the expression of alpha glutathione S-transferase in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 25, 2074-9.

Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.

Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A.M., Abdollahi, M., 2014. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review. *Toxicol. Lett.* 230, 146-156.

Menascu, S., Brezner, A., Tshechmer, S.M., Rumeny, P.G., 2010. Serum biochemical markers for brain damage in children with emphasis on mild head injury. *Pediatr. Neurosurg.* 46, 82-8.

Michalakis, M., Tzatzarakis, M.N., Kovatsi, L., Alegakis, A.K., Tsakalof, A.K., Heretis, I., Tsatsakis, A., 2014. Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicol. Lett.* 230, 139-145.

Milatovic, D., Gupta, R.C., Aschner, M., 2006. Anticholinesterase Toxicity and Oxidative Stress. *Sci. World J.* 6, 295-310.

Miranda-Contreras, L., Gómez-Pérez, R., Rojas, G., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Colmenares, M., Barreto, S., Balza, A., Zavala, L., Morales, Y., Molina, Y., Valeri, L., Contreras, C.A., Osuna, J.A., 2013. Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among venezuelan farm workers. *J. Occup. Health* 55, 195-203.

Mohamed, F., Buckley, N.A., Jayamanne, S., Pickering, J.W., Peake, P., Palangasinghe, C., Wijerathna, T., Ratnayake, I., Shihana, F., Endre, Z.H., 2015. Kidney damage biomarkers detect acute kidney injury but only functional markers predict mortality after paraquat ingestion. *Toxicol. Lett.* 237, 140-150.

Mortada, W.I., Hassanien, M.M., Donia, A.F., Shokeir, A.A., 2015. Application of Cloud Point Extraction for Cadmium in Biological Samples of Occupationally Exposed Workers: Relation Between Cadmium Exposure and Renal Lesion. *Biol. Trace Elem. Res.* 168, 303-310.

Mortada, W.I., Hassanien, M.M., Donia, A.F., Shokeir, A.A., 2001. Study of lead exposure from automobile exhaust as a risk for nephrotoxicity among traffic policemen. *Am. J. Nephrol.* 21, 274-279.

Moser, V.C., Aschner, M., Richardson, R.J., Philbert, M.A., 2013. Toxic responses of the nervous system., en: Klaassen C (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill Professional, New York, pp. 733-766.

Moser, V.C., Stewart, N., Freeborn, D.L., Crooks, J., MacMillan, D.K., Hedge, J.M., Wood, C.E., McMahan, R.L., Strynar, M.J., Herr, D.W., 2015. Assessment of serum biomarkers in rats after exposure to pesticides of different chemical classes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282, 161-174.

Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157-177.

Motsoeneng, P., Dalvie, M., 2015. Relationship between Urinary Pesticide Residue Levels and Neurotoxic Symptoms among Women on Farms in the Western Cape, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 6281-6299.

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

- Murayama, H., Ikemoto, M., Fukuda, Y., Nagata, A., 2008. Superiority of serum type-I arginase and ornithine carbamyltransferase in the detection of toxicant-induced acute hepatic injury in rats. *Clin. Chim. Acta* 391, 31-35.
- Murayama, H., Ikemoto, M., Fukuda, Y., Tsunekawa, S., Nagata, A., 2007. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats. *Clin. Chim. Acta* 375, 63-68.
- Murayama, H., Ikemoto, M., Hamaoki, M., 2009. Ornithine carbamyltransferase is a sensitive marker for alcohol-induced liver injury. *Clin. Chim. Acta* 401, 100-104.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., 2007. *Janeway's Immunobiology*, 7th edition. Garland Science.
- Naidoo, S., London, L., Rother, H., Burdorf, A., Naidoo, R.N., Kromhout, H., 2010. Pesticide safety training and practices in women working in small-scale agriculture in South Africa. *Occup. Environ. Med.* 67, 823-828.
- Naves, R., Bono, M.R., 2002. Citoquinas, en: Palomo G., I., Ferreira V., A., Sepúlveda C., C., Roseblatt S., M., Vergara C., U. (Eds.), *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*. Chile, pp. 209-238.
- Nawrot, T., Geusens, P., Nulens, T.S., Nemery, B., 2010. Occupational cadmium exposure and calcium excretion, bone density, and osteoporosis in men. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1441-1445.
- Neupane, D., Jørs, E., Brandt, L., 2014. Pesticide use, erythrocyte acetylcholinesterase level and self-reported acute intoxication symptoms among vegetable farmers in Nepal: a cross-sectional study. *Environ. Heal.* 13, 98.
- Nishino, R., Fukuyama, T., Tajima, Y., Miyashita, L., Watanabe, Y., Ueda, H., Kosaka, T., 2013. Prior oral exposure to environmental immunosuppressive chemicals methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide aggravates allergic airway inflammation in NC/Nga mice. *Toxicology* 309, 1-8.
- Ntow, W.J., Tagoe, L.M., Drechsel, P., Kelderman, P., Nyarko, E., Gijzen, H.J., 2009. Occupational exposure to pesticides: Blood cholinesterase activity in a farming community in Ghana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 623-630.
- O'Callaghan, J.P., Sriram, K., 2005. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin. Drug Saf.* 4, 433-442.
- Oates, L., Cohen, M., Braun, L., Schembri, A., Taskova, R., 2014. Reduction in urinary organophosphate pesticide metabolites in adults after a week-long organic diet. *Environ. Res.* 132, 105-111.
- Obiols Quinto, J., 2004. NTP 661 : Control biológico de trabajadores expuestos a plaguicidas (II) : técnicas específicas.
- Ogut, S., Gultekin, F., Nesimi Kisioglu, A., Kucukoner, E., 2011. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicol. Ind. Health* 27, 820-825.
- Olea, N., 2003. Más Plaguicidas en Almería.
- OMS, 2010. WHO human health risk assessment toolkit : chemical hazards. IPCS Harmon. Proj. Doc. xv, 87 .
- OMS, FAO, 2014. Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas.
- Onur, S., Niklowitz, P., Jacobs, G., Nöthlings, U., Lieb, W., Menke, T., Döring, F., 2014. Ubiquinol reduces gamma glutamyltransferase as a marker of oxidative stress in humans. *BMC Res. Notes* 7, 427-436.
- Orisakwe, O.E., Nwachukwu, E., Osadolor, H.B., Afonne, O.J., Okocha, C.E., 2007. Liver and kidney function tests amongst paint factory workers in Nkpor, Nigeria. *Toxicol. Ind. Health* 23, 161-5.

