

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina

Dpto. de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE
SUSCEPTIBILIDAD A LA TOXICIDAD DE PLAGUICIDAS**

ANTONIO GÓMEZ-MARTÍN

GRANADA 2017

Programa de Doctorado

Medicina Clínica y Salud Pública

Codirectores

Prof. Dr. Antonio Hernández Jerez (UGR)

Prof. Dr. José Antonio Lorente Acosta (UGR y GENYO)

Dr. Luis Javier Martínez González (GENYO)

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Antonio Gómez Martín

ISBN: 978-84-9163-654-0

URI: <http://hdl.handle.net/10481/48764>

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS	15
LISTAS DE IMÁGENES, FIGURAS Y TABLAS	17
Lista de Imágenes	17
Lista de Figuras	17
Lista de Tablas	20
I INTRODUCCIÓN	23
I.A Uso de plaguicidas en agricultura	23
I.B Efectos en salud por exposición a plaguicidas	27
I.C Indicadores biológicos de exposición y efecto a plaguicidas	30
I.D Biotransformación de plaguicidas y biomarcadores de susceptibilidad	31
I.E Polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de plaguicidas	34
I.E.1 <i>Butirilcolinesterasa</i>	37
I.E.2 <i>Paraoxonasa 1</i>	49
I.E.3 <i>Citocromos P450</i>	55
I.E.4 <i>Glutatión S-Transferasa</i>	67
I.F Aductos de ADN como biomarcadores de daño genotóxico	75
II JUSTIFICACIÓN	77
III OBJETIVOS	79
III.A Objetivos generales	79
III.B Objetivos específicos	79
OBJECTIVES	81
General objectives	81
Specific objectives	81

IV MATERIAL Y MÉTODOS	83
IV.A Población de estudio.....	83
IV.A.1 Exposición a plaguicidas.....	83
IV.A.2 Periodo de exposición a plaguicidas.....	84
IV.A.3 Origen poblacional.....	84
IV.A.4 Tipo de plaguicidas más frecuentemente utilizados.....	85
IV.A.5 Sujetos para determinación de aductos N7-MedG.....	86
IV.B Tipo de muestras.....	86
IV.B.1 Toma de muestra.....	86
IV.B.2 Extracción de ADN.....	86
IV.B.3 Cuantificación de ADN.....	88
IV.C Genotipado.....	91
IV.C.1 Tecnología TaqMan®.....	91
IV.C.2 Detección de SNPs.....	95
IV.C.3 Componentes y Cantidades de PCR.....	102
IV.C.4 Condiciones de PCR.....	107
IV.C.5 Productos TaqMan® SNP Genotyping Assays.....	108
IV.C.6 Instrumental y Software.....	120
IV.C.7 Detección de Copy Number Variant (CNV).....	125
IV.D Determinación de aductos N7-MedG en el ADN.....	141
IV.D.1 Immunoslot blot (ISB).....	141
IV.E Análisis estadístico.....	149
IV.E.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.....	149
IV.E.2 Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).....	149
IV.E.3 Desequilibrio de ligamiento (LD).....	149
IV.E.4 Haplotipos.....	149
IV.E.5 Modelos mixtos.....	151
IV.E.6 Estructura Poblacional.....	151
V RESULTADOS	155
V.A Análisis descriptivo de la población de estudio.....	155
V.A.1 Sujetos de estudio.....	155
V.A.2 Variables sociodemográficas y antropométricas.....	159
V.B Genotipado de las muestras de estudio.....	166

V.B.1 Frecuencias Alélicas.....	166
V.B.2 Frecuencias Genotípicas	168
V.B.3 Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).....	175
V.B.4 Desequilibrio de ligamiento (LD).....	176
V.B.5 Haplotipos.....	179
V.C Estudio comparativo con otras poblaciones.....	180
V.D Determinación de aductos N7-MedG en el ADN.....	193
V.E Análisis de la estructura poblacional	198
V.E.1 Muestras del estudio, españoles y marroquíes.....	198
V.E.2 Muestras del estudio, junto con población europea y africana	201
VI DISCUSIÓN	207
VI.A Análisis descriptivo de la muestra.....	208
VI.B Frecuencias alélicas y genotípicas.....	209
VI.C Desequilibrio de ligamiento y haplotipos de riesgo	214
VI.D Comparativa con otras poblaciones.....	216
VI.E Determinación de aductos N7-MedG.....	217
VI.F Estructura Poblacional.....	219
VII CONCLUSIONES	221
CONCLUSIONS.....	223
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	225

RESUMEN

Los plaguicidas son sustancias químicas ampliamente utilizadas para el control de plagas y aumentar la producción agrícola. Su uso intensivo contribuye a la contaminación del medio ambiente que, junto a los residuos presentes en la dieta, incrementa la exposición de la población general a dosis bajas. Sin embargo, los trabajadores de invernadero en zonas de agricultura intensiva, como ocurre en la costa de Andalucía y especialmente en Almería, presentan una exposición más acusada debido al uso regular que hacen de estos productos a lo largo de su vida laboral. Aunque la toxicidad aguda por exposición a dosis altas se conoce bien y es fácil de detectar y diagnosticar, la toxicidad crónica por exposición a largo plazo a dosis bajas es difícil de evaluar y sigue siendo objeto de debate científico. En los países desarrollados existe una preocupación creciente acerca de los riesgos crónicos que pueden presentar estos compuestos sobre la salud. Cada vez hay más evidencias de que la exposición crónica a plaguicidas se asocia a diversos efectos adversos en salud, como neurotoxicidad, carcinogénesis, inmunotoxicidad y alteraciones de la reproducción y el desarrollo. Sin embargo, dada su baja incidencia entre todos los expuestos, sería necesario identificar los mecanismos por los que estos productos químicos pueden contribuir a tales efectos crónicos.

Los plaguicidas son metabolizados en el organismo hacia metabolitos menos tóxicos, aunque en ocasiones ocurre el fenómeno opuesto, la bioactivación metabólica. Los polimorfismos en genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XME), implicadas en la biotransformación de plaguicidas, pueden explicar en parte la amplia variabilidad interindividual en la capacidad de metabolizar los plaguicidas y, por tanto, pueden determinar la mayor o menor susceptibilidad de las personas expuestas. Las enzimas de fase I y II de la biotransformación de xenobióticos como son los citocromos P450, esterasas y Glutathion S-transferasas (GST), constituyen las XME mejor conocidas que están implicadas en la detoxificación de plaguicidas, en particular los organofosforados (OPs).

En el presente trabajo se pretende valorar la contribución de ciertos polimorfismos de genes que codifican enzimas de fase I y II implicadas en la biotransformación de plaguicidas sobre la toxicidad de dichos agentes. La población estudiada está compuesta por 277 individuos de El Poniente de Almería (Andalucía, España). De ellos, 186 sujetos

trabajan en agricultura intensiva de forma regular con exposición crónica a diversos plaguicidas y 91 individuos no expuestos a plaguicidas que actúan como controles. Mientras que todos los controles son españoles reclutados en el Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Almería, los trabajadores estaban constituidos por dos poblaciones diferentes 47 españoles y 139 marroquíes, debido a la importancia social y laboral de la inmigración en Almería. La población de estudio se evaluó en dos períodos diferentes de una misma campaña agrícola uno de alta exposición, en la que se usa una mayor cantidad de plaguicidas, y otro de baja exposición, en la que la aplicación de plaguicidas es menos intensa y frecuente. Todos los trabajadores proporcionaron dos muestras de sangre, una en cada periodo de estudio.

Se genotiparon los polimorfismos de los genes de las enzimas colinesterasa (*BCHE-A* y *K*), paraoxonasa (*PON1 192, 55, -108*), citocromos P450 (*CYP2D6*4, CYP2C19*2* y *CYP3A1*3*) y glutatión S-transferasa (*GSTM1* y *GSTT1*), mediante sondas TaqMan[®]. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas, el equilibrio Hardy-Weinberg, el desequilibrio de ligamiento y los haplotipos, tanto en los controles como en los trabajadores (españoles y marroquíes). Además se compararon las frecuencias alélicas de españoles con las de otras poblaciones de Europa, América, Asia y África (en esta última se incluyó también la población marroquí estudiada).

Por otro lado, se evaluó el daño del ADN en un subgrupo de 39 trabajadores de invernadero expuestos a plaguicidas mediante la determinación de los niveles de N7-metildeoxyguanosina (N7-MedG) en sangre, un aducto que se considera un biomarcador robusto de exposición reciente a agentes químicos metilantes. Se midió en ADN extraído de sangre obtenida durante dos periodos agrícolas, alta y baja exposición, mediante la técnica Inmunoslot blot (ISB).

Debido a las diferencias en el origen ancestral de los trabajadores evaluados, se realizó un estudio de la estructura poblacional mediante el programa STRUCTURE entre la población española y marroquí para determinar si era posible realizar análisis posteriores considerando la variable exposición sin tener en cuenta el origen poblacional.

Al comparar en ambas poblaciones las frecuencias de los genotipos y alelos considerados de riesgo se observan frecuencias significativamente mayores de *PON1 -108T* y *CYP2D6*4* en la población española y de *PON1 192R, CYP3A1*1* y alelo nulo de *GSTT1* en la población marroquí. Sin embargo, al comparar por grado de exposición (controles frente a trabajadores), se observan diferencias significativas en *BCHE-K, PON1 -108T, CYP2D6*4*

y *CYP3AP1*3*. En líneas generales, los trabajadores presentan una menor frecuencia de genotipos de riesgo, lo que podría explicarse por el efecto de trabajador sano por una presunta presión ocupacional frente a individuos genéticamente susceptibles.

El desequilibrio de ligamiento y el análisis de haplotipos pueden ser también útil para identificar el significado funcional de los polimorfismos genéticos. La frecuencia de haplotipos que no contienen alelos de mayor susceptibilidad genética a plaguicidas es mayor en población marroquí para los SNPs de BCHE y en población española para los SNPs de PON1. Ambos SNPs están en desequilibrio de ligamiento, pero en diferente grado. El desequilibrio de ligamiento entre los SNPs rs1803274 (BCHE-K) y rs1799807 (BCHE-A) es muy alto (tan solo se encontró un individuo KK-UA), mientras que entre los SNPs rs662 (PON1 Q192R), rs854560 (PON1 L55M) y rs705379 (PON1 -108C/T) el desequilibrio es bajo.

En líneas generales, las frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos seleccionados en la población de estudio (españoles y marroquíes) no son significativamente diferentes a las de europeos y americanos pero sí a las de africanos y asiáticos. Los alelos en los que se encontraron diferencias significativas son *PON1 192R*, *PON1 55L*, *PON1 -108C*, *CYP2D6*4* y *CYP3AP1*3*.

Los aductos de ADN N7-MedG y, por tanto, los niveles de alquilación del ADN, en trabajadores de agricultura intensiva fueron significativamente mayores en el período de alta exposición a plaguicidas con respecto al de baja exposición. Eso significa que la exposición a plaguicidas puede producir alquilación del ADN, lo que representa un indicio de genotoxicidad de estos agentes.

El análisis de estructura poblacional realizado en base a los polimorfismos genéticos estudiados, aún no siendo los marcadores más adecuados para este tipo de estudios y utilizando el mejor ajuste $K=2$, muestra que los españoles y marroquíes tienen orígenes ancestrales muy parecidos entre sí. Al comparar con otras poblaciones europeas y africana, se observa que las poblaciones estudiadas tienen orígenes genéticos ancestrales comunes a la población europea y muy alejada de la africana. Además, al ajustar a $K=3$, se aprecia un tercer componente ancestral con una proporción un poco superior en españoles que en europeos y marroquíes, que puede ser debido a un origen más complejo de la población española, que se ve reflejada en una mayor diversidad haplotípica que la de la población del Norte de Europa.

En definitiva, la información obtenido del presente estudio permite ampliar nuestro conocimiento sobre la susceptibilidad diferencial de carácter genético hacia tóxicos ambientales (especialmente plaguicidas) y puede ser útil para posteriores investigaciones para la hora de entender mejor la variabilidad toxicocinética interindividual en respuesta a la exposición a plaguicidas.

ABSTRACT

Pesticides are chemicals widely used for pest control and to enhance agricultural production. Its intensive use contributes to an increased environmental contamination which, together with pesticide residues present in the diet, increases the exposure of the general population to low doses of these chemicals. However, greenhouse workers from intensive farming areas, such as the coastline of Andalusia and especially Almeria, have higher exposure due to the regular use of these products in their work activities. Although acute toxicity from exposure to high doses is well known and easy to detect and diagnose, chronic toxicity from long-term exposure at low doses is difficult to assess and remains the subject of scientific debate. In developed countries there is growing concern about the chronic risks these compounds may have on health. There is increasing evidence that chronic exposure to pesticides is associated with a number of adverse health effects, including neurotoxicity, carcinogenesis, immunotoxicity, and reproductive and developmental alterations. However, given the low incidence of these health outcomes among all individuals exposed, it would be necessary to identify the mechanisms by which these chemicals can contribute to such chronic effects and the factors affecting their occurrence.

Pesticides are metabolized and detoxified in the body to less toxic metabolites, although sometimes metabolic bioactivation occurs, which is the opposite phenomenon. Polymorphisms in genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes (XME) involved in the biotransformation of pesticides may explain in part the wide inter-individual variability in the ability to metabolize pesticides and, therefore, may determine the greater or lesser susceptibility of the exposed population. The best-known XMEs involved in pesticides biotransformation, in particular organophosphates (OPs), are cytochromes P450, esterases and Glutathion S-transferases (GST), which represent Phase I and Phase II biotransformation enzymes.

The present study aimed to evaluate the contribution of certain polymorphisms of genes encoding Phase I and II enzymes involved in the biotransformation of pesticides on the toxicity of these agents. The population studied included 277 individuals from El Poniente (Almería, Andalusia, Spain). Of these, 186 subjects worked in intensive agriculture on a

regular basis with chronic exposure to various pesticides and 91 individuals were not exposed to pesticides and acted as controls. All controls were Spaniards and were recruited at the Center for Prevention of Occupational Hazards in Almería. On the other hand, due to the social and occupational impact of immigration in Almería, the study population was made up of two different populations 47 Spaniards and 139 Moroccans. These were evaluated in two different periods of the same crop season high exposure to pesticides, in which a greater amount of pesticides was used, and a period of low exposure, in which the application of pesticides was less intense and frequent. All workers provided two blood samples, one in each study period for further biochemical assays.

Polymorphisms of the genes encoding a number of metabolic enzymes, such as cholinesterase (BCHE-A and K), paraoxonase (PON1 192, 55, -108), cytochrome P450 (CYP2D6*4, CYP2C19*2 and CYP3AP1*3) and glutathione S-Transferase (GSTM1 and GSTT1) were analyzed using TaqMan[®]. Their allelic and genotype frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium and haplotypes were analyzed in the two subgroups of population studied, controls and workers (Spanish and Moroccan). In addition, the allelic frequencies of Spaniards were compared with those of other populations from Europe, America, Asia and Africa (the latter included the Moroccan population studied).

On the other hand, potential DNA damage was studied in intensive agricultural workers exposed to pesticides by determining levels of N7- methyldeoxyguanosine (N7-MedG), an adduct considered as a robust biomarker of recent exposure to chemical methylating agents. A cohort of 39 greenhouse workers was assessed for changes in lymphocyte DNA N7-MedG levels between the periods of high and low pesticide exposure during the course of a spraying season.

Due to differences in the ancestral origin of the workers evaluated, a study of the population structure was carried out using the STRUCTURE program between the Spaniards and Moroccan population to determine if there was a need to carry out further analyses considering the variable exposure without taking into account the population origin.

When comparing the frequencies of the risky genotypes and alleles in the two populations studied, significantly higher frequencies of *PON1 -108T* and *CYP2D6*4* were observed in the Spanish population, and *PON1 192R*, *CYP3AP1*1* and the null allele of *GSTT1* in the

Moroccan population were observed. However, when individuals were compared according to their exposure status (controls versus workers), significant differences were observed in *BCHE-K*, *PON1 -108T*, *CYP2D6*4* and *CYP3A1*3*. Overall, workers had a lower frequency of risk genotypes, which could be explained by the healthy worker effect due to a potential occupational pressure against genetically susceptible individuals.

Linkage disequilibrium and haplotype analysis are also useful in identifying the functional significance of genetic polymorphisms. The frequency of haplotypes that do not contain alleles of greater genetic susceptibility to pesticides was higher in the Moroccan population for *BCHE* SNPs and in the Spanish population for *PON1* SNPs. Both SNPs were in linkage disequilibrium, but to different strength. The linkage disequilibrium between SNPs rs1803274 (*BCHE-K*) and rs1799807 (*BCHE-A*) was very high (only one individual KK-UA was found), whereas the disequilibrium between SNPs rs662 (*PON1 Q192R*), rs854560 (*PON1 L55M*) and rs705379 (*PON1 -108C/T*) was low.

Overall, the allelic frequencies of the genetic polymorphisms characterized in the study population (Spanish and Moroccan) were not significantly different from those of European and American populations, but did differ from those of Africans and Asians. The alleles in which significant differences were found were *PON1 192R*, *PON1 55L*, *PON1 -108C*, *CYP2D6*4* and *CYP3A1*3*.

N7-MedG DNA adducts, and therefore DNA alkylation levels, in intensive agricultural workers were significantly higher in the period of high pesticide exposure relative to the low exposure period. This finding means that exposure to pesticides can produce DNA alkylation, which is an indication of the genotoxicity of these agents. In addition, pesticide-exposed individuals with inherited susceptible metabolic genotypes (particularly, null genotype for *GSTM1* and the *PON1 192R* allele) appear to have an increased risk of genotoxic DNA damage.

The analysis of the population structure based on the genetic polymorphisms studied, which are not the most suitable markers for this type of studies, and using the best K=2 adjustment, showed that the Spanish and Moroccans population have a very similar ancestral origin. When comparing with other European and African populations, the populations studied have ancestral genetic origins common to Europeans but distinct from the Africans. In addition, when adjusting to K=3, a third ancestral component was seen with a slightly higher proportion in Spaniards than in Europeans and Moroccans, which

may be due to a more complex ancestral origin of the Spanish population, which is reflected by a greater Haplotype diversity than that of Northern European population.

In conclusion, the data from the present study expand our knowledge about genetic susceptibility to environmental toxicants (especially pesticides) and may be useful for further investigations in order to better understand the interindividual toxicokinetic variability in response to exposure to pesticides.

ABREVIATURAS

AChE	acetilcolinesterasa eritrocitaria
ADNg	ADN genómico
BChE/ <i>BCHE</i>	enzima/ gen de la butirilcolinesterasa o colinesterasa plasmática
CarbE	carboxilesterasas
CI_{low} – CI_{hi}	límite inferior y superior del 95% de nivel de confianza en D'
CNA	ensayo de número de copias
CNV	variación en el número de copias
CT ADN	ADN de timo de ternera
C_T	cycle threshold
CV	coeficiente de variación
CYP450	citocromo 450
D'	parámetro LD normalizado
Dist	distancia en bases entre los loci
DME	enzimas metabolizadoras de fármacos
FMO	onooxigenasas que contienen flavina
GSH	glutación reducido
GST	Glutation S-transferasa
HWE	equilibrio Hardy-Weinberg
IC 95%	intervalo de confianza al 95%
IMC	índice de masa corporal
ISB	Inmunoslot blot
LD	desequilibrio de ligamiento
LOD	logaritmo de las probabilidades de que exista LD entre dos loci
MCMC	método de Montecarlo basado en cadenas de Markov
MGB	unión al surco menor
N7-MedG	N7-metildeoxyguanosina
NAT	N-acetiltransferasas
NC membrana	membrana de nitrocelulosa
NFQ	inhibidor no fluorescente
NRO/ RO ADN	ADN sin/ con anillo abierto
NTC	control sin ADN

O6-MedG	O6-methyldeoxyguanosine
OP	organofosforado
PBS	tampón fosfato salino
PBST	PBS-Tween
PM/ IM/ EM/ UM	metabolizador lento/ intermedio/ rápido/ ultrarápido
PON1/ <i>PON1</i>	enzima/ gen de la paraoxona 1 o esterasa A
PPL	post-marcaje con moléculas radioactivas 32P
qPCR	PCR cuantitativa
r²	coeficiente de correlación entre dos loci
RQ	cuantificación relativa
SNP	polimorfismo de un único nucleótido
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T_m	temperatura de hibridación
XME	enzimas metabolizadoras de xenobióticos

Listas de Imágenes, Figuras y Tablas

Lista de Imágenes

Imagen I-1.- Fotografía aérea de la comarca del poniente de Almería.....	24
Imagen I-3 Fotografía aérea de la comarca del poniente de Almería en 2009	25
Imagen I-4 Ejemplos de invernaderos en Almería.....	27
Imagen IV-1. Instrumental GENios Microplate Reader (Tecan, Austria)	147
Imagen IV-2. Instrumental PR 648 Slot Blot Manifold junto a la bomba de succión.....	147
Imagen IV-3. Casete radiográfico de exposición a rayos-X	148

Lista de Figuras

Figura I-1 Expresión clásica de las Fases I y II de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos	32
Figura I-2 Vía del citocromo P450/PON1 de bioactivación y detoxificación.....	33
Figura I-3. Localización de los genes de estudio en los cromosomas humanos	35
Figura I-4. Esquema explicativo sobre la dificultad de diferenciar la variante atípica de la variante K.....	41
Figura I-5. Esquema gráfico de los haplotipos posibles para cada fenotipo	43
Figura I-6. Esquema del gen BCHE donde se muestra la localización de la variante atípica y K.	44
Figura I-7. Esquema centrado en la zona del gen BCHE donde se localiza la variante atípica.	45
Figura I-8. Gen y producto de la proteína de la BCHE con la variante usual y K.....	46
Figura I-9. Esquema de la localización genómica de las variantes de BChE.....	47
Figura I-10. Esquema de las reacciones catalizadas por PON1	50
Figura I-11. Vía de detoxificación de componentes organofosforados	52
Figura I-12 Estructura cristalina de la PON1 humana	53
Figura I-13. Polimorfismos genéticos de PON1	54
Figura I-14. Proporción de fármacos metabolizados por CYP450s	59

Figura I-15. Ejemplo de nomenclatura de las enzimas citocromo P450.....	60
Figura I-16. Relación y nomenclatura de los miembros de CYP450 más importantes en el metabolismo	63
Figura I-17. Conjugación del glutatión a un xenobiótico genérico (X) a través de la GST.	69
Figura I-18. Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos	69
Figura I-19. Tipos de cambios estructurales genómicas que afectan segmentos de ADN	73
Figura IV-1. Tubo de EDTA Vacutainer™ de 5 mL.....	86
Figura IV-2. Infinite® 200 NanoQuant. (Tecan)	89
Figura IV-3. Curva estándar con concentraciones conocidas de ADN medidas por PicoGreen®	90
Figura IV-4. Gel de agarosa al 2%. Condiciones de electroforesis de 100v 30 min.	91
Figura IV-5. Estructura de las sondas TaqMan®.....	92
Figura IV-6. Representación paso a paso del proceso del ensayo exonucleasa	93
Figura IV-7. Esquema sobre el principio de la molécula MGB (ligando de unión al surco menor).....	95
Figura IV-8. Esquema del proceso de detección de SNPs mediante sondas TaqMan®.....	96
Figura IV-9. Emisión de fluorescencia VIC® debido a que el individuo es homocigoto para el alelo C.	97
Figura IV-10. Emisión de fluorescencia FAM™ debido a que el individuo es homocigoto para el alelo T.	97
Figura IV-11. Emisión de fluorescencia VIC® y FAM™ debido a que el individuo es heterocigoto (TC).	98
Figura IV-12. Plot de discriminación alélica.....	99
Figura IV-13. Representación logarítmica de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos.	100
Figura IV-14. Representación lineal de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos.....	101
Figura IV-15. Representación esquemática de la localización de cada uno de los tipos de muestras.....	102
Figura IV-16. TaqMan® Genotyping Master Mix.	103
Figura IV-17. Esquema de las condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación.....	107
Figura IV-18. TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, 2014)	111
Figura IV-19. Captura de pantalla de la herramienta web para la búsqueda de ensayos	112
Figura IV-20. TaqMan® Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assays.....	113
Figura IV-21. Esquema de las condiciones del termociclador para la reacción de amplificación por PCR	114
Figura IV-22. Captura de pantalla de la herramienta web para la búsqueda de ensayos	115
Figura IV-23. Vista en detalle de una captura de pantalla de la herramienta web	116
Figura IV-24. TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays.....	117
Figura IV-25. Captura de pantalla de la herramienta web Custom TaqMan® Assay Design Tool.....	118
Figura IV-26. Captura de pantalla de la base de datos dbSNP del NCBI donde buscar el SNP de estudio. ..	119

Figura IV-27. Captura de pantalla de la secuencia que rodea al SNP	120
Figura IV-28. Captura de pantalla de la herramienta web Custom TaqMan® Assay Design Tool.....	120
Figura IV-29. Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR system.	121
Figura IV-30. Captura de pantalla del software SDS. Disposición de las muestras en la placa 384.....	122
Figura IV-31. Captura de pantalla del software SDS. Disposición de las muestras en la placa 384.....	123
Figura IV-32. Plot de discriminación alélica.....	124
Figura IV-33. TaqMan® Copy Number Assays	125
Figura IV-34. PCR y detección de las secuencias ADN _g diana y referencia en una reacción dúplex.	127
Figura IV-35. Reactivo TaqMan® Copy Number Reference Assay.	129
Figura IV-36. Esquema de las condiciones generales de termociclador para la amplificación por PCR	132
Figura IV-37. Captura de pantalla del <i>Analysis Setting</i> del programa SDS.	133
Figura IV-38. Captura de pantalla del <i>Export</i> del programa SDS.	133
Figura IV-39. Captura de pantalla del programa CopyCaller®.....	134
Figura IV-40. Gráficos de los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR.	136
Figura IV-41. Gráfico de la curva estándar con 6 puntos por duplicado de muestras estándar.....	148
Figura IV-42. Esquema del flujo de trabajo con los diferentes programas utilizados	152
Figura V-1. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según exposición a plaguicidas.....	155
Figura V-2. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según el origen poblacional.	156
Figura V-3. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según sexo.....	156
Figura V-4. Gráfico de barras agrupadas según el sexo, origen poblacional y exposición a plaguicidas.....	158
Figura V-5. Histograma de frecuencias de la edad con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo..	161
Figura V-6. Histograma de frecuencias del peso con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo.	163
Figura V-7. Histograma de frecuencias de la altura con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo.	165
Figura V-8. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas de diez loci para las dos poblaciones de estudio.....	166
Figura V-9. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de diez loci para las dos poblaciones.....	169
Figura V-10. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de diez loci.	172
Figura V-11. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs estudiados	176
Figura V-12. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs estudiados.....	178
Figura V-13. Gráficos de la media de LnP(K) [arriba] y Delta K [abajo] frente a los diferentes K.....	200
Figura V-14. Análisis estructural de las 2 poblaciones del presente estudio.....	201
Figura V-15. Gráficos de la media de LnP(K) [arriba] y Delta K [abajo] frente a los diferentes K.....	203

Figura V-16. Análisis estructural de 4 poblaciones. Imágenes obtenidas en DISTRUCT.....	204
Figura V-17. Análisis estructural de 4 poblaciones. Imágenes obtenidas en DISTRUCT.....	205
Figura VI-1. Gráfico de barras agrupadas según sean controles o trabajadores.....	208
Figura VI-2. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de <i>BCHE-K</i>	210
Figura VI-3. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de <i>PON1 -108C/T</i>	211
Figura VI-4. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de <i>CYP2D6*4</i>	211
Figura VI-5. Análisis estructural de 4 poblaciones asumiendo poblaciones formadas por componentes.....	220

Lista de Tablas

Tabla I-1. Datos genéticos de interés de los polimorfismos del presente estudio.....	36
Tabla I-2. Términos e identificadores de la Butirilcolinesterasa.....	37
Tabla I-3. Características de las variantes genéticas más conocidas de BChE.....	40
Tabla I-4 Metodología para la adscripción del fenotipo sérico de colinesterasa en cada muestra.....	42
Tabla I-5. Características de las variantes genéticas de estudio.....	44
Tabla I-6. Términos e identificadores de la paraoxonasa 1.....	49
Tabla I-7. Términos e identificadores de los CYP450 del presente estudio.....	55
Tabla I-8. Principales CYP450s de metabolización de fármacos en el hígado humano.....	62
Tabla I-9. Polimorfismos de las clases más importantes de la superfamilia citosólica.....	71
Tabla IV-1. Descripción de los métodos para añadir el ADNg.....	106
Tabla IV-2. Preparación de la mezcla para la reacción utilizando el método de ADNg secado.....	106
Tabla IV-3. Condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR.....	107
Tabla IV-4. Formatos disponibles de los productos de TaqMan® SNP Genotyping Assays.....	108
Tabla IV-5. Información más relevante para genotipar los SNPs del presente estudio.....	110
Tabla IV-6. Condiciones del termociclador para la reacción de amplificación por PCR.....	114
Tabla IV-7. Preparación de la mezcla para la reacción utilizando el método de ADNg secado en el fondo..	131
Tabla IV-8. Condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR.....	131
Tabla V-1. Características demográficas y estilo de vida de los trabajadores y trabajadoras.....	159
Tabla V-2. Valores estadísticos de la edad, peso, altura e IMC.....	160

Tabla V-3. Frecuencias alélicas de diez loci para población total y estratificado por origen ancestral.	167
Tabla V-4. Frecuencias genotípicas de diez loci para población total y estratificado por origen ancestral.....	170
Tabla V-5. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia.	171
Tabla V-6. Frecuencias genotípicas para los grupos Controles y Trabajadores (n, %).	173
Tabla V-7. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia.....	174
Tabla V-8. Cálculo del Equilibrio Hard-Weinberg en las dos poblaciones de estudio.....	175
Tabla V-9. Valores de los parámetros del desequilibrio de ligamiento (LD).....	177
Tabla V-10. Valores de los parámetros del desequilibrio de ligamiento (LD) obtenidos.	178
Tabla V-11. Frecuencias haplotípicas de los dos polimorfismos del gen <i>BCHE</i> estudiados	179
Tabla V-12. Frecuencias haplotípicas de los tres polimorfismos del gen <i>PON1</i> estudiados	179
Tabla V-13. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos BCHE estudiados	181
Tabla V-14. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos PON1	184
Tabla V-15. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos CYP450 estudiados	187
Tabla V-16. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia.....	190
Tabla V-17. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio de aductos de N7-MedG..	193
Tabla V-18. Modelo de análisis mixtos para evaluar la asociación entre niveles de N7-MedG.....	194
Tabla V-19. Niveles de N7-MedG, AChE y BChE estratificados según sexo en los dos periodos	195
Tabla V-20. Correlación (coeficiente rho de Spearman) entre N7-MedG, AChE y BChE.....	196
Tabla V-21. Niveles de N7-MedG según los polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras.....	197
Tabla V-22. Determinación del mejor valor de K para el análisis de la estructura poblacional.....	199
Tabla V-23. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=2	201
Tabla V-24. Determinación del mejor valor de K para el análisis de la estructura poblacional.....	202
Tabla V-25. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=2	204
Tabla V-26. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=3	205

I INTRODUCCIÓN

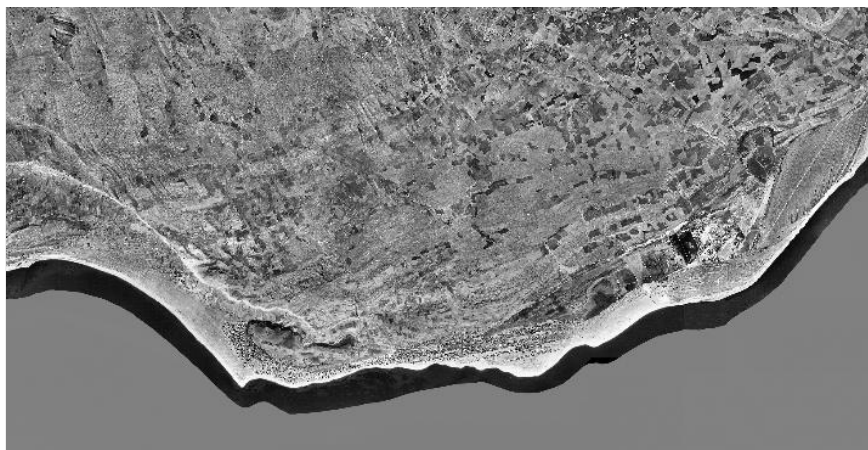
I.A Uso de plaguicidas en agricultura

Los plaguicidas se usan con frecuencia en la agricultura como productos químicos para aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de la producción de cultivos, así como en entornos no agrícolas, como los programas de salud pública o de uso residencial. Sin embargo, el sector agrícola representa la mayor parte de la cantidad total utilizada, con un gasto mundial en 2007 superior a 34,9 mil millones de euros (Grube et al., 2011; Hernández, Parrón, et al., 2013).

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

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

Imagen I-1.- Fotografía aérea de la comarca del poniente de Almería en 1956. Fuente La Red de Información Ambiental de Andalucía (REDIAM)



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

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

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



En cuanto a la provincia de Granada, los cultivos de invernadero se han extendido hacia la franja costera del este de Motril con gran rapidez, pasando de 118 Ha en 1984, a cerca de 2.400 Ha según datos más recientes (Manzano-Aglugliaro, 2007). Los invernaderos andaluces, localizados en su mayor parte en Almería y Granada, tanto de frutas como de hortalizas, concentran casi el 60% de la superficie invernada española, proporcionando el 18,8% de la producción vegetal total, a la vez que representan el 60% de la producción hortícola total de Andalucía. El clima en estas regiones ha sido determinante en el éxito de este tipo de cultivos bajo plástico. Su particular microclima resulta idóneo para el desarrollo de los cultivos hortícolas tempranos temperaturas suaves, reducidos saltos térmicos entre el día y la noche, elevado nivel de insolación, poca humedad, escasez de heladas y precipitaciones, etc. (Becerra et al., 2010).

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

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

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

Los OPs se comercializan principalmente como organofosforotioatos, que contienen un grupo tión (P=S). Estos compuestos tienen relativamente poca actividad hacia la acetilcolinesterasa, por lo tanto, se someten a una serie de transformaciones metabólicas a través de una vía de oxidación para convertirlos en oxones (P=O), los cuales son más eficaces. La escisión de los radicales alquil-éster (P-O) en la detoxificación de OPs, genera productos anticolinesterásicos menos potentes. Las tasas relativas de activación y detoxificación de un plaguicida puede ser determinante en su capacidad de intoxicación.

El período de tiempo necesario para realizar aplicaciones de plaguicidas en una hectárea de tierra es muy variable y puede oscilar entre 6 y 12 horas. Algunos trabajadores expuestos son fumigadores regulares y otros son esporádicos, es el caso de trabajadores que cultivan sus propios invernaderos (Parrón et al., 1996).

El uso extensivo de plaguicidas a nivel mundial, principalmente los compuestos OPs, supone numerosas intoxicaciones agudas al año. En los siete años que van desde el 2000 al 2006, se registraron un total de 597 intoxicaciones agudas por plaguicidas en el Programa de Vigilancia Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas (ESPAPP) en Almería. Esto supone una incidencia anual de 16 casos por cada 100 000 habitantes y 43 casos por cada 100 000 trabajadores, lo que es más del doble de la tasa descrita en los Estados Unidos. La mayoría de ellas (78,7%) son de carácter ocupacional y un 9,9% son de etiología suicida (Hernández et al., 2010). Las características especiales de los invernaderos (espacio cerrado, alta temperatura y alta humedad) son factores que contribuyen a facilitar la absorción de plaguicidas en la medida en que el uso del equipo de protección personal es insuficiente (Imagen I-3). Sin embargo, el tamaño del aerosol es bastante grande, de modo que es poco probable que alcance el espacio alveolar, por lo que no se absorbería a través de los pulmones; sin embargo, sí ejercerían un efecto local sobre las vías respiratorias. Por el contrario, la piel es la vía más importante de absorción en el medio laboral debido a las características lipófilas de los OPs y las condiciones ambientales en los invernaderos que

dan lugar a la vasodilatación cutánea. El uso inapropiado de ropa protectora y equipos de protección personal acentúa el problema (Hernández et al., 2003).

Imagen I-3 Ejemplos de invernaderos en Almería

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



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



I.B Efectos en salud por exposición a plaguicidas

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

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

Los efectos sobre la salud de la exposición a plaguicidas en dosis bajas son muy difíciles de delimitar, sobre todo cuando se utilizan mezclas de plaguicidas. Esta circunstancia suele producirse en las prácticas de agricultura intensiva, como son los invernaderos de plástico. Se han utilizado dos tipos de medidas para evaluar la exposición a estos compuestos: actividad de enzimas en sangre, y la biomonitorización de plaguicidas y sus metabolitos en orina o sangre. Sin embargo, la inadecuada relación dosis-respuesta hace que la

biomonitorización de metabolitos en fluidos biológicos se utilice sólo como indicador biológico de exposición, para confirmar la exposición o estimar la dosis interna. Además, individuos con similar perfil de exposición a plaguicidas pueden producir efectos biológicos muy diferentes (Hernández et al., 2004).

Diversos estudios han evaluado los efectos de la exposición a los plaguicidas en el ambiente de trabajo, pero hay una escasez de datos clínicos al respecto. Las anomalías clínicas observadas hasta la fecha sugieren la afectación de muchos órganos, incluyendo los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso.

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

Las posibles exposiciones ocupacionales, contaminación del medio ambiente y los alimentos debido a los plaguicidas, plantean inquietudes sobre los riesgos potenciales para la salud (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). A causa de esto, los plaguicidas están sujetos a pruebas de genotoxicidad antes de ser aprobados, ya que son un factor de riesgo para ciertos efectos crónicos en la salud (Bolognesi, 2003). De hecho, ha habido una serie de estudios que han reportado asociaciones entre la exposición a plaguicidas y enfermedades crónicas (Mostafalou y Abdollahi, 2013), incluyendo varios tipos de cáncer (Bassil et al., 2007; Parrón et al., 2013), enfermedades neurodegenerativas (Dardiotis et al., 2013; Kanavouras et al., 2011; Parrón et al., 2011), reproductivas (Hanke y Jurewicz, 2004), toxicidad sobre el desarrollo neurológico (González-Alzaga et al., 2014) y efectos respiratorios (Hernández et al., 2011), entre otros.

Sin embargo, los estudios epidemiológicos han proporcionado resultados contradictorios debido a la aparición tardía de efectos y la posible contribución de otros factores causales. Un modificador de efecto potencial en estos estudios es la variabilidad genética de los genes implicados en el metabolismo de plaguicidas que, al mismo nivel de exposición, pueden permitir a los individuos metabolizar estos compuestos a diferentes velocidades, lo que confiere perfiles metabólicos distintos (Howard et al., 2010). Estas diferencias

metabólicas de base genética pueden determinar si los síntomas clínicos, o incluso la intoxicación, aparecerán y también predisponer a las enfermedades crónicas mencionadas después de la exposición a plaguicidas a largo plazo.

Gracias a una mejor comprensión del efecto de las enzimas implicadas en el metabolismo de tóxicos, se podría predecir mejor la respuesta tóxica e individualizar los posibles efectos adversos inducidos por los plaguicidas.

Existen evidencias de que la susceptibilidad genética en el metabolismo de plaguicidas, tanto su eliminación como el transporte, puede predisponer a las personas a padecer enfermedades crónicas (p.ej., la enfermedad de Parkinson) si han estado expuestos a los plaguicidas (Mostafalou y Abdollahi, 2013). Cada vez hay más evidencias de que la exposición crónica a plaguicidas se asocia con un deterioro de la salud, pudiendo producir neurotoxicidad, carcinogénesis, inmunotoxicidad y efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Sin embargo, dada su baja incidencia, sería necesario identificar los mecanismos por los que estos productos químicos pueden contribuir a estos efectos crónicos (Hernández, Gómez, et al., 2006). Aunque aún no se ha determinado la relación causal directa entre tales efectos y la exposición a plaguicidas, existe cada vez mayor preocupación en los países desarrollados acerca de los riesgos potenciales que pueden producir estos compuestos sobre la salud.

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

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

I.C Indicadores biológicos de exposición y efecto a plaguicidas

La evaluación del riesgo de los plaguicidas precisa de indicadores biológicos de exposición (plaguicidas o sus metabolitos en fluidos biológicos), de efecto (determinación de las colinesterasas u otras enzimas) y de susceptibilidad (polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan plaguicidas). Estos últimos son de especial interés, ya que pueden predisponer a un mayor riesgo en el caso de la exposición a estos compuestos.

La determinación de la actividad de colinesterasa plasmática (ChE) y acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) es el método estándar para monitorizar la exposición laboral a insecticidas anticolinesterásicos. La disminución de los niveles de acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) y colinesterasa plasmática (BChE) se han utilizado como estimación cuantitativa de exposición. En concreto, la AChE se considera un biomarcador de la exposición crónica a plaguicidas en los seres humanos como consecuencia no sólo de su inhibición por insecticidas OPs y *N*-metilcarbamatos, sino también por la inducción de peroxidación lipídica, un proceso que afecta a las enzimas de membrana, como la AChE. Por el contrario, la BChE se considera un biomarcador útil para evaluar la exposición a corto plazo debido a su rápida recuperación después de la inhibición por compuestos anticolinesterásicos (Hernández, Gil, et al., 2013).

La BChE es un enzima muy sensible a la inhibición por agentes anticolinesterásicos y cuya determinación es fácil de realizar y susceptible de automatización en autoanalizadores bioquímicos. Además, la sangre es una matriz relativamente sencilla de obtener y analizar. Otro aspecto a tener en cuenta en biomonitorización es que existen variaciones no sólo interindividuales sino también intraindividuales como resultado de factores genéticas y presencia de ciertas enfermedades o ingesta de medicamentos.

Los trabajadores agrícolas de invernadero están expuestos con frecuencia a numerosos plaguicidas o mezclas de los mismos, ya sea simultánea o secuencial, lo que hace difícil identificar los efectos de cada compuesto en particular. La relación entre los efectos tóxicos de los plaguicidas y sus efectos en salud no está todavía resuelta. En este sentido, el uso de biomarcadores puede ser de utilidad para detectar los efectos precoces de los plaguicidas antes de que aparezcan los efectos clínicos. Un biomarcador capaz de predecir el daño en órgano diana de plaguicidas mejora significativamente la evaluación del riesgo de los individuos expuestos así como las estrategias de intervención y de tratamiento. En ese

sentido, se han diseñado estudios con el fin de establecer correlaciones entre biomarcadores con distintos parámetros de función o daño. (Hernández et al., 2003).

I.D Biotransformación de plaguicidas y biomarcadores de susceptibilidad

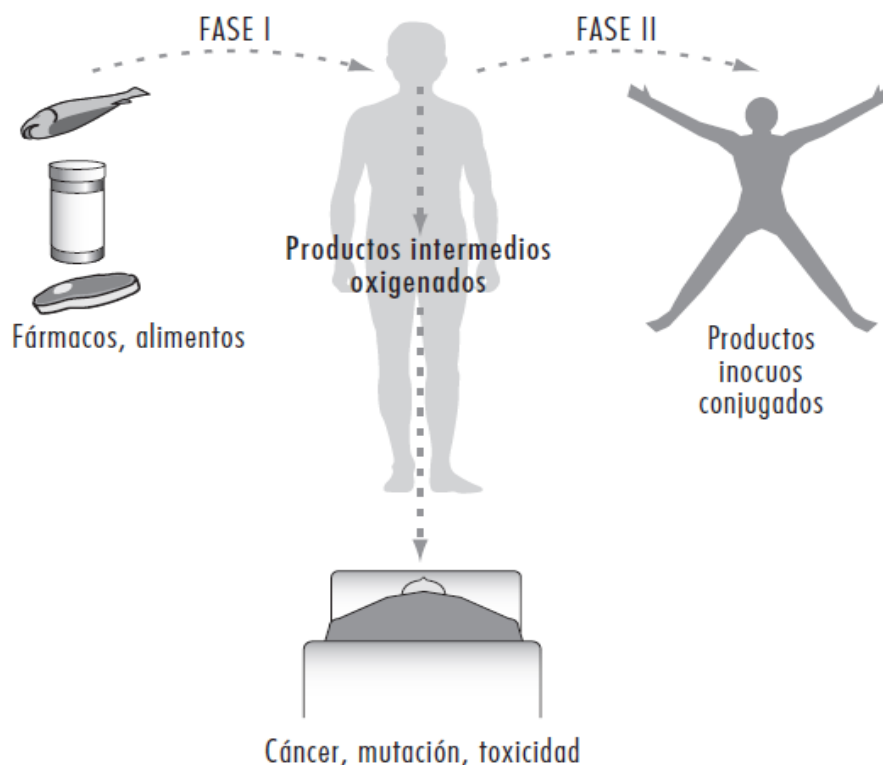
El metabolismo de xenobióticos, incluyendo los plaguicidas, tiene lugar principalmente en el hígado y en menor medida en otros órganos, como el intestino, pulmón e incluso el cerebro (Gervot et al., 1999). El metabolismo extrahepático puede ser relevante para los efectos adversos para la salud de la exposición ambiental a largo plazo. Aunque los plaguicidas son generalmente detoxificados, en algunos casos pueden experimentar bioactivación dando lugar a metabolitos de mayor toxicidad que el compuesto original, como ocurre con muchos OPs. El equilibrio relativo entre bioactivación y detoxificación determina el resultado final de las interacciones de los tóxicos. Estos procesos dinámicos pueden verse afectados por los polimorfismos genéticos de las enzimas de biotransformación, lo que lleva a la reducción o aumento de la expresión enzimática, lo que determina que un individuo sea más o menos susceptible a los efectos adversos de estos compuestos (Costa y Eaton, 2006). Por lo tanto, la herencia de los alelos desfavorables de los diferentes genes polimórficos se ha asociado con un aumento de la activación o una reducción de la desintoxicación de los plaguicidas, y podría implicar una mayor susceptibilidad a estos compuestos (Bolognesi, 2003).

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

Por medio del metabolismo, los xenobióticos liposolubles presentes en el organismo se pueden transformar en metabolitos hidrosolubles que se excretan más fácilmente (Figura I-1). Este proceso tiene lugar principalmente en el hígado y se divide en dos fases. En una primera fase (Fase I) las enzimas contenidas en las células hepáticas producen una desulfuración oxidativa de los insecticidas fosforotioatos, activándolos de este modo. Esta fase de bioactivación puede generar sustancias de alta capacidad tóxica ya que los metabolitos formados pueden lesionar los tejidos mediante diferentes mecanismos, entre ellos, por estrés oxidativo (Silbergeld, 2001). Esta fase está mediada por citocromos P450

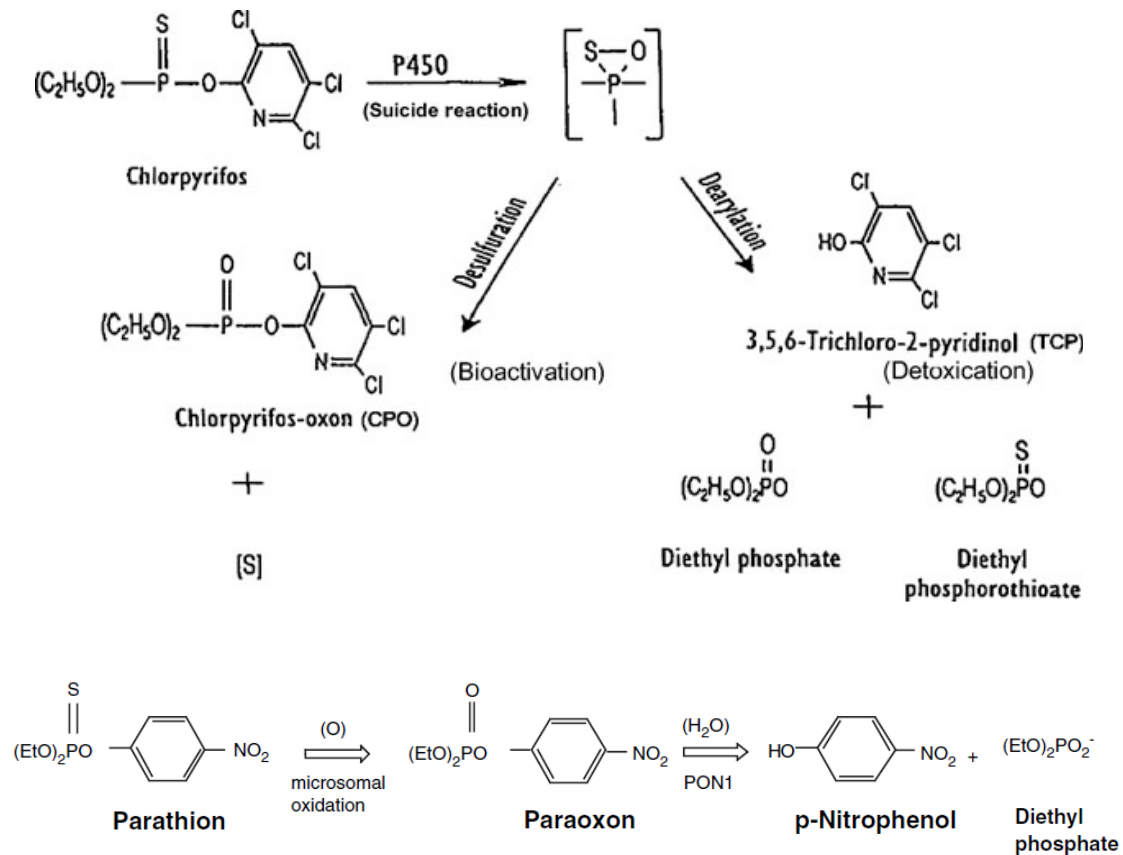
(CYP450). Dichas reacciones pueden estar catalizadas por las subfamilias CY1A2, 2B6 y 2C19 cuando son dosis bajas (10 mM), mientras que a dosis altas la isoenzima que opera es la CYP3A4 (Usmani et al., 2004).