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245, 194-205.

Pakravan, N., Shokrzadeh, M., Bari Khalat, M., Shadboorestan, A., 2016. Measurement of cholinesterase enzyme activity before and after exposure to organophosphate pesticides in farmers of a suburb region of Mazandaran, a northern province of Iran. *Hum. Exp. Toxicol.* 35, 297.

Parikh, C.R., Devarajan, P., 2008. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit. Care Med.* 36, S159-S165.

Parrón, T., Hernández, A.F., Pla, A., Villanueva, E., 1996. Clinical and biochemical changes in greenhouse sprayers chronically exposed to pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 957-963.

Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., Alarcón, R., 2014. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol. Lett.* 230, 157-165.

Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., Alarcón, R., 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 379-85.

Parrón Carreño, T., Alarcón Rodríguez, R., Requena Mullor, M. del M., 2009. Resultados y análisis de una década de seguimiento del programa de vigilancia especial de intoxicaciones agudas por plaguicidas en la provincia de almeria (2000-2009).

Pasiani, J.O., Torres, P., Silva, J.R., Diniz, B.Z., Caldas, E.D., 2012. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 3051-3068.

Pathak, M.K., Fareed, M., Bihari, V., Mathur, N., Srivastava, A.K., Kuddus, M., Nair, K.C., 2011. Cholinesterase levels and morbidity in pesticide sprayers in North India. *Occup. Med. (Chic. Ill)*. 61, 512-514.

Pathak, M.K., Fareed, M., Srivastava, A.K., Pangtey, B.S., Bihari, V., Kuddus, M., Kesavachandran, C., 2013. Seasonal variations in cholinesterase activity, nerve conduction velocity and lung function among sprayers exposed to mixture of pesticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 7296-7300.

Patil, J.A., Patil, A.J., Sontakke, A. V, Govindwar, S.P., 2009. Occupational pesticides exposure of sprayers of grape gardens in western Maharashtra (India): effects on liver and kidney function. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 20, 335-355.

Payán-Rentería, R., Garibay-Chávez, G., Rangel-Ascencio, R., Preciado-Martínez, V., Muñoz-Islas, L., Beltrán-Miranda, C., Mena-Munguía, S., Jave-Suárez, L., Feria-Velasco, A., De Celis, R., 2012. Effect of chronic pesticide exposure in farm workers of a Mexico community. *Arch. Environ. Occup. Health* 67, 22-30.

Peila, C., Coscia, A., Bertino, E., Li Volti, G., Galvano, F., Visser, G.H.A., Gazzolo, D., 2017. Holder pasteurization affects S100B concentrations in human milk. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 1-5.

Peltier, M.R., Arita, Y., Klimova, N.G., Gurzenda, E.M., Koo, H.C., Murthy, A., Lerner, V., Hanna, N., 2013. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) enhances placental inflammation. *J. Reprod. Immunol.* 98, 10-20.

Pérez-Parra, J., Céspedes, A., 2009. Tecnología de los invernaderos mediterráneos: evolución de la tecnología en los invernaderos de bajo consumo energético en Almería., XXXVII Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura - Almeria 2007. Madrid.

Permpongpaiboon, T., Nagila, A., Pidetcha, P., Tuangmungsakulchai, K., Tantrarongroj, S., Porntadavity, S., 2011. Decreased paraoxonase 1 activity and increased oxidative stress in low lead-exposed workers. *Hum Exp Toxicol* 30, 1196-1203.

- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D., 2012. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chem. Phys. Lipids* 165, 638-647.
- Podprasart, V., Satayavivad, J., Riengrojpitak, S., Wilairat, P., Wananukul, W., Chavalittumrong, P., Chivapat, S., Yoovathaworn, K., 2007. No direct hepatotoxic potential following a multiple-low dose paraquat exposure in rat as related to its bioaccumulation. *Toxicol. Lett.* 170, 193-202.
- Pohanka, M., 2014. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9809-9825.
- Poręba, R., Gać, P., Poręba, M., Antonowicz-Juchniewicz, J., Andrzejak, R., 2011. Relation between occupational exposure to lead, cadmium, arsenic and concentration of cystatin C. *Toxicology* 283, 88-95.
- Prakasam, A., Sethupathy, S., Lalitha, S., 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin. Chim. Acta* 310, 107-112.
- Proskocil, B., Lein, P., Jacoby, D., Fyer, A., 2014. Organophosphorus pesticides directly simulate macrophages to increase expression of growth factors and cytokines. *Eur. Respir. J.* 44, P4779.
- Quandt, S.A., Pope, C.N., Chen, H., Summers, P., Arcury, T.A., 2015. Longitudinal Assessment of Blood Cholinesterase Activities Over 2 Consecutive Years Among Latino Nonfarmworkers and Pesticide-Exposed Farmworkers in North Carolina. *J. Occup. Environ. Med.* 57, 851-7.
- Raica, M., Cimpean, A.M., 2010. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals* 3, 572-599.
- RamaRao, G., Acharya, J.N., Bhattacharya, B.K., 2011. Changes of protein oxidation, calpain and cytoskeletal proteins (alpha tubulin and pNF-H) levels in rat brain after nerve agent poisoning. *Toxicol. Lett.* 203, 227-236.
- Ranjbar, A., Pasalar, P., Abdollahi, M., 2002a. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 179-182.
- Ranjbar, A., Pasalar, P., Sedighi, A., Abdollahi, M., 2002b. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicol. Lett.* 131, 191-4.
- Rastogi, S.K., Satyanarayan, P.V. V, Ravishankar, D., Tripathi, S., 2009. A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. *Indian J. Occup. Environ. Med.* 13, 131-4.
- Reiner, E., Radic, Z., 1985. Method for measuring human plasma paraoxonase activity. Course on analytical procedures for assessment of exposure to organophosphorus pesticides, en: *Manual of Analytical Methods*. Cremona, Italy, pp. 62-70.
- Remor, A.P., Totti, C.C., Moreira, D.A., Dutra, G.P., Heuser, V.D., Boeira, J.M., 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Int.* 35, 273-278.
- Richter, R.J., Furlong, C.E., 1999. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenet. Genomics* 9, 745-754.
- Roberts, D.M., Wilks, M.F., Roberts, M.S., Swaminathan, R., Mohamed, F., Dawson, A.H., Buckley, N.A., 2011. Changes in the concentrations of creatinine, cystatin C and NGAL in patients with acute paraquat self-poisoning. *Toxicol. Lett.* 202, 69-74.

Roberts, R.A., Aschner, M., Calligaro, D., Guilarte, T.R., Hanig, J.P., Herr, D.W., Hudzik, T.J., Jeromin, A., Kallman, M.J., Liachenko, S., Lynch, J.J., Miller, D.B., Moser, V.C., O'Callaghan, J.P., Slikker, W., Paule, M.G., 2015. Translational biomarkers of neurotoxicity: A health and environmental sciences institute perspective on the way forward. *Toxicol. Sci.* 148, 332-340.

Rohitrattana, J., Siriwong, W., Tunsaringkarn, T., Panuwet, P., Ryan, P.B., Barr, D.B., Robson, M.G., Fiedler, N., 2014. Organophosphate pesticide exposure in school-aged children living in rice and aquacultural farming regions of Thailand. *J. Agromedicine* 19, 406-16.

Rohlman, D.S., Ismail, A.A., Abdel-Rasoul, G., Lasarev, M., Hendy, O., Olson, J.R., 2014. Characterizing exposures and neurobehavioral performance in Egyptian adolescent pesticide applicators. *Metab. Brain Dis.* 29, 845-55.

Rojas-Garcia, A.E., Medina-Diaz, I.M., Robledo-Marengo Mde, L., Barron-Vivanco, B.S., Giron-Perez, M.I., Velazquez-Fernandez, J.B., Gonzalez-Arias, C.A., Albores-Medina, A., Quintanilla-Vega, B., Ostrosky-Wegman, P., Rojas-Garcia, M.C., Perez-Herrera, N.E., Lopez-Flores, J.F., 2011. Hematological, biochemical effects, and self-reported symptoms in pesticide retailers. *J Occup Env. Med* 53, 517-521.

Romagnani, S., 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15, 121-129.

Rupérez, A.I., López-Guarnido, O., Gil, F., Olza, J., Gil-Campos, M., Leis, R., Tojo, R., Cañete, R., Gil, A., Aguilera, C.M., 2013. Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. *Br. J. Nutr.* 110, 1639-1647.

Sahlander, K., Larsson, K., Palmberg, L., 2010. Altered innate immune response in farmers and smokers. *Innate Immun.* 16, 27-38.

Samsuddin, N., Rampal, K.G., Ismail, N.H., Abdullah, N.Z., Nasreen, H.E., 2016. Pesticide Exposure and Cardiovascular Hemodynamic Parameters among Male Workers Involved in Mosquito Control in East Coast of Malaysia. *Am. J. Hypertens.* 29, 226-233.

Sánchez Rodríguez, J., Soriano Suárez, E., Girona Bastús, R., Pérez Muñoz, P., Viñets Gelada, C., 2002. ¿Por qué aumentan las fosfatasas alcalinas? *Atención Primaria* 29, 241-245.

Sanna, M.D., Peroni, D., Mello, T., Ghelardini, C., Quattrone, A., Galeotti, N., 2016. Increase of neurofilament-H protein in sensory neurons in antiretroviral neuropathy: Evidence for a neuroprotective response mediated by the RNA-binding protein HuD. *Pharmacol. Res.* 111, 23-33.

Sapbamrer, R., Nata, S., 2014. Health symptoms related to pesticide exposure and agricultural tasks among rice farmers from northern Thailand. *Environ. Health Prev. Med.* 19, 12-20.

Scher, D.P., Alexander, B.H., Adgate, J.L., Eberly, L.E., Mandel, J.S., Acquavella, J.F., Bartels, M.J., Brzak, K. a, 2007. Agreement of pesticide biomarkers between morning void and 24-h urine samples from farmers and their children. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 17, 350-7.

Schmitt, A., Bertsch, T., Henning, U., Tost, H., Klimke, A., Henn, F.A., Falkai, P., 2005. Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: Negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr. Res.* 80, 305-313.

Seldén, A.I., Lundholm, C., Johansson, N., Wingfors, H., 2008. Polychlorinated biphenyls (PCB), thyroid hormones and cytokines in construction workers removing old elastic sealants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 99-106.