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



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

Figura I-2 Vía del citocromo P450/PON1 de bioactivación y detoxificación (Costa y Eaton, 2006; C. E. Furlong, 2007)



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

Aunque todas las vías para la desintoxicación de plaguicidas no se entienden completamente, los estudios en animales han indicado que tres sistemas principales están involucrados en el metabolismo de OPs las enzimas del citocromo P450 (CYP2D6, CYP2C19, CYP3A), glutatión S-transferasas (GSTM1, GSTT1), y las esterasas paraoxonasa-1 (PON1), butirilcolinesterasa (BChE) y carboxilesterasas (CarbE) (Araoud, 2011; Liu et al., 2006). CYP450s también metaboliza algunos insecticidas N-metilcarbamatos y neonicotinoides (Hodgson, 2003). La mayoría de estos sistemas

enzimáticos son toxicológicamente relevantes debido a su capacidad para metabolizar otros contaminantes ambientales y por su naturaleza altamente polimórfica, lo que lleva enzima con actividad alterada. Por lo tanto, son fuertes candidatos a ser factores de susceptibilidad frente a plaguicidas y enfermedades (Povey, 2010; Schroeder, 2005).

I.E Polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de plaguicidas

Las variaciones genéticas en genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XME) representan gran parte de la variabilidad en la respuesta de los individuos a la exposición a productos químicos ambientales. Estas variaciones se han asociado con diferencias toxicocinéticas de los xenobióticos y a la modificación de la dosis bioefectiva en órganos diana críticos, por lo que estarían implicados en la toxicidad de las exposiciones químicas ambientales y ocupacionales. Por lo tanto, las diferencias genéticas en estas enzimas pueden suponer un mayor riesgo o susceptibilidad a enfermedades relacionadas con exposiciones ambientales y laborales (Mostafalou y Abdollahi, 2016).

Los factores genéticos implicados en los efectos adversos producidos por los plaguicidas incluyen los polimorfismos de genes que codifican enzimas metabólicas y que determinan una mayor o menor actividad enzimática. Por lo tanto, los polimorfismos de una amplia gama de genes pueden afectar a la susceptibilidad a la toxicidad de numerosos plaguicidas, aunque los más conocidos son los que afectan a los enzimas metabolizadoras de OPs (Gómez-Martín, Hernández, et al., 2015).

Los OPs reaccionan con numerosas proteínas, como son la AChE, BChE, CarBE, GST y albúmina. El papel biológico de estas enzimas, junto al de la PON1, en la detoxificación de OPs está aún por aclarar, pero hay evidencias que sugieren que pueden jugar un papel importante cuando la exposición es baja (Timchalk et al., 2002).

BChE, PON1, citocromos P450 y GST constituyen las principales clases de enzimas metabolizadoras de xenobióticos involucradas en la detoxificación de plaguicidas y, por tanto, son las elegidas para el presente estudio. A continuación se detallan cada una de ellas centrándose en las características genéticas. En la Figura I-3 se representa la localización de cada uno de los genes de las enzimas elegidas, mientras que en la Tabla I-1 se detallan

diferentes datos genéticos de los polimorfismos del presente estudio, que serán de ayuda a lo largo de la lectura del trabajo.

Figura I-3. Localización de los genes de estudio en los cromosomas humanos. Adaptada de Map Viewer (NCBI)

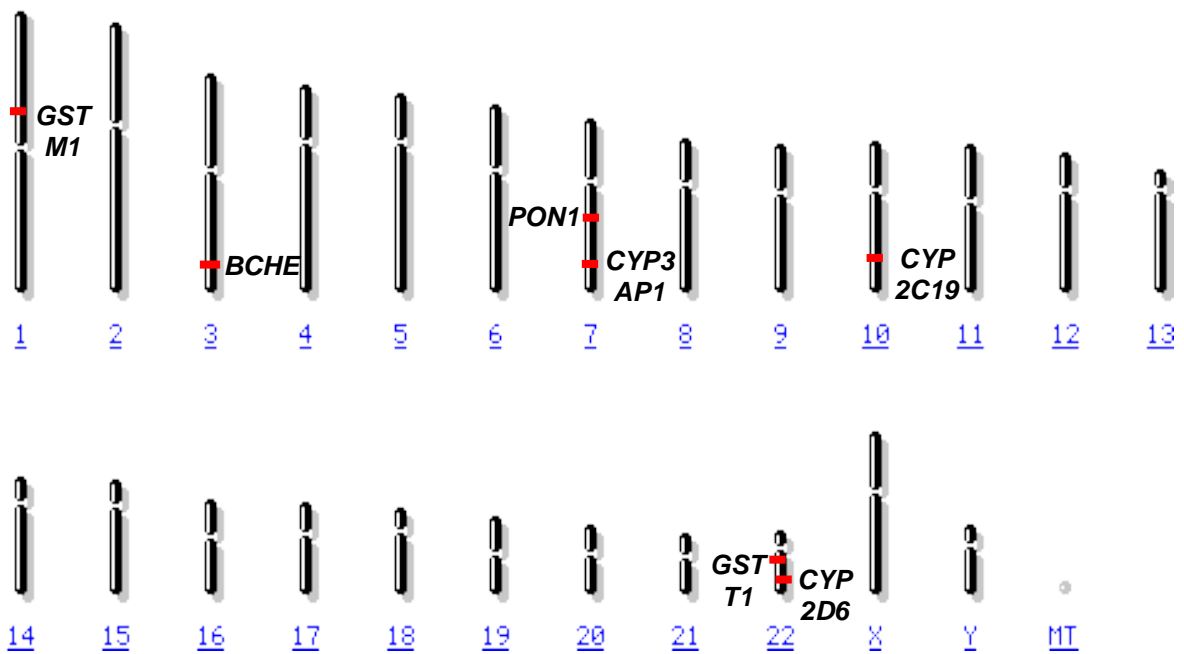


Tabla I-1. Datos genéticos de interés de los polimorfismos del presente estudio.

Gen	Cr. ¹	#rs ²	Variante	Cambio nt ³	Cambio aa ⁴	MAF ⁵	Fenotipo
<i>BCHE</i>	3	rs1803274	Kalow (K)	<u>G</u> CA⇒ <u>A</u> CA	Ala539Thr	0,16 (A)	Actividad reducida 1/3
<i>BCHE</i>	3	rs1799807	Atípica (A)	G <u>A</u> T⇒G <u>G</u> T	Asp70Gly	0,01 (G)	70% de actividad, resistente a la inhibición por dibucaína
<i>PON1</i>	7	rs662	Q192R	<u>C</u> AA⇒ <u>C</u> GA	Gln192Arg	0,46 (G)	Variación en la actividad enzimática
<i>PON1</i>	7	rs854560	L55M	<u>T</u> TG⇒ <u>A</u> TG	Leu55Met	0,18 (A)	Variación en la actividad enzimática
<i>PON1</i>	7	rs705379	-108C/T	C> T	Ninguno	0,35 (A)	Variación en la actividad enzimática
<i>CYP2C19</i>	10	rs4244285	*2	<u>C</u> CG⇒ <u>C</u> CA	Pro227	0,22 (A)	Metabolizador lento
<i>CYP2D6</i>	22	rs3892097	*4	G> A	Ninguno	0,09 (A)	Metabolizador lento
<i>CYP3A1</i>	7	rs2177180	*3	G> A	Ninguno	0,35 (G) ⁶	
<i>GSTM1</i>	1	-	Presencia (1)	Delección del gen	-	0,294 (1)	
<i>GSTT1</i>	22	-	Ausencia (0)	Delección del gen	-	0,449 (0)	

¹Cromosoma. ²Número identificativo del polimorfismo de un nucleótido. ³Nucleótido. ⁴Aminoácido. ⁵Alelo de menor frecuencia, dato obtenido de la media de las poblaciones de (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012). ⁶Alelo ancestral *1(G).

I.E.1 Butirilcolinesterasa

Tabla I-2. Términos e identificadores de la Butirilcolinesterasa. Adaptada de <http://biogps.org>

Nombre	Butirilcolinesterasa (EC 3.1.1.8)		
Símbolo	<i>BCHE</i>		
Nombres alternativos	Pseudocolinesterasa; colinesterasa sérica o inespecífica; acilcolina acilhidrolasa		
Símbolos alternativos	E1; CHE1; CHE2		
Localización <i>Citogenética</i>	3q26.1-q26.2	<i>Genómica</i>	chr3165772904-165837472 (hg38)
ADN	NC_000003.12	4 exones	64 562 pb
ARNm	NM_000055.2	5 transcritos	2 443 pb
Proteína	NP_000046		602 aa
Identificadores externos	HGNC 983 ; Entrez Gene 590 ; Ensembl ENSG00000114200 ; OMIM 177400 ; UniProtKB P06276		

I.E.1.a Historia y antecedentes

La butirilcolinesterasa fue aislada por primera vez del suero de caballo en 1930 y presentaba la característica bioquímica de hidrolizar ésteres de colina. Hay dos formas de colinesterasa que difieren según sus propiedades bioquímicas y la fracción de sangre en la que se encuentran, la plasmática y la eritrocitaria. La primera que se descubrió fue la colinesterasa específica, posteriormente llamada acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), la cual hidroliza acetilcolina y está localizada en la membrana de los eritrocitos, aunque su función mejor conocida la ejerce en la modulación de la transmisión de la señal neuronal en sinapsis colinérgicas. Más tarde, se descubrió otra enzima que metabolizaba sustratos que contienen ésteres, que se conoce como butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8), también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa inespecífica, la cual se sintetiza en el hígado y posteriormente se libera al plasma (Thomas y Job, 1972). Su función está menos definida, pero la mayoría de estudios sugieren que se encarga de eliminar de la sangre aquellos tóxicos que inhiben la AChE y, en consecuencia, alterarían la señal neuronal.

La enzima BChE es una serina hidrolasa que hidroliza ésteres de colina y también está relacionada con el metabolismo lipídico y la detoxificación de xenobióticos (B. Li et al., 2008). Recientemente se ha asociado a los factores de riesgo del síndrome metabólico, al

igual que al índice de masa corporal (IMC), el peso, el colesterol, etc. (Duysen et al., 2007; M. A. Furlong et al., 2014; Lima et al., 2013).

La deficiencia congénita de colinesterasa sérica es muy conocida por anestesistas ya que origina una reacción prolongada a agentes bloqueantes neuromusculares tales como la succinilcolina (Jensen et al., 1995). En estos casos, tales agentes no se eliminarían correctamente, provocando graves complicaciones como parálisis muscular y apnea. Debido a su papel protector frente a la exposición a OPs, con los que interacciona estequiométricamente, se ha propuesto que este biomarcador puede ser de utilidad en la vigilancia de la salud de los trabajadores de invernadero expuestos a compuestos anticolinesterásicos (insecticidas OPs y N-metilcarbamatos) con objeto de identificar aquellos que presentan baja actividad enzimática y que, por tanto, serían más susceptibles a estos plaguicidas (Oksana Lockridge y Masson, 2000).

Esterasas, tales como las CES y la BChE, juegan un papel en la protección contra la exposición a OPs debido a su capacidad para unirse a una única molécula de este compuesto. El plasma humano no contiene carboxilesterasas (B. Li et al., 2005) y, por tanto, otras proteínas, particularmente BChE, pueden desempeñar un papel importante en la eliminación de metabolitos de OPs. La BChE actúa de forma más eficaz a dosis bajas de OPs y N-metilcarbamatos, protegiendo así a la población expuesta frente a los efectos tóxicos de tales agentes. La aplicación de plaguicidas anticolinesterásicos reduce la actividad de la enzima BChE disminuyendo su efecto protector, por lo que se pensó que los trabajadores expuestos a estos tóxicos con variantes genéticas que afectan funcionalmente a BChE estarían menos protegidos (Oksana Lockridge y Masson, 2000). La determinación de esta actividad en plasma o suero se utiliza habitualmente como biomarcador para evaluar la exposición a OPs (Jintana et al., 2009). Cuando no se conoce la actividad de BChE basal (previa a la exposición), el conocimiento del genotipo permitiría identificar aquellos casos con actividad reducida y evitar así su confusión con una posible exposición excesiva a OPs (Benyamin et al., 2011).

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

I.E.1.a Gen y estructura proteica

En 1987 se clonó el ADNc (ADN complementario) que codifica la proteína BCHE de 574 aminoácidos (Arpagaus et al., 1990), repartidos en 4 subunidades idénticas. El gen *BCHE* humano tiene un tamaño de 64,56 Kb, localizado en la región cromosómica 3q26.1-q26.2 (Allderdice et al., 1991) y compuesto por 4 exones separados por tres intrones largos que ocupan en total 73 Kb. El exón 2 es el más largo y codifica el 83% de la subunidad de BCHE, incluyendo el centro activo en el aminoácido 198. Está estructuralmente relacionado con AChE, compartiendo aproximadamente un 50% de los aminoácidos.

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

Se han descrito más de 70 variantes del gen *BCHE* (R. L. R. Souza et al., 2005) de las cuales 30 causan alteración de la actividad BChE, provocando su disminución de la misma en más del 90% de los casos. La mayoría de las mutaciones de *BCHE* suceden en la región codificante del gen, dando como resultado la alteración de la actividad enzimática. Sin embargo, estas mutaciones son extremadamente raras en la población y menos aún que se encuentren en homocigosis, es decir, individuos con nula actividad de la enzima.

Las siete variantes genéticas más importantes se describen en la Tabla I-3 usual (U), atípica o dibucaína resistente (A), fluoruro resistente (F), silente (S) y tres de tipo cuantitativo, variante K (Kalow), J (James) y H (Hammersmith).

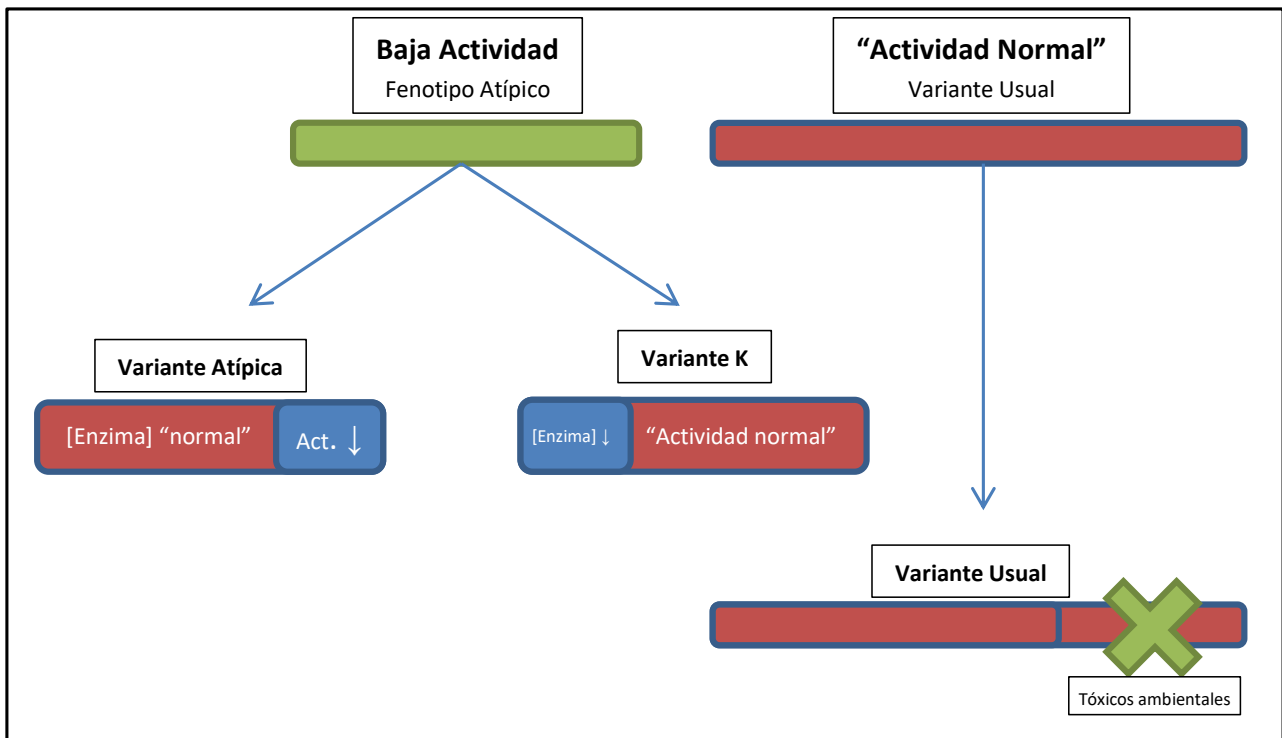
Tabla I-3. Características de las variantes genéticas más conocidas de BChE

Nombre común	Símbolo	Fenotipo	Mutación del ADN (5'→3')	Aminoácido alterado	Frecuencia*	Actividad (%)
Usual	U	-	Ninguna	Ninguno	0,870	100
Atípica	A	Dibucaína resistente	nt209(G \underline{A} T→G \underline{G} T)	Asp70Gly	0,020	70
Silente	S	Sin apenas actividad	>30 mutaciones		0,003	0-10
Fluoruro	F1	Fluoruro resistente	nt728(A \underline{C} G→A \underline{T} G)	Thr243Met	0,003	60
Fluoruro	F2	Fluoruro resistente	nt1169(G \underline{G} T→G \underline{T} T)	Gly390Val	0,003	60
Kalow	K	Cuantitativa	nt1615(G \underline{C} A→A \underline{C} A)	Ala530Thr	0,113	50
James	J	Cuantitativa	nt1490(G \underline{A} A→G \underline{T} A)	Glu497Val	raro	-
Hammersmith	H	Cuantitativa	Nt424(G \underline{T} G→A \underline{T} G)	Val142Met	raro	10

*Tabla adaptada de datos recogidos en (Goodall, 2004; Oksana Lockridge y Masson, 2000; Whittaker, 1986)

La identificación de cada una de estas variantes usando sólo análisis bioquímicos, como son los test de inhibición enzimática, no consigue abarcar todos los tipos ya que es muy complicado o casi imposible diferenciar si la baja actividad enzimática se debe a que el individuo posee una enzima con baja actividad catalítica o a que presenta menores concentraciones de enzima (Figura I-4).

Figura I-4. Esquema explicativo sobre la dificultad de diferenciar la variante atípica de la variante K



I.E.1.b Fenotipo

La actividad BChE se determina espectrofotométricamente a 240 nm por el método de Kalow y Lindsay (W. Kalow y Lindsay, 1955) usando la benzoilcolina como sustrato. Mediante el uso de diversos inhibidores, como la dibucaína (W. Kalow y Staron, 1957), el fluoruro sódico (Harris y Whittaker, 1961) y el cloruro sódico (Whittaker y Britten, 1985), se puede estimar el fenotipo sérico de BChE y así adscribir un determinado fenotipo a un individuo en concreto. Para ello se tiene en cuenta tanto la actividad benzoilcolinesterasa obtenida como los diferentes números de inhibición (Tabla I-4) (Whittaker, 1984).

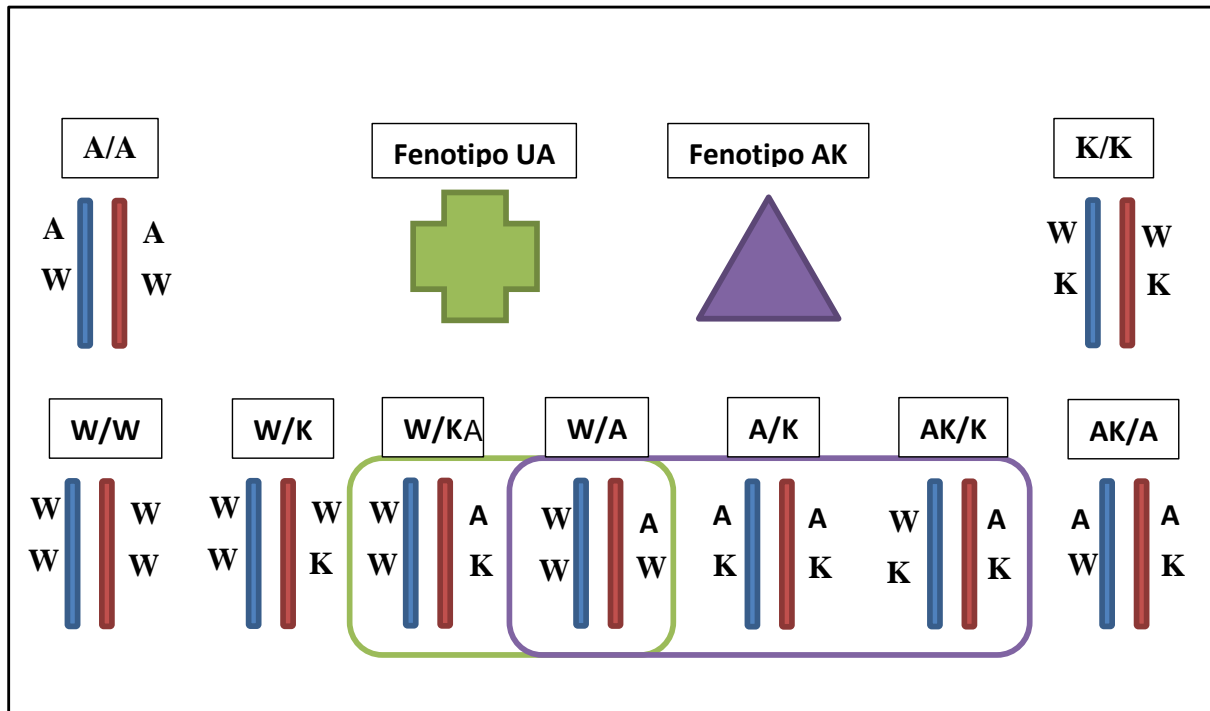
Tabla I-4 Metodología para la adscripción del fenotipo sérico de colinesterasa en cada muestra (Whittaker, 1984).

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

*(Jensen et al., 1996)

El método introducido por Kalow y Genest en 1957, basado en el número de dibucaina, es un método excelente y seguro para determinar si un individuo posee la colinesterasa atípica. El alelo atípico puede ser detectado tanto en homocigosis como en heterocigosis. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, con los test de inhibición es difícil o casi imposible determinar en algunos casos si un individuo es portador de alguna variante cuantitativa anormal. Mediante los test de inhibición de la colinesterasa sérica se puede diferenciar la variante K de la usual cuando en ambos se encuentra presente la variante atípica, esto es, se puede distinguir el fenotipo AK del UA. Sin embargo, gracias al genotipado de estos individuos se puede comprobar que el fenotipo AK corresponde a tres posibles genotipos (A/K, AK/K y W/A) y en el caso del fenotipo UA corresponde a dos posibles genotipos (W/A y W/KA). Estos conceptos se discuten y aclaran en la Figura I-5 y en el apartado I.E.1.c más adelante.