Serhatlioglu, S., Gursu, M.F., Gulcu, F., Canatan, H., Godekmerdan, A., 2003. Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. *Cell Biochem. Funct.* 21, 371-375.

- Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Jalali, N., Abdollahi, M., 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum. Exp. Toxicol.* 24, 439-45.
- Shahmohamadnejad, S., Vaisi-Raygani, A., Shakiba, Y., Kiani, A., Rahimi, Z., Bahrehmand, F., Shakiba, E., Pourmotabbed, T., 2015. Association between butyrylcholinesterase activity and phenotypes, paraoxonase192 rs662 gene polymorphism and their enzymatic activity with severity of rheumatoid arthritis: Correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress, preliminary. *Clin. Biochem.* 48, 63-69.
- Sharma, R.K., Upadhyay, G., Siddiqi, N.J., Sharma, B., RK, S., Upadhyay, G., NJ, S., Sharma, B., Sharma, R.K., Upadhyay, G., Siddiqi, N.J., Sharma, B., 2013. Pesticides-induced biochemical alterations in occupational North Indian suburban population. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 1213-27.
- Shaw, G., 2015. *The Use and Potential of pNF-H as a General Blood Biomarker of Axonal Loss: An Immediate Application for CNS Injury, Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* Boca Raton (FL).
- Shayeghi, M., Nasirian, H., Nourjah, N., Baniardela, M., Shayeghi, F., Aboulhassa, M., 2009. Cholinesterase Activity Among Spray Workers in Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.* 12, 696-701.
- Shelley, R., Kim, N., Parsons, P., Lee, B.-K., Jaar, B., Fadrowski, J., Agnew, J., Matanoski, G.M., Schwartz, B.S., Steuerwald, A., Todd, A., Simon, D., Weaver, V.M., 2012. Associations of multiple metals with kidney outcomes in lead workers. *Occup. Environ. Med.* 69, 727-735.
- Sicinska, P., Bukowska, B., Pajak, A., Koceva-Chyla, A., Pietras, T., Nizinkowski, P., Gorski, P., Koter-Michalak, M., 2017. Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Med. Sci.* 13.
- Siddharth, M., Datta, S.K., Bansal, S., Mustafa, M., Banerjee, B.D., Kalra, O.P., Tripathi, A.K., 2012. Study on organochlorine pesticide levels in chronic kidney disease patients: Association with estimated glomerular filtration rate and oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 26, 241-247.
- Siek, T.J., Rieders, F., 1984. Determination of carboxyhemoglobin in the presence of other blood hemoglobin pigments by visible spectrophotometry. *J. Forensic Sci.* 29, 39-54.
- Simoniello, M.F., Kleinsorge, E.C., Carballo, M.A., 2010a. Biochemical evaluation on rural workers exposed to pesticides. *Medicina (B. Aires).* 70, 489-98.
- Simoniello, M.F., Kleinsorge, E.C., Scagnetti, J.A., Mastandrea, C., Grigolato, R.A., Paonessa, A.M., Carballo, M.A., 2010b. Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* 15, 52-60.
- Sindi, R.A., Harris, W., Arnott, G., Flaskos, J., Lloyd Mills, C., Hargreaves, A.J., 2016. Chlorpyrifos- and chlorpyrifos oxon-induced neurite retraction in pre-differentiated N2a cells is associated with transient hyperphosphorylation of neurofilament heavy chain and ERK 1/2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 308, 20-31.
- Singh, A.K., Loscalzo, J., 2014. *The Brigham Intensive Review of Internal Medicine, Second Edi.* ed. Oxford University Press.
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Rai, A., 2012. Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 741, 101-108.

Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Chandna, S., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L., Rai, A., 2011a. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 278-285.

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

Singh, S., Kumar, V., Vashisht, K., Singh, P., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Rai, A., 2011c. Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6, and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257, 84-92.

Singh, V.K., Jyoti, Reddy, M.M.K., Kesavachandran, C., Rastogi, S.K., Siddiqui, M.K.J., 2007. Biomonitoring of organochlorines, glutathione, lipid peroxidation and cholinesterase activity among pesticide sprayers in mango orchards. *Clin. Chim. Acta* 377, 268-272.

Singleton, S.T., Lein, P.J., Dadson, O.A., McGarrigle, B.P., Farahat, F.M., Farahat, T., Bonner, M.R., Fenske, R.A., Galvin, K., Lasarev, M.R., Anger, W.K., Rohlman, D.S., Olson, J.R., 2015. Longitudinal assessment of occupational exposures to the organophosphorous insecticides chlorpyrifos and profenofos in Egyptian cotton field workers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 203-211.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Neiman, T.A., 2001. *Principios de Análisis Instrumental*.

Sogorb, M.A., Estévez, J., Vilanova, E., 2014. Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics, en: Gupta, R.C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press Oxford, UK, pp. 965-973. Sogorb M.A., Vilanova E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.* 128(1-3): 215-228

Sosan, M.B., Akingbohunge, A.E., Durosini, M.A., Ojo, I.A.O., 2010. Erythrocyte Cholinesterase Enzyme Activity and Hemoglobin Values in Cacao Farmers of Southwestern Nigeria as Related to Insecticide Exposure. *Arch. Environ. Occup. Health* 65, 27-33.

Sözmen, E.Y., Mackness, B., Sözmen, B., Durrington, P., Girgin, F.K., Aslan, L., Mackness, M., 2002. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 247-252.

Sreeram, M., Suryakar, A.N., Dani, N.H., 2015. Is gamma-glutamyl transpeptidase a biomarker for oxidative stress in periodontitis? *J. Indian Soc. Periodontol.* 19, 150-4.

Sridhar, G.R., Rao, A.A., Srinivas, K., Nirmala, G., Lakshmi, G., Suryanarayana, D., Nageswara Rao, P. V., Kaladhar, D.G.S.V.G.L., Kumar, S.V., Devi, T.U., Nitesh, T., Hanuman, T., 2010. Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome. *Med. Hypotheses* 75, 648-651.

Sridhar, G.R., Thota, H., Allam, A.R., Suresh Babu, C., Siva Prasad, A., Divakar, C., 2006. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: the cholinesterase connection? *Lipids Health Dis.* 5, 28.

Strelitz, J., Engel, L.S., Keifer, M.C., 2014. Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers. *Occup. Environ. Med.* 71, 842-7.

Sumitani, M., Ogata, T., Natori, A., Hozumi, J., Shimojo, N., Kida, K., Yamauchi, H., Yamauchi, T., 2016. Poor efficacy of the phosphorylated high-molecular-weight neurofilament heavy subunit serum level, a biomarker of axonal damage, as a marker of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Biomed. reports* 4, 758-760.

- Sunay, S.Z., Kayaaltı, Z., Bayrak, T., Söylemezoğlu, T., 2015. Effect of paraoxonase 1 192 Q/R polymorphism on paraoxonase and acetylcholinesterase enzyme activities in a Turkish population exposed to organophosphate. *Toxicol. Ind. Health* 31, 1061-8.
- Sutoluk, Z., Kecec, Z., Daglioglu, N., Hant, I., 2011. Association of Chronic Pesticide Exposure with Serum Cholinesterase Levels and Pulmonary Functions. *Arch. Environ. Occup. Health* 66, 95-99.
- Tagliari, B., Dos Santos, T.M., Cunha, A.A., Lima, D.D., Delwing, D., Sitta, A., Vargas, C.R., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., 2010. Chronic variable stress induces oxidative stress and decreases butyrylcholinesterase activity in blood of rats. *J. Neural Transm.* 117, 1067-1076.
- Takahashi, K., Isobe, T., Ohtsuki, Y., Sonobe, H., Takeda, I., Akagi, T., 1984. Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. *Am. J. Pathol.* 116, 497-503.
- Takeuchi, S., Matsuda, T., Kobayashi, S., Takahashi, T., Kojima, H., 2006. In vitro screening of 200 pesticides for agonistic activity via mouse peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR γ and quantitative analysis of in vivo induction pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 235-244.
- Taub, D.D., Oppenheim, J.J., 1994. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther. Immunol.* 1, 229-46.
- Theoharides, T.C., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., Delivanis, D.A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., Kalogeromitros, D., 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 21-33.
- Thetkathuek, A., Suybros, N., Daniell, W., Meepradit, P., Jaidee, W., 2014. Factors influencing poisoning symptoms: a case study of vegetable farmers exposed to mixed insecticides in Prek Balatchheng Village, Cambodia. *J. Agromedicine* 19, 337-45.
- Thomas, G.A., Delaney, L.J., Mueller, C., Page, E., 2010. Evaluation of coumaphos exposure among tick eradication workers. *J. Occup. Environ. Med.* 52, 131-6.
- Tolón Becerra, A., Lastra Bravo, X., 2010. La agricultura intensiva del poniente almeriense. *Diagnóstico e instrumentos de gestión ambiental. M+A. Rev. Electrónica Medioambiente* 8, 1-22.
- Tong, V., 2005. Valproic Acid II: Effects on Oxidative Stress, Mitochondrial Membrane Potential, and Cytotoxicity in Glutathione-Depleted Rat Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 86, 436-443.
- Townend, W., Dibble, C., Abid, K., Vail, A., Sherwood, R., Lecky, F., 2006. Rapid elimination of protein S-100B from serum after minor head trauma. *J. Neurotrauma* 23, 149-155.
- Trof, R.J., Di Maggio, F., Leemreis, J., Groeneveld, A.B.J., 2006. Biomarkers of Acute Renal Injury and Renal Failure. *Shock* 26, 245-253.
- Tsatsakis, A.M., Barbounis, M.G., Kavalakis, M., Kokkinakis, M., Terzi, I., Tzatzarakis, M.N., 2010. Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of Exposure to organophosphate pesticides. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 1246-1252.
- Tsatsakis, A.M., Christakis-Hampsas, M., Liesivuori, J., 2012. The increasing significance of biomonitoring for pesticides and organic pollutants. *Toxicol. Lett.* 210, 107-109.
- Turay, J., Grniaková, V., Valka, J., 2000. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp. Clin. Res.* 26, 83-8.

Ucar, H., Gur, M., Gozukara, M.Y., Kalkan, G.Y.G.Y., Baykan, A.O., Turkoglu, C., Kaypakl, O., Seker, T., Sen, O., Selek, S., Cayl, M., Uçar, H., Gür, M., Gözükar, M.Y., Kalkan, G.Y.G.Y., Baykan, A.O., Türkoğlu, C., Kaypakl, O., Şeker, T., Şen, Ö., Selek, Ş., Çayl, M., Ucar, H., Gur, M., Gozukara, M.Y., Kalkan, G.Y.G.Y., Baykan, A.O., Turkoglu, C., Kaypakl, O., Seker, T., Sen, O., Selek, S., Cayl, M., 2015. Gamma glutamyl transferase activity is independently associated with oxidative stress rather than SYNTAX score. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 75, 7-12.

Ueyama, J., Saito, I., Kamijima, M., Nakajima, T., Gotoh, M., Suzuki, T., Shibata, E., Kondo, T., Takagi, K., Miyamoto, K., Takamatsu, J., Hasegawa, T., Takagi, K., 2006. Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorus pesticides using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 832, 58-66.