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



I.E.1.c Nomenclatura

Es necesario detenerse a explicar la nomenclatura que se usa a lo largo de este trabajo en cuanto a las abreviaturas usadas para cada haplotipo, que representa las diferentes combinaciones alélicas de los dos loci estudiados. Se tendrá en cuenta la nomenclatura propuesta por La Du et al. (1991) con algunas modificaciones. Las abreviaturas están compuestas por un sistema de dos, tres y cuatro letras, separadas por una barra oblicua (Figura I-4). La abreviatura de cuatro letras solo se usa en el caso de que el haplotipo contenga los genotipos homocigotos para las dos variantes, es el caso de AK/AK. En la abreviatura de tres letras se usa en caso que uno de los genotipos sea heterocigoto y el otro homocigoto para la variante, es el caso de AK/A y AK/K.

La modificación realizada a esta nomenclatura consistió en sustituir la letra U, la forma de representar el alelo usual, por la letra W (Wildtype) (B. N. La Du et al., 1991). Este cambio se realizó para evitar la posible confusión derivada de utilizar la letra U para denominar tanto el fenotipo y genotipo de los individuos portadores del alelo usual (Mollerup et al., 2011).

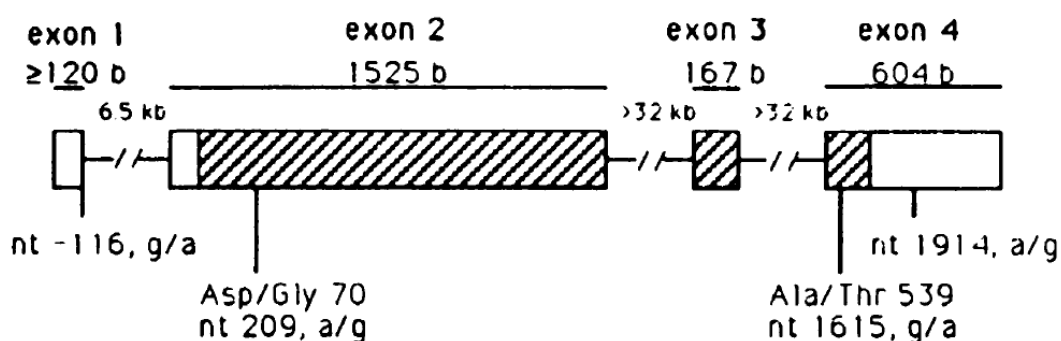
I.E.1.d Polimorfismos de BCHE

De entre los polimorfismos anteriormente citados, nos centraremos sólo en dos, ya que van a ser el objeto de nuestro estudio la variante atípica (McGuire et al., 1989) y la variante K (Bartels et al., 1992). Las características de cada variante genética se describen en la Tabla I-5, y su localización génica se indica en la Figura I-6 y Figura I-9.

Tabla I-5. Características de las variantes genéticas de estudio

Características	Variantes Genéticas	
	Atípica	Kalow
Símbolo	A	K
Actividad BChE	70% Resistente a la inhibición por dibucaína	Actividad reducida 1/3 Cuantitativa Bajos niveles de enzima
Localización	3q26 (exón 2) Cerca del centro activo	3q26 (exón 4) situado en el extremo C-terminal
Mutación	Asp70Gly nt 209(GAT/GGT)	Ala539Thr nt 1615(GCA/ACA)
SNP ID	rs1799807	Rs1803274
Frecuencia Alélica	0,02 (McGuire et al., 1989)	0,113(Rubinstein et al., 1978)
Sensibilidad	Deficiencia en la capacidad de hidrolizar succinilcolina	

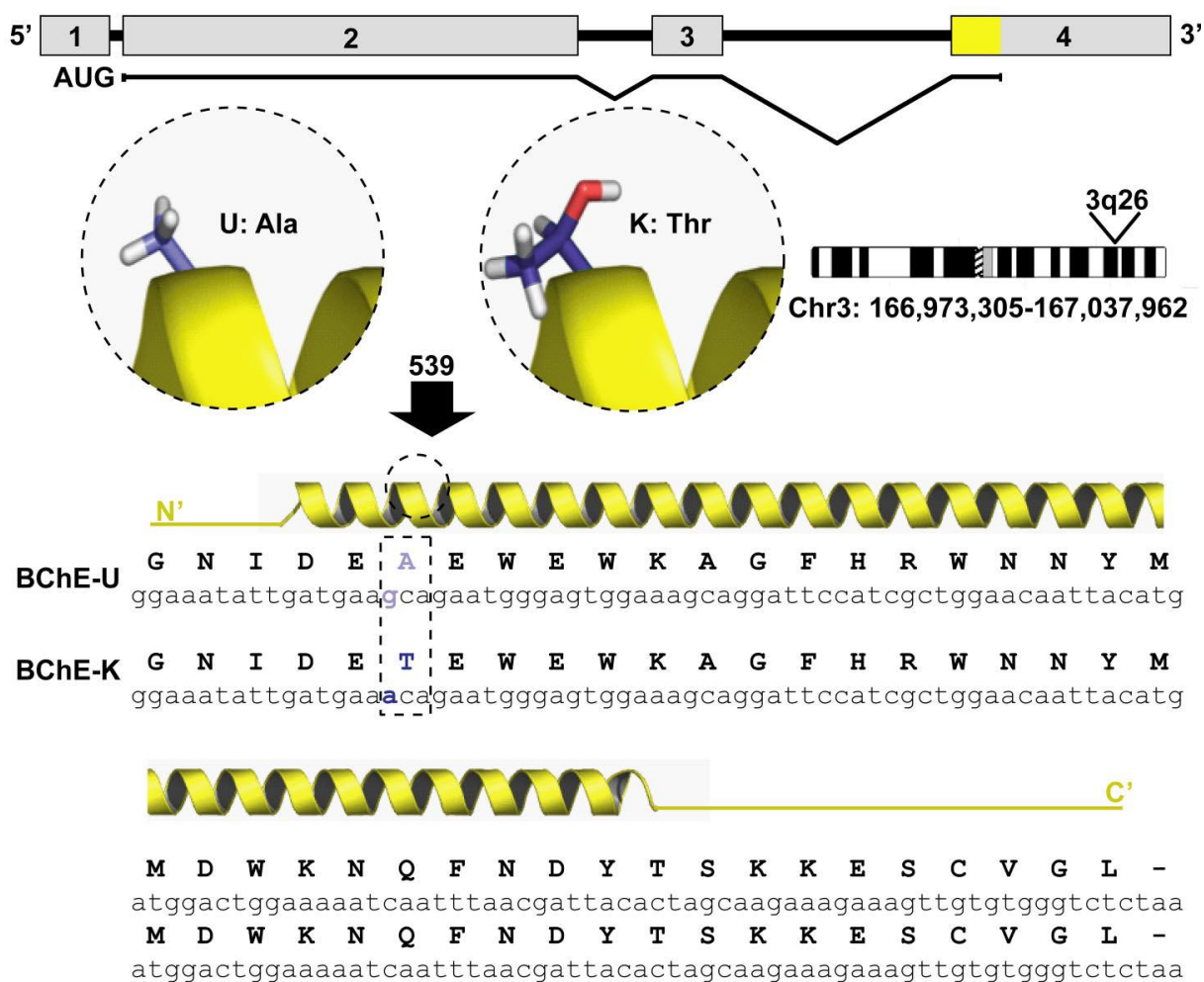
Figura I-6. Esquema del gen BCHE donde se muestra la localización de la variante atípica y K (Bartels et al., 1992).



de heterocigosis sería posible discriminar las variantes cuantitativas de la usual (Bartels et al., 1992).

Esta variante se debe a una mutación puntual (rs1803274, **GCA→ACA**) en el nucleótido 1615 del exón 4, sustituyendo el aminoácido alanina por treonina del codón 539 (Ala539Thr) situado en el extremo C-terminal, el cual es esencial para la tetramerización (Figura I-8). Ello da como resultado una menor síntesis de la proteína y, por tanto, unos niveles más bajos en sangre, lo que provoca una reducción del 7% en la actividad de la enzima en heterocigotos y el 14% en homocigotos (Podoly et al., 2009).

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

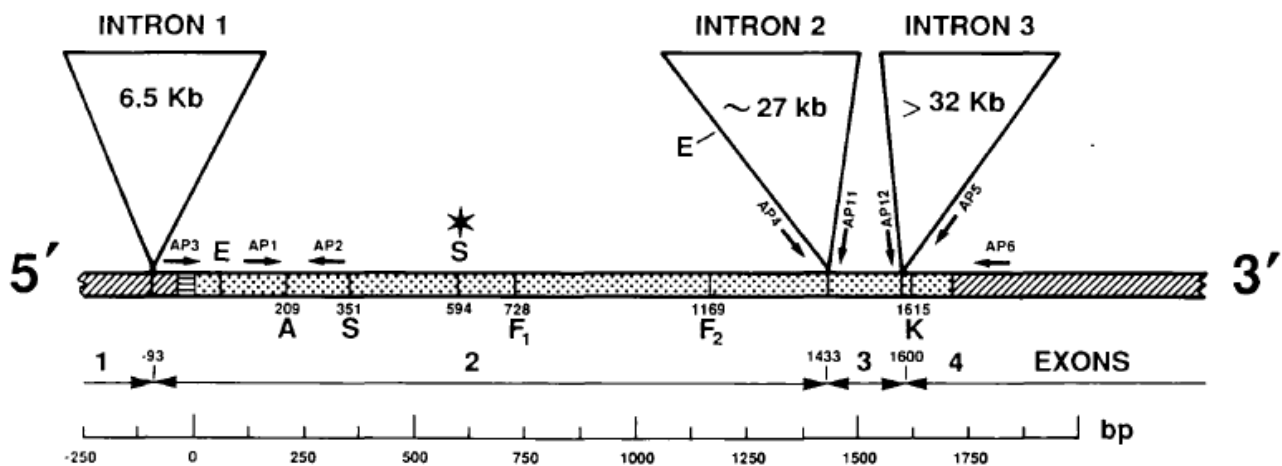


La variante K, la cual determina una menor actividad enzimática, representa el polimorfismo de *BCHE* con mayor distribución en la población, ya que aproximadamente 1 de cada 4 personas son portadoras del alelo (Costa y Eaton, 2006). Esta alta frecuencia la

convierte en la variante idónea para evaluar el mayor riesgo derivado de la exposición crónica a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa.

Aunque la reducción en la actividad de BChE debido solo a la variante K no es suficiente como para producir respuesta prolongada a succinilcolina, puede llegar a serlo si se combina con otros factores que disminuyan la actividad BChE, tales como embarazo, poca grasa corporal, enfermedades, compuestos anticolinesterásicos, etc. (Whittaker, 1986). Asimismo, la presencia conjunta de la variante atípica podría contribuir a tales efectos (Bartels et al., 1992).

Figura I-9. Esquema de la localización genómica de las variantes de BChE. (Arpagaus et al., 1990)



I.E.2 Paraoxonasa 1

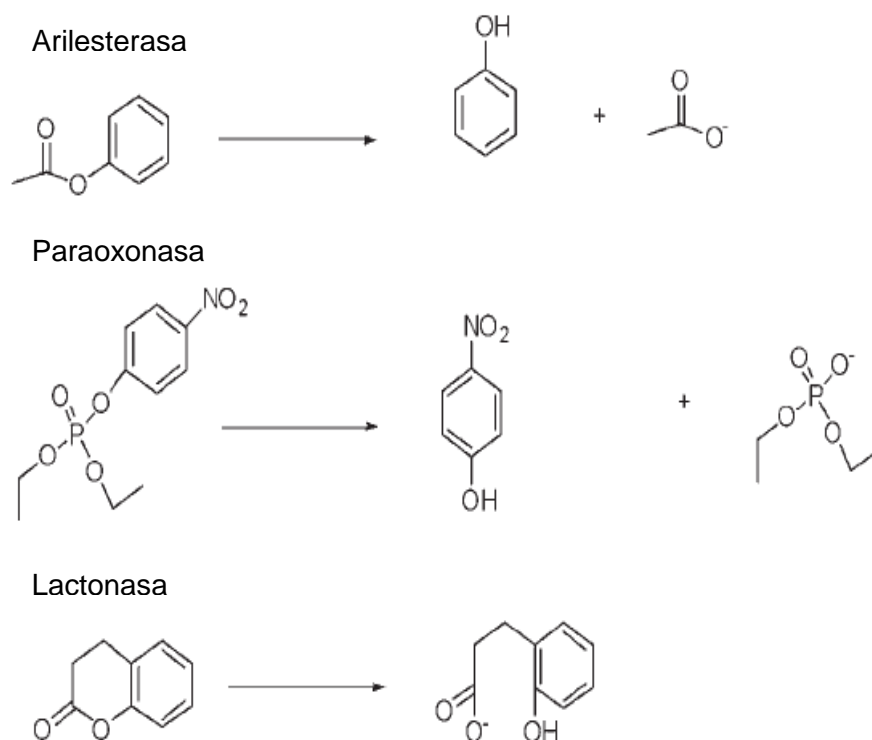
Tabla I-6. Términos e identificadores de la paraoxonasa 1. Adaptada de <http://biogps.org>

Nombre	Paraoxonasa 1 (EC 3.1.1.2)		
Símbolo	<i>PON1</i>		
Nombres alternativos	Paraoxonasa plasmática o sérica, Arilesterasa 1, Esterasa A		
Símbolos alternativos	ESA, MVCD5, PON		
Localización Citogenética	7q21.3	Genómica	chr795297676-95324707 (hg38)
ADN	NC_000007.14	9 exones	27 032 pb
ARNm	NM_000446	4 transcritos	2 568 pb
Proteína	NP_000437		355 aa
Identificadores externos	HGNC 9204 ; Entrez Gene 5444 ; Ensembl ENSG00000005421 ; OMIM 168820 ; UniProtKB P27169		

I.E.2.a Historia y antecedentes

La paraoxonasa-1 sérica humana (PON1, EC 3.1.1.2) es una enzima dependiente de calcio sintetizada en el hígado y liberada al torrente sanguíneo donde se encuentra asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se conoce también con los nombres de fosfotriesterasa, arilesterasa y lactonasa (Figura I-10). Se denominó así por su capacidad de hidrolizar el paraoxon (dietil *p*-nitrofenilfosfato, E600), metabolito activo del paration. Sin embargo, se considera una enzima promiscua ya que tiene también la capacidad de hidrolizar muchos otros sustratos tales como otros compuestos organofosforados (incluyendo gases neurotóxicos tales como sarín y somán), ésteres aromáticos no fosforados y también lactonas, que han sido considerados como sus sustratos primarios. Sin embargo, la PON1 no es capaz de hidrolizar otros compuestos OP e insecticidas *N*-metilcarbamatos (Ceron et al., 2014; Costa et al., 2013). Estudios inmunohistoquímicos han indicado la presencia de PON1 en una amplia variedad de tejidos de mamíferos (Marsillach et al., 2008), donde ejerce diversas funciones como antioxidante, antiinflamatoria, antiaterogénica, antidiabética y antimicrobiana (Bajaj et al., 2014).

Figura I-10. Esquema de las reacciones catalizadas por PON1 (Nus et al., 2008).



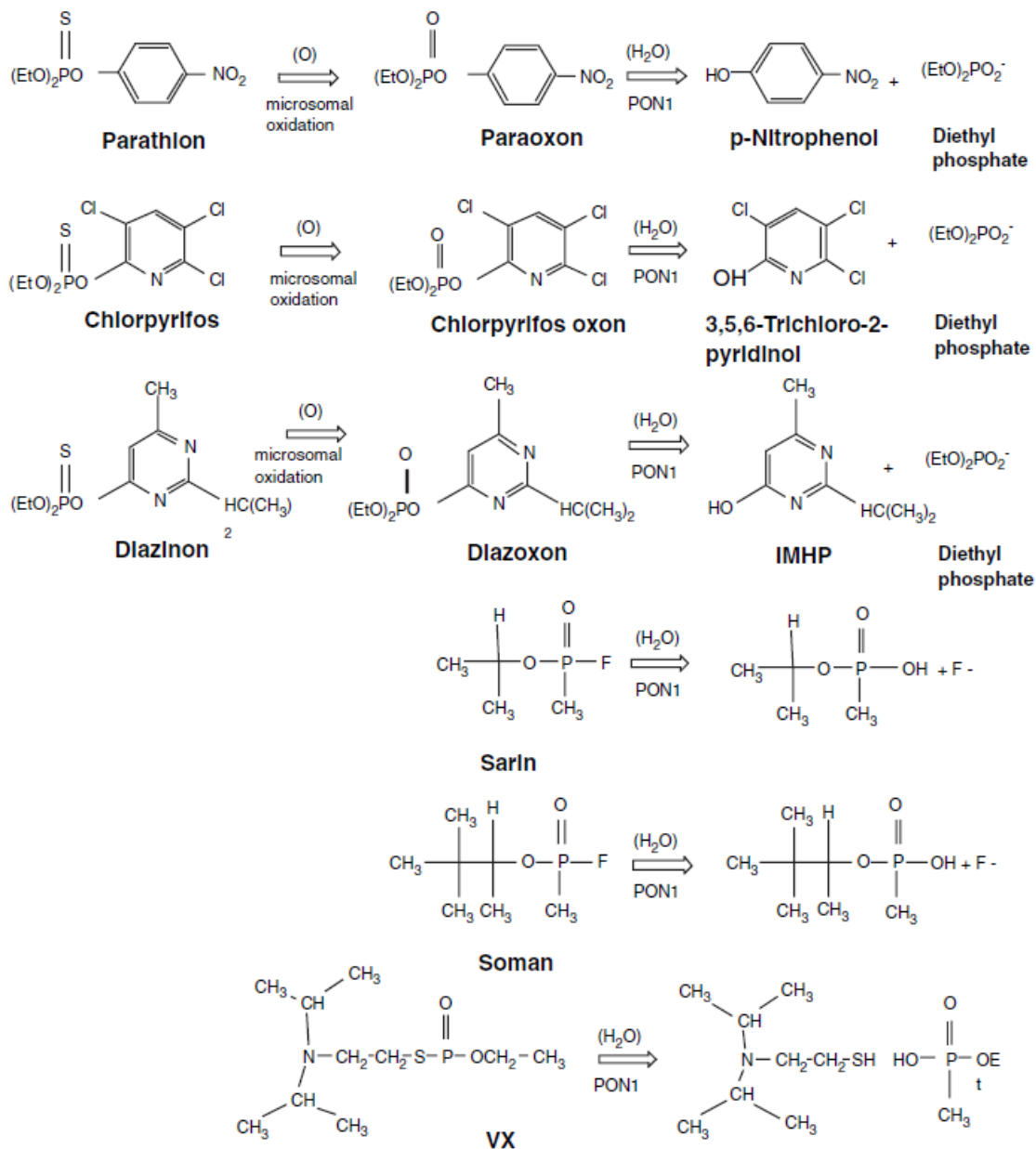
La paraoxonasa es una familia multigénica compuesta por 3 genes *PON1*, *PON2* y *PON3*. Aunque todas las paraoxonasas se expresan en una amplia variedad de tejidos de mamíferos, *PON1* y *PON3* se localizan mayoritariamente en plasma asociado a HDL, mientras que *PON2* tiene una amplia distribución a nivel celular y no se encuentra en plasma (Aviram y Rosenblat, 2004). *PON1*, *PON2* y *PON3* tienen propiedades antiaterogénicas ya que reducen las modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y de membranas celulares, debido a su propiedad de metabolizar lípidos. Sólo *PON1* puede actuar frente a organofosforados como paraoxón (Reddy et al., 2008).

El primero en describir la capacidad de los tejidos animales para hidrolizar compuestos organofosforados fue Mazur en 1946. Más tarde, en 1953 Aldridge clasificó las enzimas con esa actividad como esterasas de tipo A, para diferenciarlas de las esterasas tipo B que son inhibidas por organofosforados, tales como carboxilesterasas y colinesterasas (Aldridge, 1953; Mazur, 1946). Décadas más tarde se demostró que la *PON1* poseía actividad arilesterasa (Gan et al., 1991) debido a su propiedad para hidrolizar metabolitos activos de insecticidas organofosforados (Hernández, López, et al., 2006; Valiyaveetil et al., 2011). Su implicación en el metabolismo de lípidos fue descubierta en la década de 1990,

pues eran capaz de destruir lípidos oxidados (Draganov y La Du, 2004; B. Mackness et al., 1998; M. I. Mackness et al., 1991).

La más estudiada de las 3 paraoxonasas es la PON1, clasificada como una arildialquilfosfatasa (EC 3.1.8.1) (B. Mackness et al., 1998), de gran interés por su capacidad para hidrolizar los metabolitos activos (oxones) de diferentes insecticidas organofosforados como paratión, diazinon y clorpirifos (Figura I-11). Diversos estudios indicaron diferentes niveles en la actividad hidrolítica plasmática del metabolito paraoxón entre individuos (Eckerson et al., 1983; Mueller et al., 1983; Playfer et al., 1976), lo que sugería una posible susceptibilidad diferencial de base genética a la toxicidad a OPs. La presencia de varios polimorfismos genéticos en el gen *PON1* afectan a la expresión y la actividad de la enzima; sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han centrado en dos polimorfismos de la región codificante (Q192R y L55M) y de la región promotora (-108C/T), que detallarán en el siguiente apartado (C. E. Furlong et al., 2016).

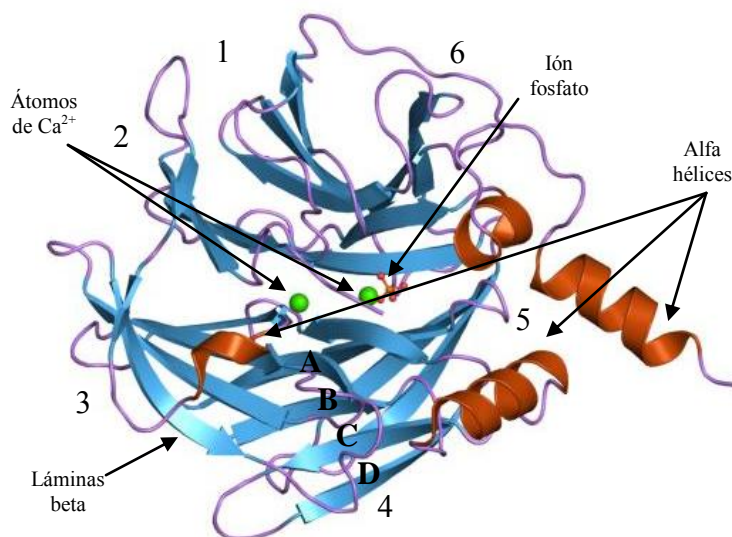
Figura I-11. Vía de detoxificación de componentes organofosforados. En el caso de los gases neurotóxicos (sarín y somán) no requiere de bioactivación, y son hidrolizados directamente por PON1. (Costa y Eaton, 2006)



I.E.2.b Gen y estructura proteica

PON1 es una glicoproteína compuesta de 354 aminoácidos (Hassett et al., 1991), una masa molecular de aproximadamente 43 KDa y una estructura de seis dominios propulsores de lámina beta plegada (nombrados del 1 al 6), cada uno formado a su vez por cuatro láminas beta (nombrados como A, B, C y D), y tres alfa hélices que participan en la unión a HDL. La estructura consta de 2 iones de calcio que son esenciales para la actividad catalítica y la estabilidad de la enzima (Figura I-12) (Harel et al., 2004, 2007).

Figura I-12 Estructura cristalina de la PON1 humana. Fuente RCSB Protein Data Bank



Los genes *PON1*, *PON2* y *PON3* se localizan en tándem en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.3-22.1). Comparten aproximadamente el 70 % de los nucleótidos y, en el caso de sus productos proteicos, el 60 % de la secuencia de aminoácidos. El gen *PON1* se localiza entre los nucleótidos 95 297 676 y 95 324 707 según la última versión de ensamblaje hg38 y está formado aproximadamente por 26 Kb. El gen está formado por 9 exones y 8 intrones, con una zona de repetición de los nucleótidos C - A en el cuarto intrón, cuyo tamaño varía por encima de 4 unidades de C - A. La región 5' - UTR no contiene ninguna caja TATA (Clendenning et al., 1996; Primo-Parmo et al., 1996).