Ueyama, J., Saito, I., Kondo, T., Taki, T., Kimata, A., Saito, S., Ito, Y., Murata, K., Iwata, T., Gotoh, M., Shibata, E., Wakusawa, S., Kamijima, M., 2012. Urinary concentrations of organophosphorus insecticide metabolites in Japanese workers. *Chemosphere* 87, 1403-1409.

Ueyama, J., Satoh, T., Kondo, T., Takagi, K., Shibata, E., Goto, M., Kimata, A., Saito, I., Hasegawa, T., Wakusawa, S., Kamijima, M., 2010. β -Glucuronidase activity is a sensitive biomarker to assess low-level organophosphorus insecticide exposure. *Toxicol. Lett.* 193, 115-119.

Vaidya, V.S., Ferguson, M.A., Bonventre, J. V., 2008. Biomarkers of acute kidney injury: early diagnosis, pathogenesis, and recovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 463-493.

Verplanke, A.J.W., Bloemen, L.J., Brouwer, E.J., Van Sittert, N.J., Boogaard, P.J., Herber, R.F.M., Wolff, F.A. De, 2000. Occupational exposure to cis-1,3-dichloropropene: biological effect monitoring of kidney and liver function. *Occup. Environ. Med.* 57, 745-751.

Wadey, R.M., Pinches, M.G., Jones, H.B., Riccardi, D., Price, S. a, 2013. Tissue Expression and Correlation of a Panel of Urinary Biomarkers Following Cisplatin-induced Kidney Injury. *Toxicol. Pathol.* 1-12.

Wafa, T., Nadia, K., Amel, N., Ikb, C., Insaf, T., Asma, K., Hedi, M.A., Mohamed, H., 2013. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. *J. Environ. Sci. Health. B.* 48, 1058-69.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45-65.

Walz, R., Portela, L. V, Tort, A.B., Neto, E.C., Fernandes, L.N., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., 2000. Serum S100B levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology* 54, 2021-2.

Wang, F., Sobel, E.S., Butfiloski, E.J., Roberts, S.M., 2008. Comparison of chlordecone and estradiol effects on splenic T-cells in (NZB \times NZW) F1 mice. *Toxicol. Lett.* 183, 1-9.

Wang, T., Jia, G., Zhang, J., Ma, Y., Feng, W., Liu, L., Zhang, N., Yan, L., Wang, X., Zhang, X., Liu, Z., Du, X., Zhen, S., 2011. Renal impairment caused by chronic occupational chromate exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 84, 393-401.

Wang, W., Xu, X., Fan, C.Q., 2015. Health hazard assessment of occupationally di-(2-ethylhexyl)-phthalate-exposed workers in China. *Chemosphere* 120, 37-44.

Weaver, V.M., Jaar, B.G., Schwartz, B.S., Todd, A.C., Ahn, K.-D., Lee, S.-S., Wen, J., Parsons, P.J., Lee, B.-K., 2005. Associations among lead dose biomarkers, uric acid, and renal function in Korean lead workers. *Environ. Health Perspect.* 113, 36-42.

- Weaver, V.M., Kim, N.-S., Jaar, B.G., Schwartz, B.S., Parsons, P.J., Steuerwald, A.J., Todd, A.C., Simon, D., Lee, B.-K., 2011. Associations of low-level urine cadmium with kidney function in lead workers. *Occup. Environ. Med.* 68, 250-256.
- Wei, L., Ye, X., Pei, X., Wu, J., Zhao, W., 2015. Diagnostic accuracy of serum cystatin C in chronic kidney disease: a meta-analysis. *Clin. Nephrol.* 84, 86-94.
- Weiner, L., Kreimer, D., Roth, E., Silman, I., 1994. Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten-globule-like state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 915-22.
- Whittaker, M., 1983. Cholinesterases, en: Bergmeyer, H., Bergmeyer, J., Grassi, M. (Eds.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. IV. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 52-74.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288, 73-90.
- Wright, G., Terada, K., Yano, M., Sergeev, I., Mori, M., 2001. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp. Cell Res.* 263, 107-17.
- Wrońska-Nofer, T., Pisarska, A., Trzcinka-Ochocka, M., Hałatek, T., Stetkiewicz, J., Braziewicz, J., Nofer, J.-R., Wąsowicz, W., 2015. Scintigraphic assessment of renal function in steel plant workers occupationally exposed to lead. *J. Occup. Health* 57, 91-99.
- Xie, S.-H., Liu, A.-L., Chen, Y.-Y., Zhang, L., Zhang, H.-J., Jin, B.-X., Lu, W.-Q.W.-H., Li, X.-Y., Lu, W.-Q.W.-H., 2010. DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during drinking water treatment in a waterworks in China. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 229-35.
- Yan, J., Li, Y. -r., Zhang, Y., Lu, Y., Jiang, H., 2014. Repeated Exposure to Anesthetic Ketamine Can Negatively Impact Neurodevelopment in Infants: A Prospective Preliminary Clinical Study. *J. Child Neurol.* 29, 1333-1338.
- Yang, X., Schnackenberg, L.K., Shi, Q., Salminen, W.F., 2014. Hepatic toxicity biomarkers, en: Gupta, R.C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier Inc., pp. 241-259.
- Yardan, T., Cevik, Y., Donderici, O., Kavalci, C., Yilmaz, F.M., Yilmaz, G., Vural, K., Yuzbasioglu, Y., Gunaydin, Y.K., Sezer, A.A., 2009. Elevated serum S100B protein and neuron-specific enolase levels in carbon monoxide poisoning. *Am. J. Emerg. Med.* 27, 838-842.
- Ye, M., Beach, J., Martin, J.W., Senthilselvan, A., 2013. Occupational pesticide exposures and respiratory health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 6442-6471.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944-5972.
- Yilmaz, F.M., Yilmaz, H., Tutkun, E., Uysal, S., Carman, K.B., Dilber, C., Ercan, M., Yilmaz, F.M., Yilmaz, H., Tutkun, E., Uysal, S., Carman, K.B., Dilber, C., Ercan, M., 2014. Serum biochemical markers of central nerve system damage in children with acute elemental mercury intoxication. *Clin. Toxicol.* 52, 32-38.
- Yu, Y., Jin, H., Holder, D., Ozer, J.S., Villarreal, S., Shughrue, P., Shi, S., Figueroa, D.J., Clouse, H., Su, M., Muniappa, N., Troth, S.P., Bailey, W., Seng, J., Aslamkhan, A.G., Thudium, D., Sistare, F.D., Gerhold, D.L., 2010. Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat. Biotechnol.* 28, 470-477.
- Zepeda-Arce, R., Rojas-García, A.E., Benitez-Trinidad, A., Herrera-Moreno, J.F., Medina-Díaz, I.M., Barrón-Vivanco, B.S., Villegas, G.P., Hernández-Ochoa, I., Sólis Heredia, M. de J., Bernal-Hernández, Y.Y., 2017. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. *Environ. Toxicol.* 1-11.

Zetterberg, H., Smith, D.H., Blennow, K., 2013. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 201-10.

Zhang, X., Driver, J.H., Li, Y., Ross, J.H., Krieger, R.I., 2008. Dialkylphosphates (DAPs) in fruits and vegetables may confound biomonitoring in organophosphorus insecticide exposure and risk assessment. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10638-10645.

Zhang, X., Sui, H., Li, H., Zheng, J., Wang, F., Li, B., Zhang, Y., 2014. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in northern Han Chinese workers exposed to organophosphate pesticides. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 239, 232-9.

Zhang, Y., Birru, R., Di, Y.P., 2014. Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system., en: Keohavong, P., Grant, S.G. (Eds.), *Molecular Toxicology Protocols, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. pp. 43-57.

Zhu, B., Liu, L., Gong, Y.X., Ling, F., Wang, G.X., 2014. Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13625-13635.

Zúñiga-Venegas, L., Aquea, G., Taborda, M., Bernal, G., Pancetti, F., 2015. Determination of the Genotype and Phenotype of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Status in a Group of Agricultural and Nonagricultural Workers in the Coquimbo Region, Chile. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 78, 357-368.

Žurek, J., Fedora, M., 2012. The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. *Acta Neurochir. (Wien)*. 154, 93-103; discussion 103.

Anexo

CUESTIONARIO CLÍNICO LABORAL

Nº Ref: _____

Fecha: ___/___/2011

CUESTIONARIO CLÍNICO LABORAL:

Aplicadores de Plaguicidas

1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS:

Apellidos: _____ Nombre: _____

Sexo: Hombre Mujer Nacionalidad: _____

¿Padece alguna enfermedad en la actualidad? Si No
¿Cual? _____ ¿Desde hace cuánto tiempo? _____

2. HISTORIA CLÍNICA

Exploración clínica específica

Peso: _____ kg Talla: _____ cm Índice de Quetelet: _____

Exploración cutánea/mucosa:

	Sí	No
Dermatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sudoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Palidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cianosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Miosis/Midriasis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lagrimeo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Exploración neurológica:

Pérdida de fuerzas (especificar localización)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pérdida de sensibilidad (especificar localización)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiporreflexia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperreflexia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Temblor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fasciculaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Focalidad de pares craneales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alteración cognitiva:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Diga los días de la semana en sentido inverso		
▪ ¿En qué año estamos? ¿En qué día?		
▪ Diga los números pares		

Exploración circulatoria:

Tensión arterial (especificar)	TAS _____	TAD _____
Frecuencia cardíaca (especificar)	Pulso _____	
Arritmia cardíaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Exploración respiratoria:

Sibilancias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Roncus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crepitantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Exploración abdominal:

Dolor abdominal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
-----------------	--------------------------	--------------------------

Defensa
Megalias (especificar)

Otras alteraciones (especificarlas a continuación):

Escala de ansiedad (A):

1. ¿Se ha sentido muy excitado, nervioso o en tensión?
2. ¿Ha estado muy preocupado por algo?
3. ¿Se ha sentido muy irritable?
4. ¿Ha tenido dificultad para relajarse?

Escala de depresión (D):

1. ¿Se ha sentido con poca energía?
2. ¿Ha perdido el interés por las cosas?
3. ¿Ha perdido la confianza en si mismo?
4. ¿Se ha sentido desesperanzado, sin esperanzas?

3. HISTORIA LABORAL (anamnesis laboral)

b) Ocupación actual (exposición actual al riesgo)

PLAGUICIDAS más frecuentemente utilizados en el **último mes**:

MES DEL AÑO	NOMBRE COMERCIAL	CANTIDAD (kg, litros)	HORAS aplicando	TIPO de aplicación	CULTIVO
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

c) Análisis de riesgos:

Utiliza ropa exclusiva para aplicación (EPIs): Siempre Nunca A veces
¿Lee la etiqueta de los productos? Siempre Nunca A veces

¿Utiliza alguna de las siguientes medidas de protección personal?