I.E.2.c Polimorfismos de PON1

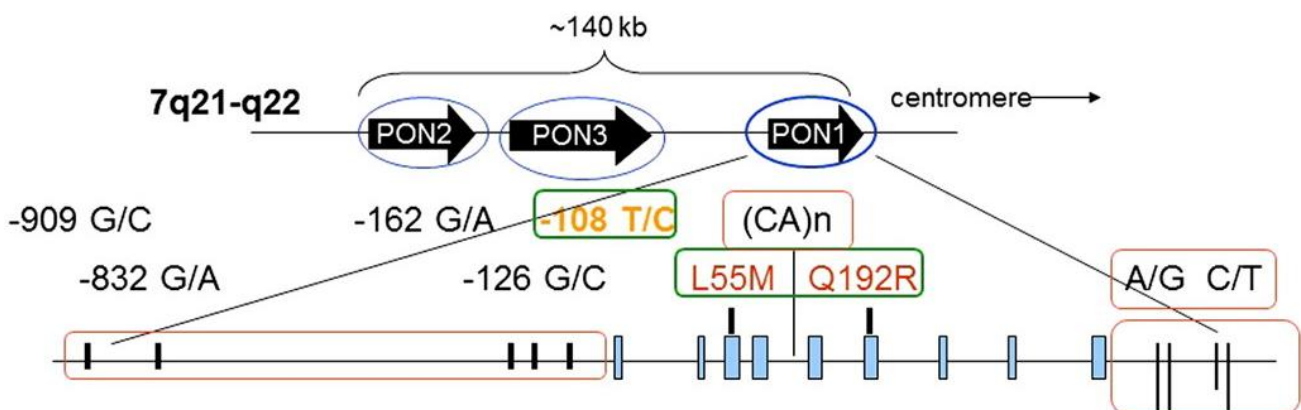
Existe una considerable variación interindividual en la actividad plasmática de PON1 de base principalmente genética (Fridman et al., 2011; Hernández, Gómez, et al., 2006). Se han descrito cerca de 200 SNPs en *PON1*, según la base de datos dbSNP (Sherry et al., 2001). Los polimorfismos de *PON1* más estudiados son Q192R (rs662; 575A>G, exón 6) y L55M (rs854560; 163T>A, exón 3) en la región codificante, y -108C/T (rs705379; -108C>T) en la región promotora (Figura I-13).

El polimorfismo Q192R resulta de una sustitución de una glutamina (alelo Q) por una arginina (alelo R), el polimorfismo L55M es el resultado de la sustitución de una leucina (alelo L) por una metionina (alelo M), y el polimorfismo -108C/T es una sustitución de una citosina (C) por la timina (alelo T) (Costa et al., 2013). El polimorfismo Q192R determina

un efecto en la actividad catalítica del enzima dependiente de sustrato. En algunos sustratos como el paraoxón, el alelo 192R lo hidroliza más rápido, mientras que en el caso del diazoxón el alelo 192Q lo hidroliza con mayor rapidez (Deakin et al., 2002). En cambio, los polimorfismos L55M y -108C/T están asociados con diferencias en las concentraciones en suero. El alelo 55L se asocia con concentraciones más altas tanto a nivel de ARNm como de proteína sérica comparado con el 55M (Leviev et al., 1997). El alelo -108C de la región promotora también se asocia a una mayor actividad enzimática que el alelo -108T (Leviev y James, 2000), debido a que es una zona de unión al factor de transcripción Sp1, lo cual tiene un importante efecto sobre la expresión de PON1.

El polimorfismo genético Q192R determina la eficacia catalítica de la hidrólisis de paraoxón. Aunque este polimorfismo no afecta significativamente la eficacia catalítica del fenilacetato (actividad arilesterasa) o del diazoxon (DZO), sí afecta la del paraoxón, clorpirifos oxon y los agentes nerviosos sarin y somán (Furlong et al., 2016)

Figura I-13. Polimorfismos genéticos de PON1 (M. I. Mackness y Mackness, 2015)



I.E.3 Citocromos P450

Tabla I-7. Términos e identificadores de los CYP450 del presente estudio. Adaptada de <http://biogps.org>

Nombre	Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia C Isoenzima 19		
Símbolo	<i>CYP2C19</i>		
Nombres alternativos	S-Mefenitoína 4-hidroxilasa, Monooxigenasa Microsomal		
Símbolos alternativos	CPCJ, CYP2C, CYPIIC17, CYPIIC19, P450C2C, P450IIC19		
Localización <i>Citogenética</i>	10q23.33	<i>Genómica</i>	chr1094762624-94853260 (hg38)
ADN	NC_000010.11	9 exones	90 637 pb
ARNm	NM_000769	2 transcritos	1 901 pb
Proteína	NP_000760		490 aa
Identificadores externos	HGNC 2621 ; Entrez Gene 1557 ; Ensembl ENSG00000165841 ; OMIM 124020 ; UniProtKB P33261		
Nombre	Citocromo P450 Familia 2 Subfamilia D Isoenzima 6		
Símbolo	<i>CYP2D6</i>		
Nombres alternativos	Debrisoquina 4-hidroxilasa, Flavoproteína unida Monooxigenasa		
Símbolos alternativos	CPD6, CYP2D, CYP2D7AP, CYP2D7BP, CYP2D7P2, CYP2D8P2, CYP2DL1, CYPIID6, P450-DB1, P450C2D, P450DB1		
Localización <i>Citogenética</i>	22q13.2	<i>Genómica</i>	chr2242126499-42130906 (hg38)
ADN	NC_000022.11	9 exones	9 723 pb
ARNm	NM_000106	5 transcritos	1 684 pb
Proteína	NP_000097.3		497 aa
Identificadores externos	HGNC 2625 ; Entrez Gene 1565 ; Ensembl ENSG00000100197 ; OMIM 124030 ; UniProtKB P10635		
Nombre	Citocromo P450 Familia 3 Subfamilia A Isoenzima 51, Pseudogen		
Símbolo	<i>CYP3A1</i>		
Nombres alternativos	Citocromo P450 Familia 3 Subfamilia A Isoenzima 5, Pseudogen 1		
Símbolos alternativos	CYP3A5-de13c, CYP3A5-de1b2b, CYP3A5P1, CYP3AP51		
Localización <i>Citogenética</i>	7q22.1	<i>Genómica</i>	Chr799685145-99700034 (hg38)
ADN	NC_000007.14	3 exones	15 097 pb
ARNm	Sin datos	1 transcrito	256 pb
Proteína	No codifica proteína		
Identificadores externos	HGNC 42418 ; Entrez Gene 1578 ; Ensembl ENSG00000282277		

1.E.3.a Historia y antecedentes

La biotransformación es un paso crítico en las vías de detoxificación y eliminación de xenobióticos. Moléculas altamente lipofílicas difícilmente pueden eliminarse del organismo debido a su capacidad de reabsorción pasiva a nivel renal y a su elevada unión a proteínas plasmáticas que limita tanto la filtración glomerular como la excreción biliar.

Las enzimas que metabolizan compuestos xenobióticos se han clasificado históricamente en dos categorías las de fase I, cuya principal función es oxidar tales compuestos, y las de fase II, que tienen la misión de conjugar los sustratos con otros compuestos. La mayoría de sustancias químicas experimentan en el interior del organismo una reacción de oxidación catalizada por las monooxigenasas microsomales, dependientes de citocromos P450 o monooxigenasas que contienen flavina (FMO). Estas reacciones se denominan de fase I y normalmente permiten que ocurran con posterioridad reacciones de conjugación con diversos sustratos endógenos (reacciones de fase II) que facilitan la exportación del metabolito a la bilis o la orina con menor posibilidad de reabsorción. Sin embargo, para algunas moléculas, la reacción de oxidación inicial representa una etapa de bioactivación. Esto generalmente implica la formación de una molécula primaria (por reacciones de fase I) o secundaria (reacciones de fase II), químicamente reactiva y capaz de reaccionar con macromoléculas celulares, interrumpir la homeostasis celular y producir la muerte o transformación cancerosa de las células. Por lo tanto, el tiempo y la gravedad de los efectos tóxicos atribuibles a un xenobiótico están, en cierta forma, determinados por la eficacia del proceso metabólico catalizado por las reacciones de biotransformación. Como muchas de las enzimas implicadas en las reacciones de fase I (P450/FMO) y fase II (glutación S-transferasas (GST) y N-acetiltransferasas (NAT) entre otras) presentan polimorfismos genéticos que determinan una mayor o menor actividad catalítica, las diferencias interindividuales en la expresión y función de las mismas influyen en el mayor o menor riesgo de desarrollar efectos adversos tras la exposición a xenobióticos (Hodgson, 2010).

La mayor o menor acción de las reacciones de fase I y II va a tener como consecuencia que las sustancias exógenas que llegan a la célula, ya sean agentes terapéuticos, drogas o carcinógenos, resulten inocuos o tengan un efecto tóxico o un efecto beneficioso y eficaz. Estas sustancias son reconocidas por las células como señales exógenas y pueden entrar en ellas mediante diversos mecanismos, principalmente difusión pasiva o mediante transporte activo, con el concurso de proteínas de membrana denominadas transportadores. Una vez en el interior de las células actúan inicialmente las enzimas de fase I (principalmente de la

superfamilia del CYP450). Los metabolitos que se generan, así como las propias moléculas no metabolizadas, pueden actuar sobre sus dianas celulares o moleculares y ser eficaces. Por el contrario, pueden resultar tóxicos para la célula en caso de producir uniones covalentes a proteínas y ácidos nucleicos, o por perturbar el ciclo celular como consecuencia de inducir estrés oxidativo (Costa y Eaton, 2006).

El que una droga, carcinógeno o agente terapéutico resulte inocuo para la célula, impidiendo su efecto beneficioso o perjudicial, va a depender de la cantidad de metabolitos primarios formados, de su estabilidad química y de la presencia cercana de enzimas de fase II. Si estas pueden actuar, formarán conjugados que serán excretados de la célula, de manera que el compuesto químico no tendrá ninguno de los efectos mencionados. Además, muchos de ellos pueden actuar como agonistas o antagonistas para inducir o reprimir los genes que codifican enzimas de fase I y fase II. Esto les va a permitir regular su propio metabolismo (Liska et al., 2006).

I.E.3.b Gen y estructura proteica

Entre las enzimas de biotransformación de fase I, la superfamilia Citocromo P450 (CYP450, EC 1.14.14.1) exhibe una considerable diversidad catalítica y son probablemente las enzimas más importantes de la biotransformación de muchas sustancias endógenas como colesterol, ácidos biliares, esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles. Asimismo, también son responsables de la biotransformación de sustancias exógenas (xenobióticos), fármacos, plaguicidas, procarcinógenos, anestésicos, disolventes orgánicos, etc.

El complejo CYP450 es una hemoproteína que se encarga de transportar electrones localizada principalmente en la membrana del retículo endoplasmático y mitocondria, aunque se ha encontrado en la mayoría de membranas celulares. Está formada por una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo (grupo prostético) que contiene un átomo de hierro. La letra “P” de su nombre proviene de *pigment* (pigmento), y el número corresponde a su máxima absorbancia espectral que es de 450 nm (Omura, Tsuneo; Sato, 1964).

Los CYP450 catalizan predominantemente reacciones oxidativas y también, aunque en menor medida, de reducción, en las que se requiere oxígeno molecular y NADPH (coenzima). Se trata de reacciones de monoxigenación en las que se incorpora uno de los átomos de oxígeno a la molécula del sustrato y el otro es reducido a agua gracias a los hidrogeniones que aporta el NADPH. Este proceso de hidroxilación del sustrato tiene

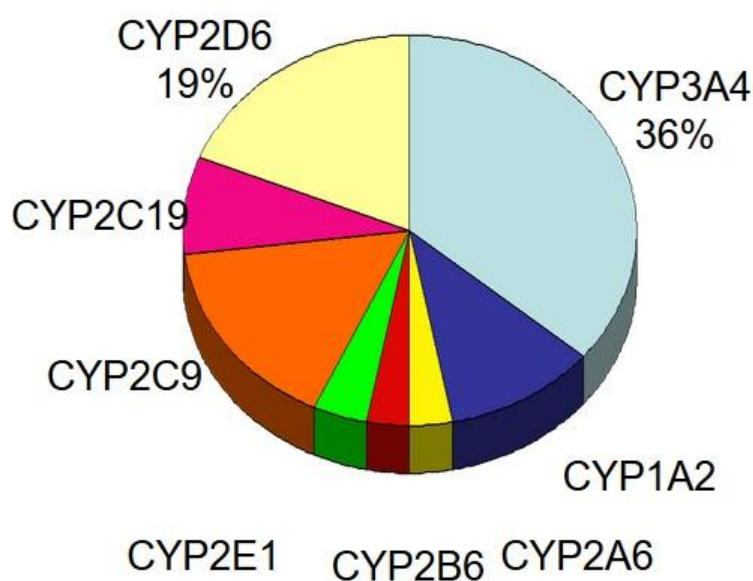
como finalidad generar productos más solubles en agua que pueden ser excretados directamente, o después de sufrir reacciones de conjugación, por la bilis o la orina.

Los CYP450 exhiben regiones altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos, por lo que basándose en esta homología, se clasifican en familias cuando contiene más del 40% de similitud de secuencia y en subfamilias cuando contiene más del 55% de secuencia compartida. La nomenclatura utilizada para CYP450 se designa mediante las letras "CYP" seguida de un número arábigo que indica la familia de genes, una letra que corresponde a la subfamilia y en tercer lugar otro número arábigo que indica el gen. El mismo número del gen significa que los genes tienen la misma función y están altamente conservados (Sim y Ingelman-Sundberg, 2013).

En la secuencia del genoma humano se han identificado más de 100 genes de CYP450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), de los cuales algo más de la mitad son activos y el resto son pseudogenes (Nelson, 2009). Se pueden dividir en tres grupos el primero incluye de CYP5 a CYP51 con alta afinidad para metabolizar sustratos endógenos y están muy bien conservados a lo largo de la evolución. El segundo grupo contiene la familia CYP4 que metaboliza ácidos grasos y sustratos relacionados así como algunos xenobióticos. El tercer grupo de familias abarca CYP1 a CYP3 (Figura I-16, más adelante), responsables de la metabolización de cerca del 80% de los fármacos utilizados en clínica (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4), así como de una amplia variedad de xenobióticos (Figura I-14). Este grupo tiene la peculiaridad de poseer gran variabilidad interindividual en su actividad catalítica, debido a polimorfismos genéticos o a variabilidad en los niveles de expresión (Tabla I-8).

Los CYP450 se distribuyen de forma variable en diferentes tejidos como riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, aunque la mayor encuentra en el hígado, donde alrededor del 70% de los CYP450 pertenecen a las familias CYP1 a CYP3. La isoforma más abundante del hígado es la CYP3A4, que representa un 30% del total de CYP450 hepático.

Figura I-14. Proporción de fármacos metabolizados por CYP450s (Wrighton y Stevens, 1992)



Entre sus sustratos se incluyen una gran variedad de moléculas, de diferente tamaño o peso molecular, planas o globulares y que pueden contener o no heteroátomos. Esta amplia especificidad de sustrato se debe a la gran cantidad de isoformas existente, en la que cada una metaboliza su propio conjunto de compuestos relacionados estructuralmente. Además, un mismo xenobiótico puede ser metabolizado por diferentes isoformas dando lugar a metabolitos similares o diferentes. Otra de las características es su capacidad para ser inducido de forma selectiva por los mismos u otros xenobióticos (Zanger y Schwab, 2013).

I.E.3.c Fenotipo

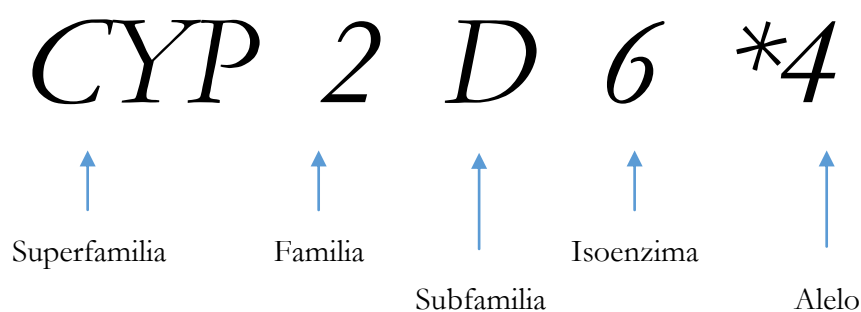
La menor tasa de eliminación como resultado de la baja actividad de CYP450 puede aumentar la toxicidad de muchos tóxicos ambientales. Uno de los sustratos de gran interés en este trabajo son los plaguicidas. Estos son biotransformados en productos intermediarios activos a través de reacciones catalizadas por diversos CYP450. Se ha descrito que polimorfismos genéticos de estas enzimas pueden contribuir a diferencias en la susceptibilidad a plaguicidas y, por tanto, a un mayor riesgo de toxicidad ocasionando efectos agudos y/o crónicos (Mutch y Williams, 2006). Estas enzimas catalizan principalmente la desulfuración oxidativa de los organofosforotioatos a los correspondientes oxones (metabolitos activos) y también median la detoxificación de varios OPs (por ejemplo mediante la reacción de desarilación en el caso del clorpirifos) (C. E. Furlong, 2007). Los principales CYP450 implicados en la bioactivación y detoxificación de

algunos OPs son CYP1A2 y las isoenzimas de la familia CYP2 y subfamilia CYP3A. La actividad hepática de las diferentes isoenzimas de CYP450 va estar influenciada por el perfil genético de cada individuo, afectado a la formación del oxón y a su concentración en el organismo. Tal información será útil para la evaluación del riesgo por exposiciones a OPs, prediciendo con mayor exactitud el mayor riesgo por susceptibilidad genética a la toxicidad de OPs (Mutch y Williams, 2006).

I.E.3.d Nomenclatura

Como se ha comentado anteriormente, la nomenclatura para denominar las diferentes isoenzimas de CYP450 está muy consensuada. Lo mismo sucede con sus polimorfismos (<http://www.cypalleles.ki.se/>) (Sim y Ingelman-Sundberg, 2010), en los que se utiliza la designación "*" al final del nombre del gen seguida de un número para describir los alelos alternativos presentes en > 1% de una determinada población. Por ejemplo, *CYP2C9* incluye un alelo de tipo salvaje (*CYP2C9*1*) cuya proteína resultante posee una actividad enzimática normal. Por otro lado también tiene varios alelos alternativos (ej. *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*) localizados en diferentes puntos del gen, rs1799853 y rs1057910 respectivamente, y que designa un cambio concreto de un nucleótido con respecto al alelo salvaje, 430C>T y 1075A>C respectivamente. Cada uno de los alelos alternativos da como resultado una proteína anómala y por tanto con actividad enzimática alterada. Para denominar los genotipos de cada polimorfismo se utiliza como referencia el alelo salvaje *1, es decir *CYP2C9*1/*1* serían los homocigotos salvajes; mientras que *CYP2C9*1/*2* y *CYP2C9*1/*3* serían los heterocigotos (también se pueden denominar *CYP2C9*2/*3* cuando se analizan juntos). Por su parte, *CYP2C9*2/*2* y *CYP2C9*3/*3* serían los homocigotos alternativos.

Figura I-15. Ejemplo de nomenclatura de las enzimas citocromo P450. Modificado de (Wijnen et al., 2007)



I.E.3.e Polimorfismos de CYP450

Los polimorfismos en los genes de la familia de enzimas citocromo P450 conducen a la aparición de distintas clases fenotípicas de respuesta a fármacos o tóxicos (Arvanitidis et al., 2007), que van desde

- La pérdida de la actividad enzimática catalítica en individuos defectuosos que poseen dos alelos, denominados metabolizadores lentos (PM).
- La actividad enzimática disminuida en individuos que posee un alelo defectuoso y uno funcional, llamados metabolizadores intermedios (IM).
- La función normal de la enzima en individuos que poseen dos alelos funcionales, denominados metabolizadores rápidos (EMs).
- La actividad enzimática aumentada en individuos que expresan múltiples copias del alelo funcional, llamados metabolizadores ultrarrápidos (UM).

Hay gran cantidad de familias de CYP450 que participan el metabolismo de plaguicidas y que dan como resultado metabolitos tóxicos capaces de potenciar sus efectos perjudiciales. Los polimorfismos más importantes que afectan a la biotransformación de plaguicidas se encuentran en los genes que codifican las isoformas CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5 y CYP2B1 (Bozina et al., 2009). Además, existe una notable variabilidad en la distribución de alelos entre diferentes grupos étnicos, dando como resultado diferentes proporciones de metabolizadores lentos, intermedios y rápidos en cada población (Zhou et al., 2009). La alteración de la actividad de CYP2E1 modifica el riesgo a padecer diferentes tipos de cáncer (Bolognesi, 2003). En el caso de trabajadores de invernadero no se ha demostrado que el daño al ADN se vea influenciado por polimorfismos genéticos de isoformas concretas de CYP450, como es el caso de CYP1A1 (Paz-y-Miño et al., 2004), pero sí en individuos con exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos por medio del humo del tabaco causando cáncer de pulmón (Moorthy et al., 2015). Sin embargo, otros estudios describen esta alteración como una sinergia entre polimorfismos genéticos de CYP2D6 y otros como CYP1A2, 2B6, 2C19 y 3A4 (Satyender Singh, Kumar, Vashisht, et al., 2011). El paratión, por su parte, es transformado a paraoxón gracias a la intervención de CYP2C8, CYP3A4/5, CYP2D6 y CYP1A2 (Nebert, 2005). Dado que los oxones derivados de OPs se hidrolizan por PON1, los polimorfismos en los diferentes genéticos de esta enzima pueden contribuir a la toxicidad final. Además, algunos estudios han propuesto que los metabolizadores lentos de CYP2D6 tienen un riesgo dos veces mayor de enfermedad de

Parkinson como consecuencia de la exposición a plaguicidas en comparación con los metabolizadores intermedios o rápidos; en cambio, en ausencia de la exposición a plaguicidas, los metabolizadores lentos no tenían mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Elbaz et al., 2004).

Tabla I-8. Principales CYP450s de metabolización de fármacos en el hígado humano [adaptación de (Zanger y Schwab, 2013)]

CYP	Abundancia en hígado (%) ¹	Variabilidad Interindividual	Expresión	Metabolismo de fármacos (%)
1A2	10	30	Inducible, polimórfico	4
2A6	5	100	Polimórfico	<1
2B6	1	50	Inducible	<1
2C8	<1	30	Polimórfico	<1
2C9	15	30	Polimórfico	11
2C19	4	30	Polimórfico	6
2D6	4	200	Polimórfico	25
2E1	10	50	Inducible, polimórfico	4
3A4	30	80	Inducible, polimórfico	50
3A5	<1	-	Inducible, polimórfico	<1

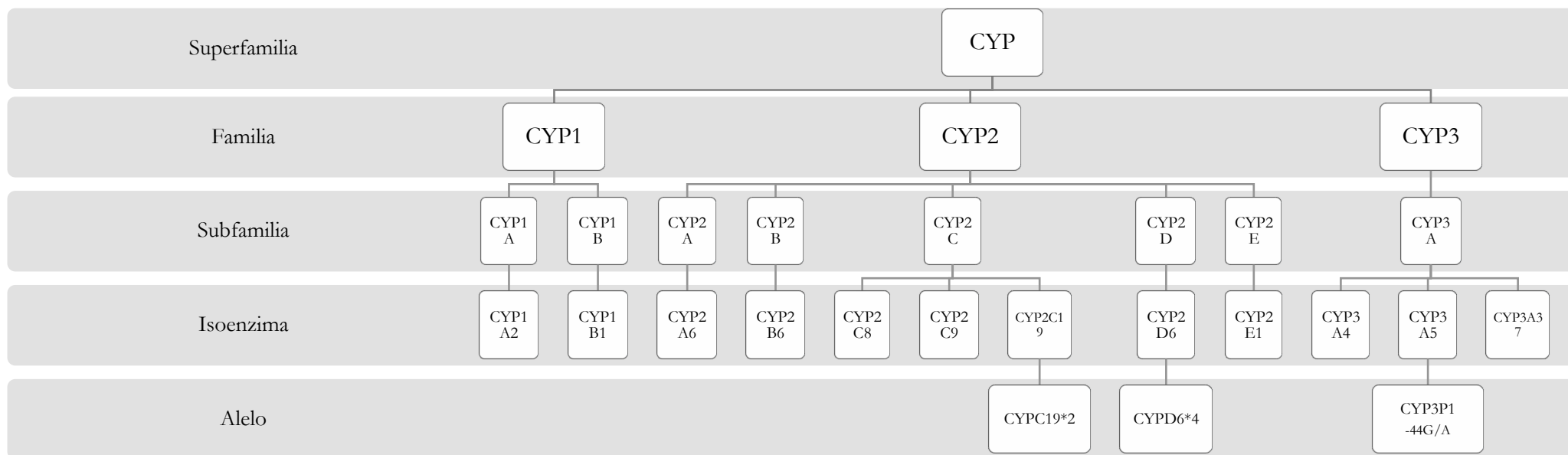
¹ Estimación del contenido relativo en hígado humano de cada enzima P450 con respecto al P450 total (Shimada et al., 1994).

² Variabilidad de los niveles de cada enzima en el hígado de diferentes individuos (Clarke, 1998).

³ Estimación de la participación de cada encima en el metabolismo de fármacos en el hombre (Smith et al., 1998).

El presente trabajo se va a centrar en polimorfismos concretos de las familias CYP2 y CYP3, concretamente *CYP2C19*2* (G681A), *CYP2D6*4* (G1846A) y *CYP3A4*3* (-44G/A) (Figura I-16). Para una mejor comprensión del motivo de dicha elección se van a desarrollar las características de cada una de las enzimas y los efectos de sus polimorfismos en su actividad.

Figura I-16. Relación y nomenclatura de los miembros de CYP450 más importantes en el metabolismo humano de drogas. Reflejando los alelos del presente estudio. [Adaptación de (Nassar et al., 2008)]



I.E.3.e.i CYP2C19*2 - rs4244285 (A)

La subfamilia CYP2C representa cerca del 20% del contenido total de CYP450 en hígado humano, siendo el más abundante CYP2C9, seguido entre otros de CYP2C19, con un 5%, que metaboliza el 3% de todos los fármacos comercializados. Hay más de 25 alelos diferentes del gen *CYP2C19*, de los cuales el *CYP2C19*2* (G681A) codifica variantes inactivas de la enzima cuyos portadores son considerados como metabolizadores lentos (PM). En la población caucásica, el 85% de los PM son homocigotos para *CYP2C19*2*, mientras que dicho alelo representa del 2-5% en la población africana, y el 20% en la población asiáticas (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

El CYP2C19 contribuye al metabolismo de diversos contaminantes ambientales (Povey, 2010), incluyendo algunos insecticidas OPs como clorpirifos (Foxenberg et al., 2007).

I.E.3.e.ii CYP2D6*4 - rs3892097 (A)

La subfamilia CYP2D contiene cuatro pseudogenes y un único gen, el *CYP2D6*, que se expresa principalmente en hígado y, en menor medida, en duodeno y cerebro. A pesar de representar sólo el 2% del total del contenido CYP450, metaboliza cerca del 25% de todos los fármacos. Existen más de 80 variantes alélicas del gen, la mayor parte de las cuales afectan a la actividad de la proteína (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). Aunque la mayoría de los CYP450 implicados en la biotransformación de xenobióticos son inducibles, CYP2D6 es el único que no lo es, por lo que la variación genética contribuye en gran medida a la variabilidad interindividual de la actividad enzimática.

La distribución del fenotipo de CYP2D6 en la mayoría de las poblaciones tiene su mayor representación en EMs (actividad normal), del 5 a 30% son IMs (actividad disminuida) y del 0 al 8% son PMs (actividad suprimida) (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Sin embargo, en el caso del fenotipo metabolizador ultrarrápido (UM) hay mayores diferencias debido a la aparición de múltiples copias del gen. En el Noreste de África (genotipo *CYP2D6*2×N*) y Oceanía (genotipo *CYP2D6*1×N*) se han seleccionado duplicaciones de genes con una prevalencia mucho más alta del fenotipo UM (Nassar et al., 2008).

Las variantes alélicas más comunes en los caucásicos y que dan como resultado un fenotipo PM, son *CYP2D6*3,*4* y **6*. En *CYP2D6*4* hay una transición de guanina a adenina en el nucleótido 1934 (último nucleótido del intrón 3), produciendo un defecto de empalme que

provoca una interrupción en el marco de lectura, lo que genera un codón de parada prematuro responsable de una proteína truncada no funcional (Hanioka et al., 1990).

El *CYP2D6* se ha asociado al metabolismo de algunos plaguicidas, como insecticidas organofosforotioatos (diazinon, paration, clorpirifos, sulprofos, disulfoton), insecticidas carbámicos (metiocarb) y los herbicidas (atrazina diurón) (Abass, 2010). En un estudio reciente, se encontró que el alelo 1934A de *CYP2D6* estaba relacionado con una mayor susceptibilidad a la toxicidad crónica por exposición a organofosforados en trabajadores egipcios (Tawfik Khattab et al., 2016).

I.E.3.e.iii CYP3AP1 -44G/A

La subfamilia *CYP3A* es muy importante porque metaboliza cerca del 55% de los fármacos. La isoforma *CYP3A4* representa el 30% del contenido total de *CYP450* y se expresa en el hígado e intestino delgado. Otras isoenzimas de la subfamilia son *CYP3A7* y *CYP3A5* (aunque el *3A7* se encuentra preferentemente en el hígado fetal). Todos se hallan agrupados en una zona estrecha del brazo corto del cromosoma 7.

El *CYP3A5* tiene una amplia distribución de tejidos, pero se expresa en menor medida que el *CYP3A4*. Alrededor del 20% de las personas expresan *CYP3A5* en el hígado donde metaboliza una amplia gama de xenobióticos incluyendo algunos OPs (Foxenberg et al., 2007; Peck y Eaton, 2010). El polimorfismo en *CYP3A5* puede contribuir al riesgo de desarrollar diferentes enfermedades debido al metabolismo de xenobióticos en tejidos distintos del hígado (Lamba et al., 2002).

El alelo *CYP3A5*3* (A6986G) es muy frecuente, con una frecuencia del 90% en población caucásica (Lamba et al., 2002). En homocigosis está fuertemente correlacionado con la menor expresión y actividad de la proteína *CYP3A5* en intestino e hígado (P. Wang et al., 2010). El polimorfismo en la región promotora *-44G* (rs2177180) del pseudogen *CYP3AP1* se ha relacionado con el defecto de empalme de *CYP3A5*3*, dando como resultado la ausencia de *CYP3A5* en los tejidos de algunas personas (Kuehl et al., 2001; Paulussen et al., 2000). Los individuos homocigotos para el alelo *-44A* tienen menor actividad de *CYP3A5* que los heterocigotos *-44GA*, mientras que el homocigoto para el alelo *-44G* muestra la mayor actividad. La estrecha asociación entre los alelos *CYP3AP1 -44A* y *CYP3A5 6986G* es consecuencia de un fuerte desequilibrio de ligamiento y concordancia completa entre ellos, lo que permite utilizar el genotipado de *CYP3AP1 -44G* como un indicador de la actividad metabólica *CYP3A5* (Zhu et al.,

2002). La frecuencia del alelo *CYP3A1* -44A en las poblaciones europeas es de 0,933 (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012). Como los alelos mutados *CYP3A5* 6986G y *CYP3A1* -44A no son funcionales frente a xenobióticos (incluyendo plaguicidas), la menor tasa de bioactivación da lugar a una menor concentración de metabolitos activos. Así, los portadores de los alelos no funcionales son menos vulnerables a los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforotioatos.

I.E.4 Glutación S-Transferasa

Nombre	Glutación S-Transferasa mu 1 (EC 2.5.1.18)		
Símbolo	<i>GSTM1</i>		
Nombres alternativos	GST HB Subunidad 4, S-(Hidroalquil) Ligasa Glutacion, Glutación S-Alquiltransferasa		
Símbolos alternativos	GSTM1-1, GSTM1a-1a, GSTM1b-1b, GTH4, GTM1, H-B, MU-1		
Localización Citogenética	1p13.3	Genómica	chr1109687814-109709039 (hg38)
ADN	NC_000001.11	8 exones	21 244 pb
ARNm	NM_000561	8 transcritos	1 161 pb
Proteína	NP_000552		218 aa
Identificadores externos	HGNC 4632 ; Entrez Gene 2944 ; Ensembl ENSG00000134184 ; OMIM 138350 ; UniProtKB P09488		
Nombre	Glutación S-Transferasa Theta 1 (EC 2.5.1.18)		
Símbolo	<i>GSTT1</i>		
Nombres alternativos	Glutación Transferasa T1-1, GST Clase Theta-1		
Símbolos alternativos	-		
Localización Citogenética	22q11.23	Genómica	chrCHR_HSCHR22_1_CTG724033952-24042493 (hg38)
ADN	NT_187633.1	5 exones	8 179 pb
ARNm	NM_000853	15 transcritos	1 060 pb
Proteína	NP_000844		240 aa
Identificadores externos	HGNC 4641 ; Entrez Gene 2952 ; OMIM 600436 ; UniProtKB P30711		

I.E.4.a Historia y antecedentes

Las Glutación S-Transferasas (GST; EC 2.5.1.18) son enzimas tanto solubles como ligadas a membrana que se expresan sobre todo en el hígado, riñón, testículo y pulmón. Pertenecen a una superfamilia de enzimas metabólicas de fase II que realiza funciones de biotransformación, transporte y unión. Interviene catalizando la reacción de conjugación del glutatión reducido (GSH) con sustratos electrofílicos (tales como carcinógenos químicos, contaminantes ambientales y agentes antitumorales) para su biotransformación a

metabolitos hidrosolubles y facilitar así su eliminación (Figura I-17). Además, estas transferasas inactivan aldehídos endógenos, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios durante el estrés oxidativo. Estas enzimas también desempeñan un importante papel en la biosíntesis de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona y progesterona (Hayes et al., 2005).

Las GSTs también poseen funciones no catalíticas, conocidas como función “ligandina” y que contribuyen al secuestro y transporte intracelular de xenobióticos y hormonas (A. Oakley, 2011). Así, algunas GST tienen la capacidad de unirse estructuralmente a carcinógenos, y de transportar un amplio rango de ligandos hidrofóbicos. Además, son capaces de modular algunas vías de señalización intracelular, así la GSTP1 inhibe la función de una quinasa de la vía MAPK que regula la proliferación y muerte celular (Laborde, 2010; Simendra Singh, 2015). Por todo ello, esta enzima juega un papel fundamental en la detoxificación de una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos con potencial citotóxico y genotóxico, como son plaguicidas, carcinógenos ambientales y agentes quimioterapéuticos, función que ejercen principalmente en el interior de las células (A. J. Oakley, 2005). Tomando como ejemplo los plaguicidas, la GST cataliza la reacción de conjugación de DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), atrazina, lindano y metilparatió con el GSH. En estos casos la reacción de detoxificación es beneficiosa para la célula. Por el contrario, en el caso de células tumorales, este beneficio representa un inconveniente para obtener buenos resultados en las terapias frente al cáncer.

No todas las reacciones catalizadas por GSTs conllevan la formación de compuestos menos tóxicos, en algunos casos se producen intermediarios más reactivos y con alto potencial carcinogénico. Esta reacción de bioactivación mediada por GST sucede con compuestos sintéticos, que no se encuentran de forma natural en el medio ambiente, por lo que no ocurría antes de la época industrial. Las medidas de actividad catalítica de esta enzima constituyen un buen biomarcador de la misma.

Figura I-17. Conjugación del glutatión a un xenobiótico genérico (X) a través de la GST, obteniendo como resultado la formación de un conjugado de glutatión-S (Chronopoulou y Labrou, 2009).

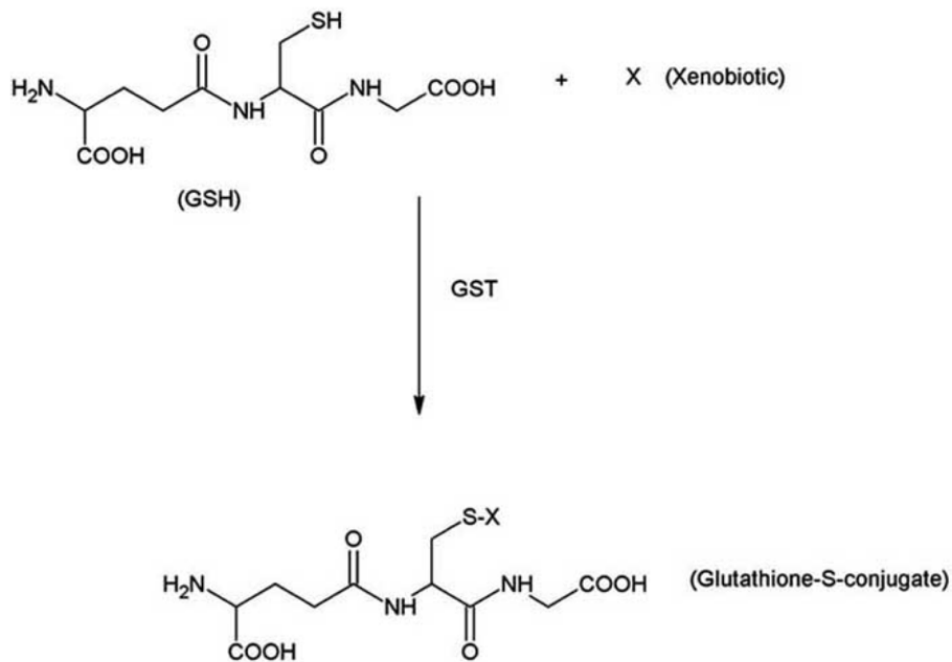
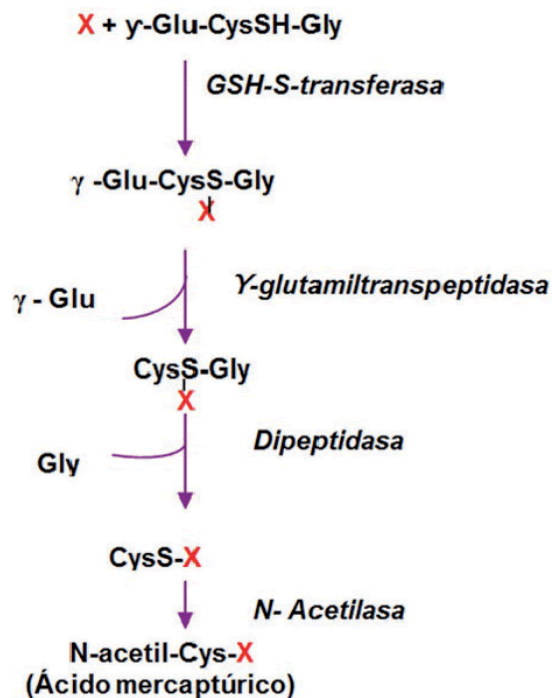


Figura I-18. Conjugación con GSH y detoxificación de xenobióticos a través de la vía del ácido mercaptúrico. X es un compuesto electrofílico que puede conjugarse con GSH en una reacción catalizada por la enzima GSH S-transferasa (Denzoin et al., 2013).



La GST se agrupa en tres superfamilias asociadas a las fracciones citosólica, mitocondrial y microsomal (MAPEG). La superfamilia más abundante y la primera que se descubrió fue la

citósólica o soluble (Mannervik et al., 1985) que, según su grado de homología en la secuencia de aminoácidos se puede dividir en 7 familias que, en el caso de humanos, son Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Theta (θ), Zeta (ζ), Omega (ω) y Sigma (σ). La superfamilia de GST **mitocondrial** tiene una gran relación evolutiva con la GST citósólica y de hecho comparten algunas de las clases comunes, como son Zeta, Omega y Sigma. Una clase específica de esta superfamilia es la Kappa (κ) y todas ellas se pueden encontrar en mitocondria y peroxisomas (A. Oakley, 2011). La segunda superfamilia que se descubrió fue la **microsomal** o **MAPEG**, llamadas así porque son proteínas asociadas a membranas que participan en el metabolismo de eicosanoides y glutatión (Hayes et al., 2005). Consta de cuatro subgrupos (I, II, III y IV), y en humanos se han identificado seis isoenzimas MAPEG que pertenecen a los subgrupos I, II y IV (Jakobsson et al., 1999).

Varias GSTs tienen un gran interés toxicológico. En humanos, la mayoría de las clases citósólicas de GSTs catalizan reacciones de conjugación con tóxicos y otros xenobióticos, siendo las clases Alfa, Mu, Pi y Theta las más importantes en el metabolismo de tóxicos en humanos (Sheehan et al., 2001).

1.E.4.b Gen y estructura proteica

Se han descrito numerosos polimorfismos en los genes de la superfamilia de las GSTs citósólicas (Tabla I-9), siendo los alelos nulos en *GSTM1* y *GSTT1* las más conocidas. En el caso de *GSTM1*0*, aproximadamente el 50% de las poblaciones caucásica y asiática no expresa ninguna proteína GSTM1. En relación a la *GSTT1*0* el 10% de los mejicanos y hasta el 60% de los asiáticos del extremo oriente son portadores del mismo, por lo que no expresan la proteína GSTT1. Estos individuos son potencialmente más susceptibles a la toxicidad de los sustratos normalmente detoxificados por estas enzimas (Bolt y Thier, 2006). Estos individuos portadores de la delección homocigótica de los genes *GST* carecen de esa función enzimática muestran mayor susceptibilidad a efectos adversos en la salud debido a la exposición a algunos contaminantes ambientales de manera que presentan un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer relacionados con la generación de moléculas altamente reactivas. Por este motivo estas enzimas se utilizan comúnmente como biomarcadores de susceptibilidad.

Tabla I-9. Polimorfismos de las clases más importantes de la superfamilia citosólica de la Glutatión S-Transferasa

Clase	Cr.	Gen	Alelo	Alteración génica	Proteína afectada	Fenotipo	Frecuencia alélica
Alfa (α)	6p12	<i>GSTA1</i> y 2	<i>GSTA*A</i>	C335, A629	Thr ¹¹² , Glu ²¹⁰	Mayor expresión de GSTA1 y menor de GSTA2	
			<i>GSTA*B</i>	G335, C629	Ser ¹¹² , Ala ²¹⁰	Menor expresión de GSTA1 y mayor de GSTA2	
Mu (μ)	1p13.3	<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1*A</i>	G519, alelo salvaje	Lys ¹⁷³	Actividad normal	
			<i>GSTM1*B</i>	C519	Asn ¹⁷³	Sin alteración significativa en actividad	
			<i>GSTM1*0</i>	Deleción del gen	Sin proteína	Sin actividad	40–50% en varios grupos étnicos
			<i>GSTM1*1x2</i>	Duplicación del gen	Sobreexpresión	Actividad ultrarrápida	
		<i>GSTM3</i>	<i>GSTM3*A</i>	Alelo salvaje	Proteína normal	Normal	
			<i>GSTM3*B</i>	Deleción de 3 pb del intrón 6	Estructura primaria sin alterar	Regulación negativa de la expresión	16% de homocigotos en caucásicos
			<i>GSTM4</i>	<i>GSTM4*A</i>	Alelo salvaje	Alelo salvaje	
Pi (π)	11q13	<i>GSTP1</i>	<i>GSTP1*A</i>	A313, C341, C555	Ile105, Ala114, Ser185		
			<i>GSTP1*B</i>	G313, C341, T555	Val105, Ala114, Ser185		
			<i>GSTP1*C</i>	G313, T341, T555	Val105, Val114, Ser185		
			<i>GSTP1*D</i>	A313, T341	Ile105, Val114		
Theta (θ)	22q11	<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1*A</i>	Gen único	Proteína única		
			<i>GSTT1*0</i>	Deleción del gen	Sin proteína		12–62% de homocigotos 20% de homocigotos en caucásicos
			<i>GSTT2</i>	<i>GSTT2*A</i>	A415		
			<i>GSTT2*B</i>	G415			

I.E.4.c Nomenclatura

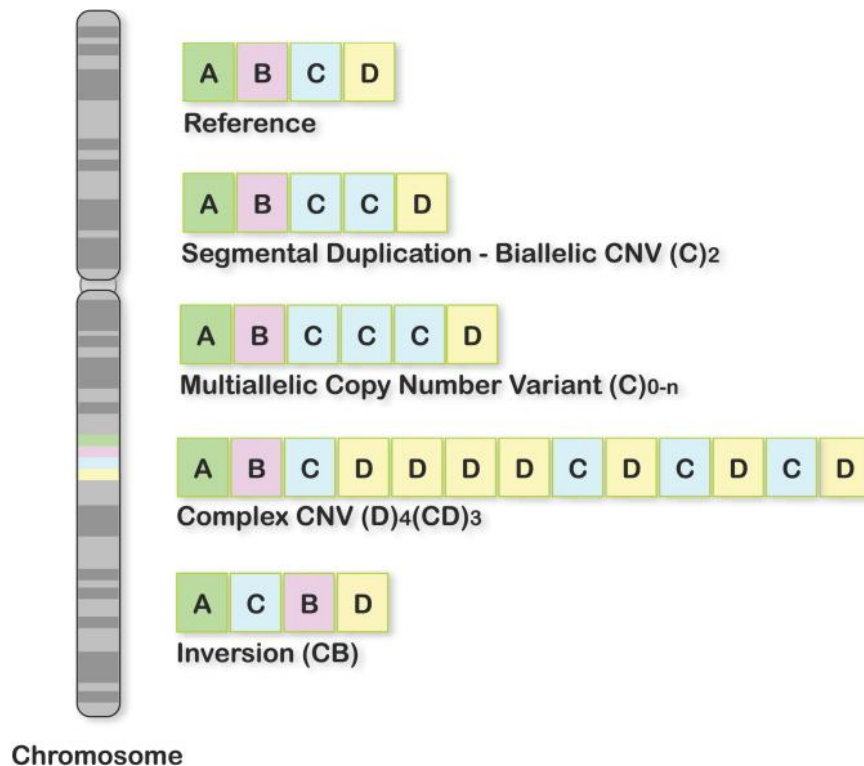
En 1992 se propuso una nomenclatura estándar para las GSTs en mamíferos (Mannervik et al., 1992). La letra minúscula denota la especie en la que se ha encontrado el gen (ej. "H" para humano, "m" para ratón, "r" para rata), una letra mayúscula indica la clase y un número arábigo identifica la subfamilia. Para los genes con variantes polimórficas, los diferentes alelos fueron inicialmente designados con letras minúsculas siguiendo el número que denota la subfamilia (Eaton y Bammler, 1999). No obstante, la nomenclatura más reciente utiliza la designación "*", seguida de una letra mayúscula asignada en el orden del descubrimiento (Costa y Eaton, 2006).

I.E.4.d Polimorfismos de GST

La variación en el número de copias (Copy Number Variant, CNV) es un fenómeno estructural que puede darse en ciertas regiones del genoma. Esta variación cubre aproximadamente el 12% del genoma humano e incluye desde deleciones y duplicaciones en tándem simples a ganancias o pérdidas más complejas de estas secuencias en varios sitios a lo largo del genoma (Redon et al., 2006) (Figura I-19). Un CNV se produce cuando un segmento de ADN de una kilobase (Kb) a varias megabases (Mb) de longitud está presente en número de copias variables en comparación con un genoma estándar, llamado genoma de referencia. Estas variantes estructurales se encuentran en los genomas de todos los seres humanos, así como en animales y plantas. Los CNVs pueden influir en la expresión de genes y pueden estar asociados con fenotipos y enfermedades específicas.

A continuación se detallarán las dos clases de GSTs objeto del presente trabajo, GSTM1 y GSTT1, las cuales contienen un polimorfismo en la variación del número de copias que será objeto de estudio.