Protección dermica: Guantes Peto Capucha Zapatos, botas
Traje impermeabilizado Ninguna

Protección respiratoria: Mascarilla de filtro Mascarilla de cartucho Ninguna

Protección ocular: Gafas Pantalla facial Ninguna

La protección (EPIs) la utiliza: al preparar el caldo al aplicar el plaguicida Nunca

¿Se cambia de ropa en el campo al finalizar la aplicación?: Si No

¿Lava la ropa de aplicación separada del resto?: Si No

¿Come, bebe, fuma durante la jornada de aplicación?: Si No

¿Se lava en el campo al finalizar la aplicación?: Si No

¿Qué hace con el sobrante de plaguicidas? Lo elimina a:

Red de saneamiento Red de riego Río Agua estancada
Lo derrama en el campo Lo entierra en fosa de vertidos
Lo guarda para otra ocasión
Otros (especificar) _____

¿Qué hace con el envase vacío de plaguicidas?

Lo recicla para otro uso Lo perfora y tira Lo quema
Lo tira a la basura Tiene contratada una empresa de gestión de envases

e) Cuestionario básico de DIETA (hábitos nutricionales)

¿Sigue algún tipo de régimen en la actualidad? No Sí Especificar _____

¿Cuántas veces por semana come los siguientes alimentos?:

Carne: blanca _____ (pollo, gallina, cerdo) roja _____ (ternera, vaca)

Embutidos _____

Pescado blanco _____

Pescado azul _____ pequeño _____ grande _____

Verduras frescas _____ (tomates, lechugas, pimientos, berenjenas, etc.)

Verduras cocinadas _____

Legumbres _____ (garbanzos, lentejas, judías, etc.)

Lácteos: leche _____ queso _____ yogur _____

Huevos: _____

Alimentos en conserva: _____ atún _____ sardinas _____ otros _____

Pan: _____ (raciones de ~250 gramos) Bollería: _____

¿Cuántas piezas de fruta come al día?: _____ ¿La lava en caso de no pelarla? Sí No

¿Toma zumo de frutas? Sí No ¿Cuántos vasos (200 ml) al día? _____

Nº Ref:

Fecha: ___/___/2012

CUESTIONARIO CLÍNICO LABORAL: Controles (no expuestos a plaguicidas)

Apellidos: _____ Nombre: _____

1. HISTORIA CLÍNICA: *Anamnesis*

¿Padece alguna enfermedad en la actualidad? Sí No

¿Le ha aparecido en el **último año** alguno de los siguientes síntomas **más de 2 días** seguidos?:

	Sí	No
Dermatológicos:		
Picor o escozor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enrojecimiento de la piel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neurológicos:		
Astenia (cansancio, sentirse sin fuerzas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolor de cabeza (cefalea)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mareo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hormigueo extremidades (parestias)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Calambres	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Temblor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fatiga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Debilidad muscular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pérdida de conciencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Convulsiones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alteración del sueño	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Depresión	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cambio de carácter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nerviosismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oculares:		
Visión borrosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lagrimo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enrojecimiento de los ojos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Picor, escozor de los ojos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cardiorrespiratorios:		
Palpitaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dificultad para respirar (disnea)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Expectoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dolor torácico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ruidos respiratorios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Digestivos:		
Naúseas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vómitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Salivación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Molestias al tragar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolor abdominal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diarrea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estreñimiento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Otros síntomas (especificarlos a continuación):

Escala de ansiedad (A):

5. ¿Se ha sentido muy excitado, nervioso o en tensión?
6. ¿Ha estado muy preocupado por algo?
7. ¿Se ha sentido muy irritable?
8. ¿Ha tenido dificultad para relajarse?

Escala de depresión (D):

5. ¿Se ha sentido con poca energía?
6. ¿Ha perdido el interés por las cosas?
7. ¿Ha perdido la confianza en sí mismo?
8. ¿Se ha sentido desesperanzado, sin esperanzas?

Exploración clínica específica

Peso: _____ kg

Talla: _____ cm

Exploración cutánea/mucosa:

	Sí	No
Dermatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sudoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Palidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cianosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Miosis/Midriasis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lagrimo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Exploración neurológica:

Pérdida de fuerzas (especificar localización)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pérdida de sensibilidad (especificar localización)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiporreflexia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperreflexia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Temblor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fasciculaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Focalidad de pares craneales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alteración cognitiva:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Diga los días de la semana en sentido inverso		

- ¿En qué año estamos? ¿En qué día?
- Diga los números pares

Exploración circulatoria:

Tensión arterial (especificar) TAS _____ TAD _____
 Frecuencia cardíaca (especificar) Pulso: _____ lat/min
 Arritmia cardíaca

Exploración respiratoria:

Sibilancias
 Roncus
 Crepitantes

Exploración abdominal:

Dolor abdominal
 Defensa
 Megalias (especificar)

Otras alteraciones (especificarlas a continuación):

3. Cuestionario básico de DIETA (hábitos nutricionales)

¿Sigue algún tipo de régimen en la actualidad? No Sí Especificar _____

¿Cuántas veces por semana come los siguientes alimentos?:

Carne: blanca _____ (pollo, gallina, cerdo) roja _____ (ternera, vaca)
 Embutidos _____
 Pescado blanco _____
 Pescado azul _____ pequeño _____ grande _____
 Verduras frescas _____ (tomates, lechugas, pimientos, berenjenas, etc.)
 Verduras cocinadas _____
 Legumbres _____ (garbanzos, lentejas, judías, etc.)
 Lácteos: leche _____ queso _____ yogur _____
 Huevos: _____
 Alimentos en conserva: _____ atún _____ sardinas _____ otros _____
 Pan: _____ (raciones de ~250 gramos) Bollería: _____

¿Cuántas piezas de fruta come al día?: _____ ¿La lava en caso de no pelarla? Sí No

¿Toma zumo de frutas? Sí No ¿Cuántos vasos (200 ml) al día?