Figura I-19. Tipos de cambios estructurales genómicos que afectan segmentos de ADN. (Estivill y Armengol, 2007)



I.E.4.d.i GSTM1

Este gen se localiza en la región citogenética 1p13.3 junto a cuatro genes de *GST mu*. Estos genes están espaciados aproximadamente 20 kb entre sí y están dispuestos en el siguiente orden 5'- *GSTM4* - *GSTM2* - *GSTM1* - *GSTM5* -3' (Xu et al., 1998). Este polimorfismo surgió como consecuencia de una deleción completa del gen y es muy común en la población. Aproximadamente el 50% de los individuos de la mayoría de las poblaciones son homocigóticas para el alelo nulo, designados como *GSTM1**0/*0 y, por tanto, no expresan ninguna proteína funcional (Eaton y Bammler, 1999; Ginsberg et al., 2009). Además, se han documentado tres polimorfismos adicionales de la *GSTM1*, en dos de ellos cambia un aminoácido (*GSTM1**A y *GSTM1**B) pero su eficacia catalítica es similar y el tercero, *GSTM1**1x2, causa la sobreexpresión de *GSTM1* (Hayes et al., 2005; Strange et al., 2001).

I.E.4.d.ii GSTT1

Este gen se localiza en la región citogenética 22q11.2, junto a *GSTT2* (Webb et al., 1996). El polimorfismo, que es bastante común, consiste en una deleción del gen *GSTT1*, de

manera que los individuos homocigotos para el alelo *GSTT1*0* no expresan la enzima funcional. La frecuencia de este polimorfismo varía según el origen de la población, siendo portadores del mismo aproximadamente del 15 al 25% de los caucásicos y más del 60% en algunas poblaciones asiáticas (Eaton y Bammler, 1999; Strange et al., 2001). Numerosos estudios han examinado si el genotipo nulo de *GSTM1* está asociado con un mayor riesgo de desarrollar diversas enfermedades con etiología ambiental conocida o sospechada.

Los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTT1* han sido ampliamente estudiados por las siguientes razones

1. Al ser la variante homocigota nula muy común en la población (~ 50%), esto permite alcanzar un poder estadístico suficiente para evaluar el efecto con tamaños de muestra modestos.
2. La relación entre el genotipo y el fenotipo (actividad enzimática *GSTM1*) es directa; Por ejemplo, no hay duda de que las personas homocigóticas nulas carecen de actividad mientras que los heterocigotos (o los homocigotos para alelo funcionales, que son más raros) tienen actividad catalítica (asumiendo, por supuesto, que no hay polimorfismos promotores que bloqueen la expresión del alelo funcional).
3. Existe una "plausibilidad biológica" razonablemente suficiente para sostener que la delección de estos genes se asocia a un mayor riesgo de enfermedad, ya que se ha demostrado que su actividad supone detoxificar una gran variedad de fármacos y productos químicos.
4. El ensayo de genotipado es simple y económico.

I.F Aductos de ADN como biomarcadores de daño genotóxico

El daño en el ADN se considera un importante biomarcador de genotoxicidad y es claramente una de las causas subyacentes de mutaciones que conducen al cáncer (Satyender Singh et al., 2012).

Una gran variedad de biomarcadores se han utilizado en células nucleadas de sangre periférica (tales como leucocitos) para estimar los riesgos genéticos asociados a la exposición a largo plazo a plaguicidas (Angerer et al., 2007; Kapka-Skrzypczak et al., 2011).

Estudios previos han evaluado la genotoxicidad potencial de plaguicidas en poblaciones con exposición ocupacional mediante el uso de biomarcadores de daños citogenéticos (aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y ensayo cometa). Aunque la mayor parte de ellos han encontrado evidencias de los efectos genotóxicos en estas poblaciones (da Silva et al., 2008; Yaduvanshi et al., 2012), también hay resultados controvertidos (Lucero et al., 2000; Yaduvanshi et al., 2012) en particular debido a la variabilidad en los índices de genotoxicidad, que complican la caracterización de respuestas positivas (Bull et al., 2006).

En las últimas décadas, una serie de estudios se han centrado en los aductos de ADN derivados de la exposición a agentes alquilantes (Bartsch, 1996; Drabløs et al., 2004; Kondo et al., 2010; Saffhill et al., 1985) y la alquilación del ADN por plaguicidas, principalmente los ésteres metílicos de OPs (Bedford y Robinson, 1972; Braun et al., 1982; Dedek et al., 1984; L. Du et al., 2013; Mehl et al., 1994; Ray y Richards, 2001; Wiaderkiewicz et al., 1986; Wild, 1975; Wooder y Wright, 1981; Zayed y Mahdi, 1987). En conjunto, estos estudios indican que los plaguicidas, tanto de forma individual como en mezclas, pueden inducir daño en el ADN a través de alquilación.

Las bases nitrogenadas de guanina son las dianas predominantes del ADN para el ataque por agentes carcinógenos químicos (Beach y Gupta, 1992). La N7-methyldeoxyguanosine (N7-MedG) es un biomarcador robusto de exposición a agentes metilantes, debido a su deficiente eliminación del ADN, lo que permite su acumulación durante exposiciones crónicas, lo que sucede con más frecuencia que otros productos de alquilación del ADN (Bianchini y Wild, 1994; Boysen et al., 2009; Crosbie et al., 2013; Harrison et al., 2001). Los niveles de N7-MedG dependen de las propiedades químicas del agente metilante y

proporcionan una estimación de la formación inicial de O6-methyldeoxyguanosine (O6-MedG), un aducto promutagénico, cancerígeno y tóxico que se forma entre 10 y 100 veces menos que la N7-MedG (Stocks et al., 2010; Van Delft et al., 1997). Por estas razones, estudios epidemiológicos han utilizado N7-MedG como un biomarcador de exposición, en particular en los estudios sobre cáncer (Acladiou et al., 2004; Billson et al., 2009; Crosbie et al., 2012, 2013; Holmes et al., 2005; Khan et al., 2011; Lees et al., 2007), infertilidad (Stocks et al., 2010) y en exposiciones ocupacionales (Andre et al., 2007; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2000; Le Goff et al., 2005; Verschaeve et al., 2007).

II JUSTIFICACIÓN

Andalucía es la Comunidad Autónoma que emplea más plaguicidas de España con fines fundamentalmente agrícolas, para mejorar la producción agrícola. Dentro de ella destaca la comarca de El Poniente de Almería, donde se ha producido un importante desarrollo de la agricultura intensiva que la ha convertido en una de las mayores concentraciones de invernaderos del mundo.

El principal grupo de riesgo a los efectos adversos de los plaguicidas son los trabajadores de invernadero ya que presentan mayores niveles de exposición. Aunque la toxicidad aguda por exposición a dosis altas de plaguicidas se conoce bien y es fácil de detectar y diagnosticar, la toxicidad crónica por exposición a largo plazo a dosis bajas es difícil de evaluar y sigue siendo objeto de debate científico. Cada vez hay más evidencias de que la exposición crónica a plaguicidas se asocia a efectos adversos en salud, pudiendo producir neurotoxicidad, carcinogénesis, inmunotoxicidad y alteraciones de la reproducción y el desarrollo. Sin embargo, dada su baja incidencia entre todos los expuestos, sería necesario identificar los mecanismos por los que estos productos químicos pueden contribuir a tales efectos crónicos. Por este motivo, se están realizando importantes esfuerzos para evaluar su toxicidad por medio de biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Dentro de estos últimos se incluyen los polimorfismos genéticos de enzimas implicadas en el metabolismo de plaguicidas. Estos biomarcadores permiten predecir qué individuos van a padecer mayores efectos perjudiciales para la salud a pesar de estar expuestos al mismo tipo y cantidad de plaguicidas.

La comprensión del efecto de las variantes genéticas de las enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos, podría predecir mejor la respuesta tóxica e individualizar los posibles efectos adversos inducidos por los plaguicidas. Estudios previos han mostrado una gran variación interindividual en la capacidad de metabolizar los plaguicidas organofosforados y que puede ser debida, en parte, al balance de los perfiles metabólicos de enzimas de fase I y II como son los CYP450s, esterasas y GST. Por lo tanto, los polimorfismos genéticos de los genes *BCHE*, *PON1*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A1*, *GSTM1* y *GSTT1* pueden predisponer a la toxicidad de los plaguicidas en aquellos individuos de la población general portadores de determinados genotipos o haplotipos.

III OBJETIVOS

III.A Objetivos generales

1. Determinar los polimorfismos genéticos en los genes de una serie de enzimas metabolizadoras de plaguicidas (*BCHE*, *PON1*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A1*, *GSTM1* y *GSTT1*) y su posible papel como biomarcadores de susceptibilidad en individuos con exposición ocupacional a plaguicidas.
2. Analizar la estructura poblacional de las poblaciones de estudio, española y marroquí, en base a los polimorfismos genéticos estudiados.

III.B Objetivos específicos

1. Reclutar un grupo de agricultores con exposición ocupacional a plaguicidas en el área de agricultura intensiva de Almería y otro de controles de la misma zona, y valorar la homogeneidad de estos grupos poblacionales.
2. Caracterizar la variabilidad genética de la población de estudio para valorar si la población expuesta a plaguicidas presenta una mayor vulnerabilidad a estos agentes.
3. Evaluar si hay diferencias en las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos genéticos en los genes *BCHE*, *PON1*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP3A1*, *GSTM1* y *GSTT1*, en las dos poblaciones de estudio (española y marroquí).
4. Analizar si existe un desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos genéticos estudiados en los genes *BCHE* y *PON1* en las poblaciones española y marroquí.
5. Comparar las frecuencias alélicas de la población española con las de otras poblaciones de Europa, América, Oceanía, Asia y África (incluyendo en ésta la población marroquí del presente estudio).

6. Determinar los niveles de aductos N7-MedG en ADN de sangre periférica en una submuestra de la población de estudio y su posible asociación con la exposición a plaguicidas.
7. Analizar la estructura poblacional de los sujetos de estudio en base a los polimorfismos genéticos estudiados y evaluar su semejanza con las poblaciones europea y africana.

OBJECTIVES

General objectives

1. To characterize polymorphic gene variants in a number of pesticide-metabolizing enzymes (*BCHE*, *PON1*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A1*, *GSTM1* and *GSTT1*) and their possible role as susceptibility biomarkers in individuals with occupational exposure to pesticides.
2. To analyze the population structure of the two study populations, Spanish and Moroccans, based on the genetic polymorphisms studied.

Specific objectives

1. To recruit a group of farmworkers from the area of intensive agriculture of Almeria and a control group from the same area but without exposure to pesticides, and to assess the homogeneity of these population groups.
2. To characterize the genetic variability of the study population to assess whether pesticide-exposed workers show a greater vulnerability to these agents.
3. To assess if there are differences in allele, genotype and haplotype frequencies, of the genetic polymorphisms of *BCHE*, *PON1*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP3A1*, *GSTM1* and *GSTT1* in the two study populations (Spanish and Moroccan) and to examine whether these polymorphisms show any deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium.
4. To analyze whether the genetic polymorphisms studied in the *BCHE* and *PON1* genes are in linkage disequilibrium in the Spanish and Moroccan populations.
5. To assess whether the allelic frequencies of the studied polymorphic genes in the Spanish population differ with respect to other populations from Europe, America, Oceania, Asia and Africa (including in the latter case the Moroccan population studied of the present study)

6. To determine levels of N7-MedG adducts in DNA extracted from peripheral blood in a subsample of greenhouse workers and their possible association with exposure to pesticides.
7. To analyze the structure of the population of the study subjects based on the genetic polymorphisms studied and to evaluate their similarity with European and African populations.

IV MATERIAL Y MÉTODOS

IV.A Población de estudio

El estudio se llevó a cabo en 277 individuos (edad media $41,95 \pm 10,44$) que desempeñaban su actividad laboral en la provincia de Almería. Todos los individuos completaron un cuestionario detallado, como parte de un estudio más exhaustivo (proyecto de excelencia de la Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (nº ref. P09-CVI-5062), que incluía preguntas estándar sobre origen poblacional, consumo de alcohol, hábito de fumar, tipo de actividad laboral, tipo de plaguicidas usados, duración de las aplicaciones y medidas de protección utilizadas.

La administración de los cuestionarios y la recogida de muestras fueron realizadas por personal médico y de enfermería especialmente entrenado para este fin. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Granada (referencia 29/2009). Todos los participantes en el estudio firmaron el consentimiento informado.

La población de estudio puede clasificarse en varios subgrupos según los siguientes criterios

- Exposición a plaguicidas.
- Periodo de exposición a plaguicidas.
- Origen poblacional.

IV.A.1 Exposición a plaguicidas

En el total de individuos, si tenemos en cuenta el criterio de estar o no estar expuesto de forma ocupacional a algún tipo de plaguicida, disponemos de

- **Grupo expuesto** 186 trabajadores (edad media $38,18 \pm 9,62$) con al menos 5 años de exposición ocupacional crónica a plaguicidas debido al desarrollo de actividad

agrícola en el interior de recintos bajo plástico (invernaderos). Se reclutaron a través de la mutua encargada de realizar los controles de salud laboral.

- **Grupo control** 91 individuos (edad media $48,44 \pm 8,43$) sin exposición ocupacional a plaguicidas y que se utilizaron como controles. Fueron reclutados en el Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Almería capital cuando fueron a realizar sus controles de salud laboral.

IV.A.2 Periodo de exposición a plaguicidas

La población de estudio fue evaluada (incluyendo la recogida de muestras biológicas) en dos periodos diferentes de 2011 con desigual exposición a plaguicidas

- **Mayo-Junio, baja exposición** la primera evaluación y toma de muestras se durante mayo y junio de 2011 que es el periodo en que, según ingenieros agrónomos de la zona, se hace un menor uso de plaguicidas en función del tipo de cultivo, por lo que se asume que la exposición a estos compuestos es baja.
- **Octubre-Noviembre, alta exposición** en este periodo los cultivos están más desarrollados y hay más riesgo de que aparezcan plagas, por lo que se hace un mayor uso de plaguicidas en los mismos.

Los criterios de selección aplicados a la población de estudio fueron los siguientes

- **Criterios de inclusión** Trabajadores de invernadero del litoral del poniente almeriense, que realizan regularmente trabajos agrícolas, en el interior de recintos bajo plástico, con una experiencia de al menos 5 años.
- **Criterios de exclusión** Trabajadores con enfermedades crónicas previamente conocidas, como diabetes o cáncer, o portadores de trastornos neurológicos.

IV.A.3 Origen poblacional

Los individuos del estudio pertenecen a dos orígenes poblacionales concretos

- **Marruecos** 139 individuos, todos trabajadores de agricultura intensiva.

- **España** 138 individuos, de los cuales 91 son casos y 47 trabajadores de agricultura intensiva.

IV.A.4 Tipo de plaguicidas más frecuentemente utilizados

Los plaguicidas que se utilizan con mayor frecuencia en la zona de estudio son los N-metilcarbamatos, piretroides, ditiocarbamatos, neonicotinoides y los organofosforados (Hernández et al., 2003), con los cuales se relacionan con efectos genotóxicos en estudios experimentales en bacterias y en mamíferos.

La cantidad total de insecticidas-acaricidas-nematicidas utilizados en el área de estudio representa el 66,8% del consumo total de plaguicidas en Almería. Esta cifra es superior al 32,5% que se utiliza en el resto de Andalucía, debido probablemente a la importancia de la agricultura intensiva en Almería. Según la encuesta nacional del mercado de plaguicidas de 2011 y 2012 realizada en base al Reglamento Europeo 1185/2009, los OPs representan alrededor del 30% de la cantidad total (toneladas) de ventas de insecticidas-nematicidas-acaricidas. Entre ellos, las materias activas utilizadas con más frecuencia son el clorpirifos, metil-clorpirifos, dimetoato, malatión, metil-pirimifos, fosmet y fenamifos. Otros insecticidas también utilizados en agricultura intensiva en el área de estudio son N-metilcarbamatos (metomilo, oxamil, formetanato), piretroides (tralometrino, cipermetrina, acrinathrin), neonicotinoides (imidacloprid), abamectina y fungicidas ditiocarbamatos fungicidas (macozeb, zineb) (Hernández et al., 2003, 2010).

La evaluación cuantitativa de la exposición a plaguicidas se efectuó mediante la determinación de las actividades colinesterasas acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) y colinesterasa sérica (BChE). La AChE ha sido reconocida como un biomarcador de la exposición crónica a plaguicidas en humanos ya que su actividad disminuye no sólo como consecuencia de la exposición a plaguicidas OPs y N-metilcarbamatos sino también por la peroxidación lipídica inducida por plaguicidas, un proceso que afecta las enzimas unidas a membranas celulares como la AChE. Por el contrario, la BChE se considera un biomarcador útil para evaluar la exposición a corto plazo debido a su rápida recuperación después de la inhibición por compuestos anticolinesterásicos (Hernández, Gil, et al., 2013).

IV.A.5 Sujetos para determinación de aductos N7-MedG

Los aductos N7-metildeoxiguanosina en ADN se determinaron en una submuestra de 39 individuos ($38,9 \pm 8,3$ años de edad) extraídos de la población de expuestos a plaguicidas. Se determinaron en los dos periodos de estudio alta y baja exposición.

En principio se identificaron 75 individuos del total de la población de estudio, de los que se disponía de muestras de sangre tanto en el periodo de baja como en el de alta exposición. De ellos, no se consiguió extraer suficiente ADN para el estudio ($<6,75$ ng totales) en 12 individuos. De los 63 restantes, 24 contenían contaminantes en sus muestras de sangre que interactuaban con los reactivos de la técnica, imposibilitando el análisis. Al final se realizaron con éxito 78 determinaciones, correspondientes a muestras de sangre de 39 individuos tomadas en los dos periodos de estudio.

IV.B Tipo de muestras

IV.B.1 Toma de muestra

Para este estudio se recogieron muestras de sangre por venopunción en condiciones de ayuno utilizando tubos BD Vacutainer™ de 5 mL con EDTA como anticoagulante (Figura IV-1). Se separó una alícuota y el resto se centrifugó inmediatamente a $400 \times g$ durante 20 min para separar el plasma del paquete de eritrocitos. Todas las muestras se congelaron inmediatamente a -40°C hasta su análisis.

Figura IV-1. Tubo de EDTA Vacutainer™ de 5 mL.



IV.B.2 Extracción de ADN

El sistema utilizado para la extracción de ADN en las muestras de sangre fue el Kit REALPURE “SSS” (REAL, Durviz S.L., ver protocolo en <http://www.reallaboratory.com/realpure-sss>, (DURVIZ SL, 2013)). Este kit comercial es

un método para la extracción de ADN de buena calidad a partir de sangre total, aunque también está optimizado para médula ósea, saliva o semen. Permite procesar muestras de diferentes volúmenes ya que su protocolo es escalable. Además de ser un procedimiento rápido, seguro y económico, tiene la ventaja de ser un protocolo que evita el uso de disolventes orgánicos tóxicos como fenol-cloroformo.

Procedimiento de extracción mediante el Kit REALPURE “SSS”

La extracción de ADN se realizó a partir de 300 μ L de sangre total tratada con EDTA.

- 1) **Lisis selectiva de los eritrocitos y lisis de células nucleadas** las células nucleadas que contienen ADN son separadas de los eritrocitos, los cuales son lisados. Posteriormente se lisan también las células nucleadas mediante un detergente aniónico que solubiliza los restos celulares.
 - a) Añadir 300 μ L de sangre total a un tubo de 1,5 mL que contiene 900 μ L de Solución Lisis de RBC. Mezclar con vórtex e incubar 10 min. a temperatura ambiente. Invertir los tubos varias veces durante la incubación.
 - b) Centrifugar 1 min. a 13.000 x g. Eliminar el sobrenadante con una micropipeta evitando tocar el pellet formado y dejando 10-20 μ L de líquido residual.
 - c) Agitar mediante vórtex para resuspender el pellet.
 - d) Añadir 300 μ L de Solución de Lisis Celular y resuspender con micropipeta para lisar las células. Si se observa que la solución no queda homogénea, sino que presenta grumos celulares, debe incubarse a 37°C durante 10 min. o hasta que se observe homogénea.
- 2) **Precipitación de proteínas** las proteínas citoplasmáticas y nucleares se eliminan por precipitación salina.
 - a) Dejar las muestras atemperar a temperatura ambiente.
 - b) Añadir 180 μ L de Solución de Precipitación Proteica al lisado celular obtenido en la etapa anterior.
 - c) Agitar vigorosamente, mediante vórtex a máxima velocidad, durante 30 segundos. Se observará la formación un grumo de color marrón oscuro.

- d) Centrifugar a 13.000 x g durante 5 min. Aparece un precipitado marrón oscuro, si se observan partículas flotando en el sobrenadante, incubar 5 min en hielo y volver a centrifugar.
- 3) **Precipitación del ADN** El ADNg se obtiene gracias a una precipitación con isopropanol.
- a) Traspasar el sobrenadante, donde está contenido el ADN, a un tubo nuevo de 1,5 mL que contiene 300 µL de isopropanol.
- b) Mezclar por inversión 50 veces.
- c) Centrifugar a 13.000 x g durante 4 min. El ADN se observa como un pellet blanco.
- d) Desechar el sobrenadante vertiendo el contenido y secar el tubo boca abajo en papel absorbente de forma breve. Añadir 300 µL de Etanol 70% para lavar el ADN.
- e) Centrifugar a 13.000 x g durante 2 min. Desechar el sobrenadante vertiendo el contenido y secar el tubo boca abajo en papel absorbente durante unos 15 min.
- f) Dejar secar el tubo a temperatura ambiente durante toda la noche o 15 min. a 37°C.
- 4) **Hidratación del ADN** El pellet de ADN puede ser disuelto en agua estéril libre de DNasa o en TE buffer (1X) pH 8.0 low EDTA (grado molecular).
- a) Añadir 100 µL de agua estéril libre de DNasa y resuspender con micropipeta.
- b) Incubar a 65°C durante 1 hora o a temperatura ambiente overnight en agitación, para ayudar a la dispersión del ADN.
- c) Conservar a -20°C para almacenajes largos.

IV.B.3 Cuantificación de ADN

Tras la extracción, se evaluó la pureza, calidad y cantidad de ADN mediante diferentes metodologías.

- 1) **Espectrofotetría** es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe una molécula en una determinada longitud de onda. En el caso del ADN, se mide en la zona del espectro del ultravioleta (UV) a 260 nm y 280 nm. Mediante esta técnica se obtiene información sobre la pureza del ADN, para ello se utiliza el valor del cociente

(ratio) de absorbancia 260/280. Un ratio cercano a 1,8 nm se considera como puro para el ADN, valores próximos a 2 nm podrían deberse a contaminación con RNA y valores menores de 1,8 nm indican contaminación por elementos que absorben a longitudes cercanas a 280 nm, como proteínas o fenol-cloroformo.

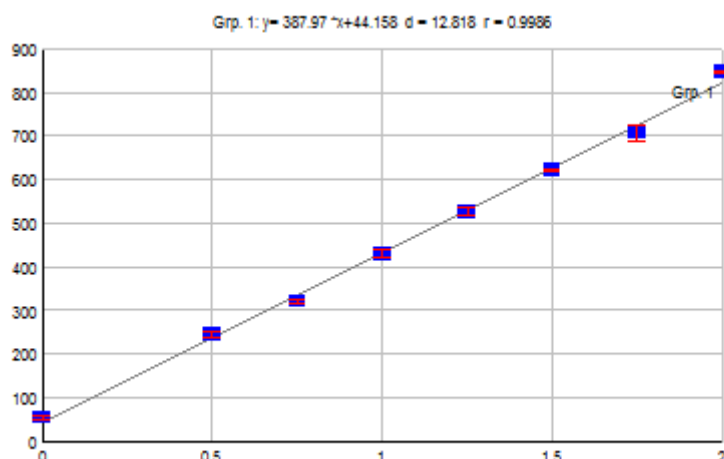
Se utilizó el instrumental Infinite[®] 200 NanoQuant (Tecan, Switzerland), similar a NanoDrop[®], con capacidad para medir 16 muestras al mismo tiempo y con un volumen de 2 μ L (Figura IV-2). En este estudio se obtuvieron valores medios del ratio 260/280 de 1,88 \pm 0,15 (Santella, 2006). La concentración media de ADN fue de 34,91 \pm 31,04 ng/ μ L.

Figura IV-2. Infinite[®] 200 NanoQuant. (Tecan)



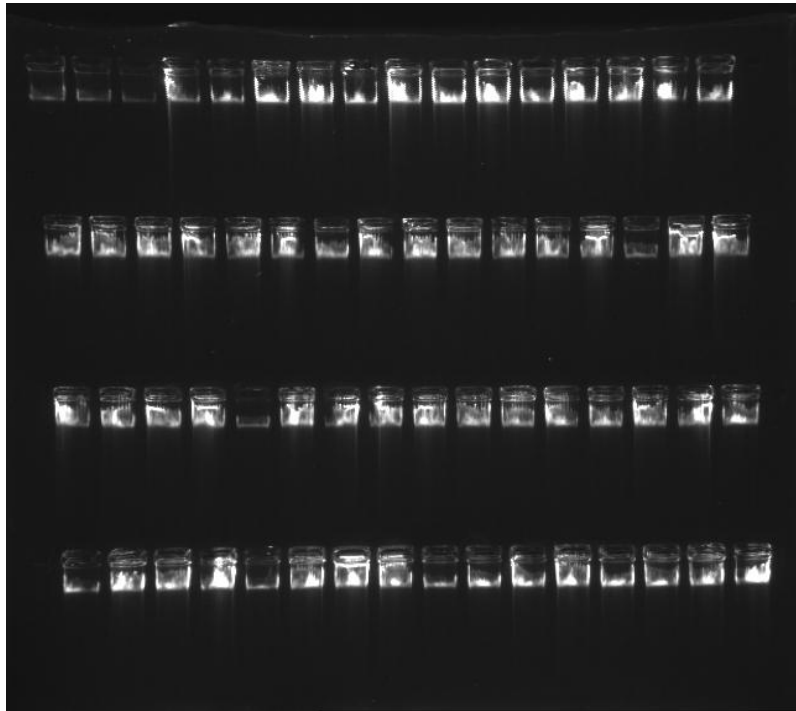
- 2) **Fluorimetría** Se basa en la capacidad de emisión de fluorescencia de una molécula al unirse a dianas específicas, como es el ADN. Debido a su especificidad, la cuantificación de ADN mediante ésta técnica es mucho más precisa que la espectrofotometría. Se utilizaron los reactivos Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsADN Assay Kit (Invitrogen[™]) y la cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el instrumental GENios Microplate Reader (Tecan, Austria). Los valores de fluorescencia se extrapolaron a una curva estándar generada en la misma placa de muestras mediante UltraPure[™] Calf Thymus ADN Solution (Invitrogen[™]).

Figura IV-3. Curva estándar con concentraciones conocidas de ADN medidas por PicoGreen®.



- 3) **Electroforesis** con esta técnica se puede analizar el estado de degradación en el que se encuentra el ADN extraído. Se realizó en algunas muestras como método para controlar que el proceso de la extracción era correcto. En la Figura IV-4 se observa como ninguna muestra presenta degradación, ya que no aparece un *smir* o también llamado barrido, indicativo de fragmentación del ADN. No se aprecia una banda totalmente definida porque se han obtenido cantidades elevadas de ADN y, al cargar 2 μL del original, dificulta la migración y por tanto se produce un desfase, al contrario de lo que ocurre con los tres controles de concentración situados en los primeros pocillos. Para evitar esto, se realizaron diluciones de las muestras y se cargaron cantidades de ADN que van desde los 10 ng hasta 100 ng. El reactivo utilizado para la tinción de los geles de agarosa fue GelRed™ y se visualizó mediante el sistema de fotodocumentación de geles BioDoc-It® Imaging System (UVP).

Figura IV-4. Gel de agarosa al 2%. Condiciones de electroforesis de 100v 30 min.



IV.C Genotipado

Los diferentes polimorfismos del estudio, tanto los ocho SNPs (rs1803274, *BCHE-K*; rs1799807, *BCHE-A*; rs662, *PON1 Q192R*; rs854560, *PON1 L55M*; rs705379, *PON1 -108C/T*; rs4244285, *CYP2C19*2*; rs3892097, *CYP2D6*4*; rs2177180, *CYP3A1*3*) como los dos CNVs (*GSTM1* y *GSTT1*), se genotiparon mediante discriminación alélica utilizando ensayos de PCR a tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (*quantitative real-time PCR*, qPCR). Para ello se utilizaron sondas específicas de hibridación modificadas mediante un ligando de unión al surco menor (*minor groove binder*, MGB) de la marca comercial Life Technologies™ (Foster City, CA), llamadas sondas TaqMan® MGB.

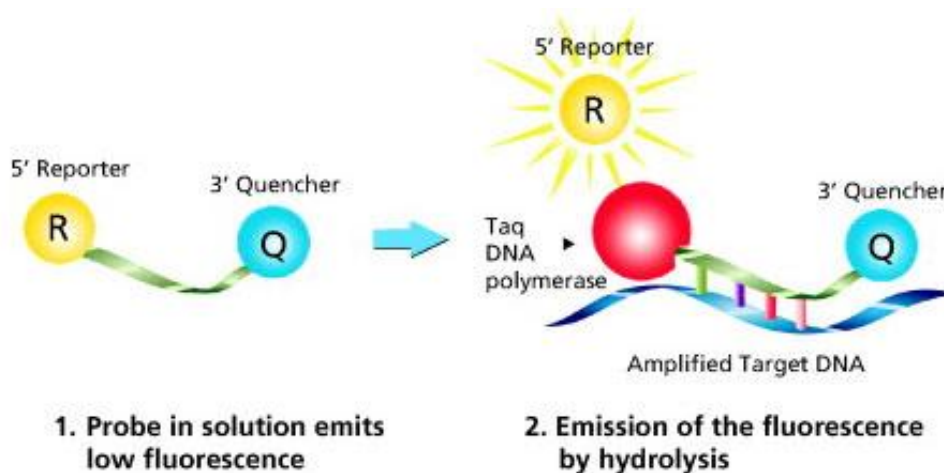
IV.C.1 Tecnología TaqMan®

En términos generales, a pesar de las diferencias metodológicas en la detección de SNPs y CNVs, la tecnología de las sondas TaqMan® se basa en dos propiedades

- Aprovechar la actividad exonucleasa 5'→3' de la enzima *Thermus aquaticus* (Taq) ADN polimerasa para que degrade la sonda de hibridación durante la amplificación por PCR (Lie y Petropoulos, 1998).
- La detección de fluorescencia específica a diferentes longitudes de onda que es emitida por las sondas diseñadas para el polimorfismo a estudiar cuando ésta es degradada.

Las sondas TaqMan[®] son oligonucleótidos con una longitud media de 20 a 30 pares de bases. La sonda intacta tiene unido en su extremo 5' un fluorocromo donador (en inglés *reporter*) cuya emisión de fluorescencia está inhibida por la proximidad de una molécula unida al extremo 3' llamada de varias maneras apantallador, inhibidor, apagador o aceptor (en inglés *quencher*) no fluorescente (NFQ), debido a un efecto de transferencia de energía tipo Förster (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). El espectro de emisión del *reporter* queda apantallado con el espectro de absorción del *quencher*, por lo que la sonda en estado intacto no emite fluorescencia. La sonda no puede ser extendida por la Taq ADN Polimerasa ya que su extremo 3' está bloqueado (Figura IV-5).

Figura IV-5. Estructura de las sondas TaqMan[®] (Sigma-Aldrich, 2012).

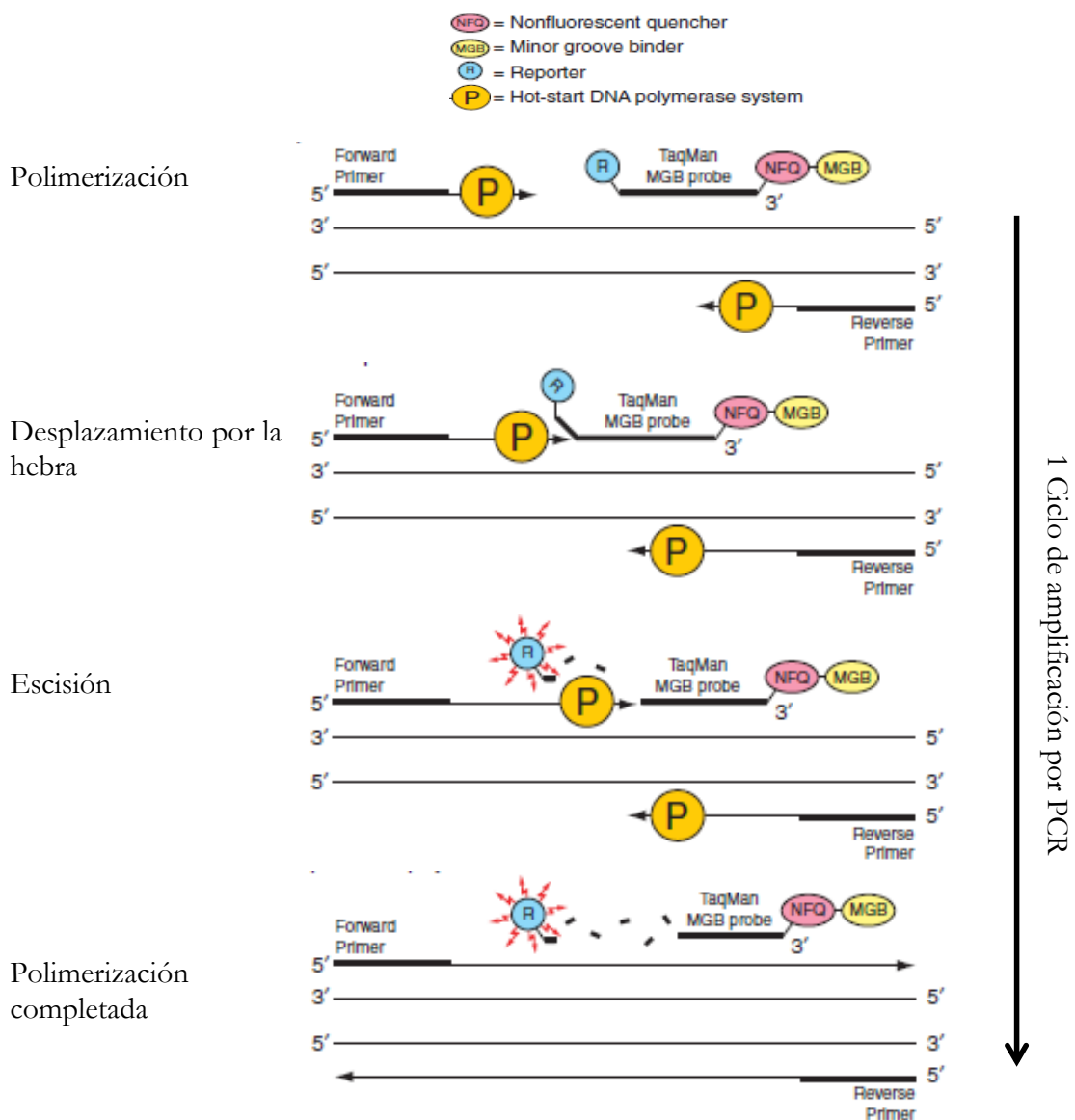


Esta sonda marcada está diseñada para que se hibride por complementariedad de bases con el centro del amplicón, también llamado producto de PCR, generado por la extensión de los cebadores, que contiene el polimorfismo de interés. Durante la amplificación por PCR, si la Taq ADN polimerasa se encuentra con la sonda unida a la hebra de ADN que se está extendiendo, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'→3'. La hidrólisis de la sonda hibridada libera el *reporter* unido a su extremo 5' que, al alejarse del *quencher* que lo inhibía por proximidad, emite fluorescencia específica del tipo de fluorocromo (Figura IV-6, pág.

93). La fluorescencia emitida por el *reporter* liberado es directamente proporcional a la cantidad de amplicón producido. El incremento de fluorescencia se monitoriza al final de la reacción (PCR a tiempo final) o durante la reacción, en cada uno de los ciclos (qPCR).

El ensayo TaqMan[®] utiliza parámetros universales de ciclos térmicos y condiciones de la PCR. Estas sondas exigen que no haya una guanina (G) en el extremo 5', ya que una G adyacente al *reporter* inhibe la fluorescencia incluso tras la hidrólisis.

Figura IV-6. Representación paso a paso del proceso del ensayo exonucleasa 5' de las sondas TaqMan[®] MGB que tiene lugar en cada ciclo durante la amplificación por PCR (Applied Biosystems, 2011c).

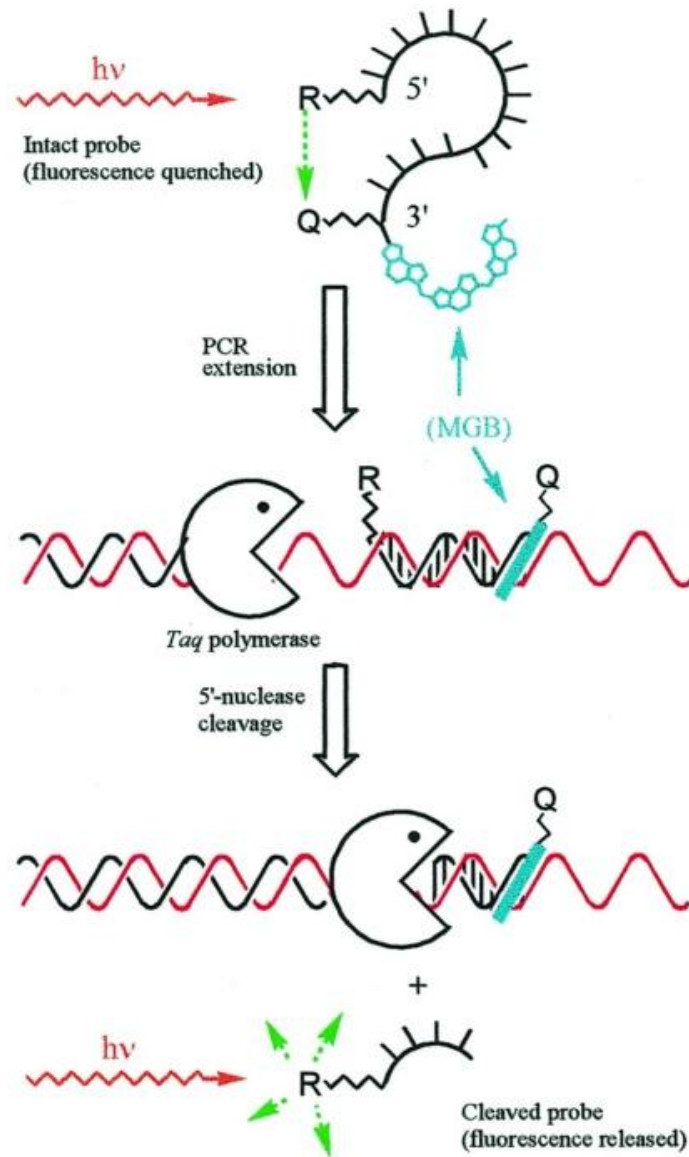


Las sondas TaqMan[®] utilizadas en este estudio están mejoradas debido a que contienen una molécula llamada ligando de unión al surco menor (MGB) en el extremo 3', junto al

quencher. MGB es una pequeña molécula que forma un dúplex extremadamente estable con el surco menor del ADN, lo que permite utilizar sondas más cortas en los ensayos basados en hibridación (Afonina et al., 1997; Kutuyavin et al., 2000, 1997). Cuando la sonda TaqMan[®] hibrida por complementariedad perfecta de bases, MGB estabiliza eficazmente la hibridación incorporándose al surco menor del ADN formado entre la sonda y la secuencia diana (Figura IV-7, pág. 95). La mayor estabilidad generada aumenta la especificidad de la hibridación, creando una mayor diferencia en la temperatura de *annealing* (T_m) entre sondas complementarias y no perfectamente complementarias. Esta propiedad permite que las sondas TaqMan[®] MGB sean más cortas (normalmente de 13 a 20 bases) en comparación con las sondas TaqMan[®] estándar (de 18 a 40 bases), sin afectar a las condiciones del ensayo.

Este tipo de sondas presentan varias ventajas para la qPCR, principalmente para ensayos múltiples. Al mejorar el rendimiento espectral se obtienen resultados más precisos y robustos entre distintos ensayos. Además, la mayor especificidad de la hibridación mejora la discriminación de los diferentes alelos. Además, al ser las sondas más pequeñas, se pueden acoplar a amplicones más cortos, tales como las secuencias consenso, lo que aumenta las posibilidades de estudio.

Figura IV-7. Esquema sobre el principio de la molécula MGB (ligando de unión al surco menor) que actúa en el extremo 3' junto al *quencher* para mejorar la unión de la sonda TaqMan® al ADN (Kutyavin et al., 2000)

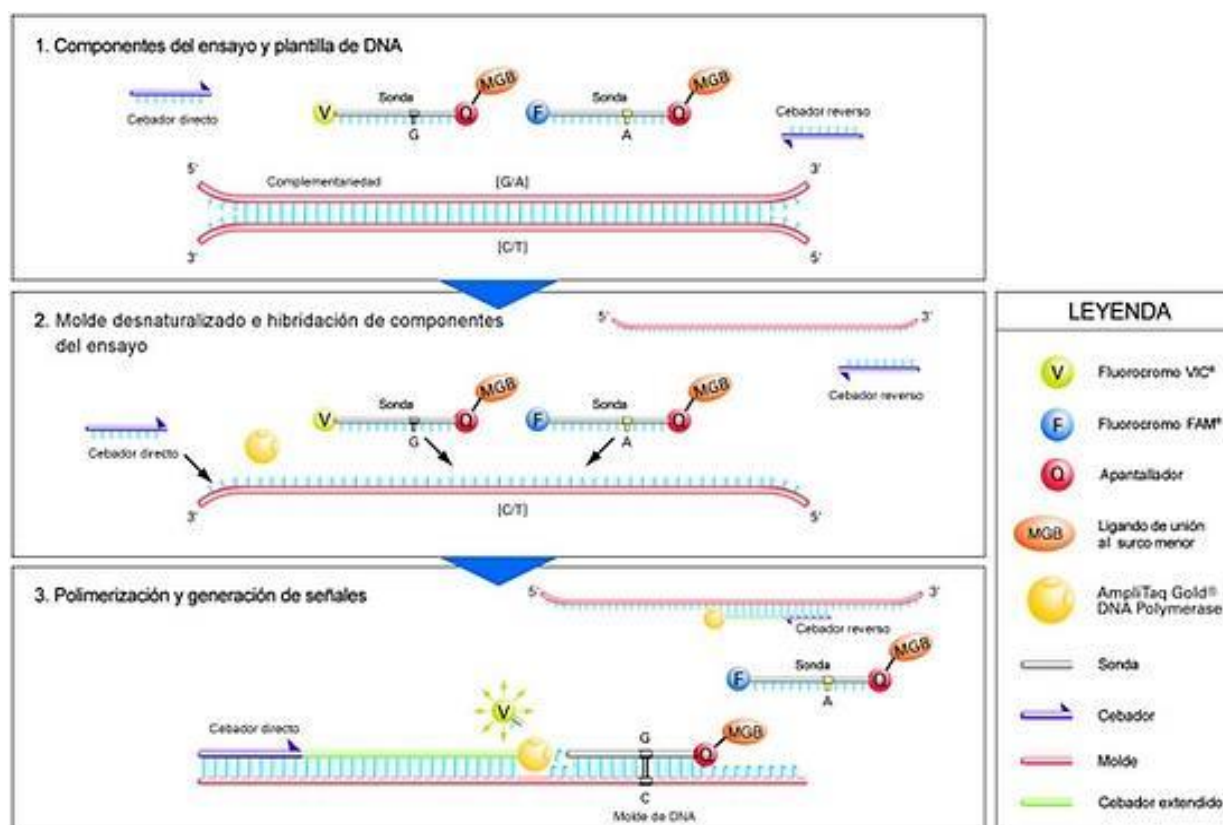


IV.C.2 Detección de SNPs

La tecnología TaqMan se puede emplear para el genotipado de SNPs. Este ensayo, denominado *TaqMan*® *SNP Genotyping Assay* por Life Technologies™, utiliza la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq ADN polimerasa, como más atrás en “Tecnología TaqMan®”, junto con dos sondas TaqMan® para discriminar entre los dos alelos de un SNP. Estas sondas TaqMan® son complementarias a cada uno de los dos alelos de un SNP.

Cada una tiene un *reporter* en el extremo 5' que emite fluorescencias, cuando está libre, con diferente espectro de excitación y emisión (FAM™ *dye* o VIC® *dye*), y un *quencher* no fluorescente (NFQ) en su extremo 3' junto a una molécula MGB. Durante la fase de amplificación por PCR, la Taq ADN polimerasa degrada las sondas hibridadas con el ADN, produciéndose la emisión de fluorescencia específica a una de las sondas o a ambas, según el alelo encontrado (Figura IV-8). Esta técnica resulta muy útil en casos en los que el volumen de muestras es elevado y hay que genotipar pocos SNPs, no siendo posible el análisis simultáneo de varios SNPs en una misma reacción de amplificación por PCR.

Figura IV-8. Esquema del proceso de detección de SNPs mediante sondas TaqMan® (traducción de (Applied Biosystems, 2014)).



En un experimento de genotipado TaqMan®, la PCR incluye una sonda marcada con un fluorocromo diferente para cada alelo del SNP diana. Cada ensayo contiene i) Un marcador fluorescente en el extremo 5' de cada sonda; ii) *Primers forward* y *reverse*; iii) Un *minor groove binder* (MGB), una modificación que permite crear sondas más cortas ya que aumenta la temperatura de fusión (T_m) de las mismas sin tener que aumentar su longitud. Esto favorece la precisión de genotipado; iv) Un *quencher no fluorescente* (NFQ) en el extremo 3' de la sonda, esto es, una molécula que absorbe la energía luminosa del fluorocromo cuando está próxima a él.

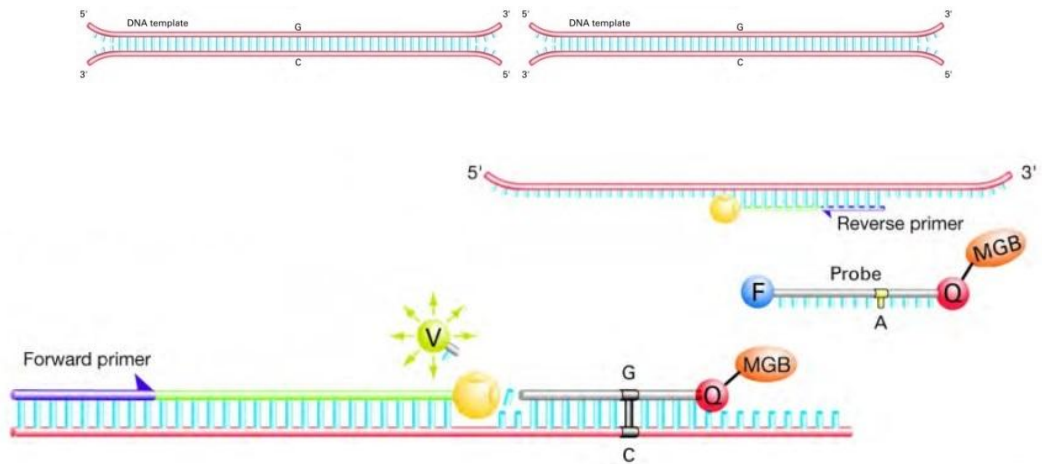
Los ensayos de genotipado de SNPs para determinar el genotipo de muestras desconocidas se pueden realizar mediante PCR a tiempo final, también llamado qPCR (Figura IV-12, Figura IV-13 y Figura IV-14, pág. 99). Si se utiliza la técnica qPCR se obtiene mayor

cantidad de información ya que se recogen los datos de cantidad de fluorescencia en cada ciclo, además de a tiempo final.

Los ensayos determinan si las muestras desconocidas que queremos genotipar son

- **Homocigotos tipo 1** muestras que sólo tienen el alelo 1 (CC).

Figura IV-9. Emisión de fluorescencia VIC® debido a que el individuo es homocigoto para el alelo C.



- **Homocigotos tipo 2** muestras que sólo tienen el alelo 2 (TT).

Figura IV-10. Emisión de fluorescencia FAM™ debido a que el individuo es homocigoto para el alelo T.

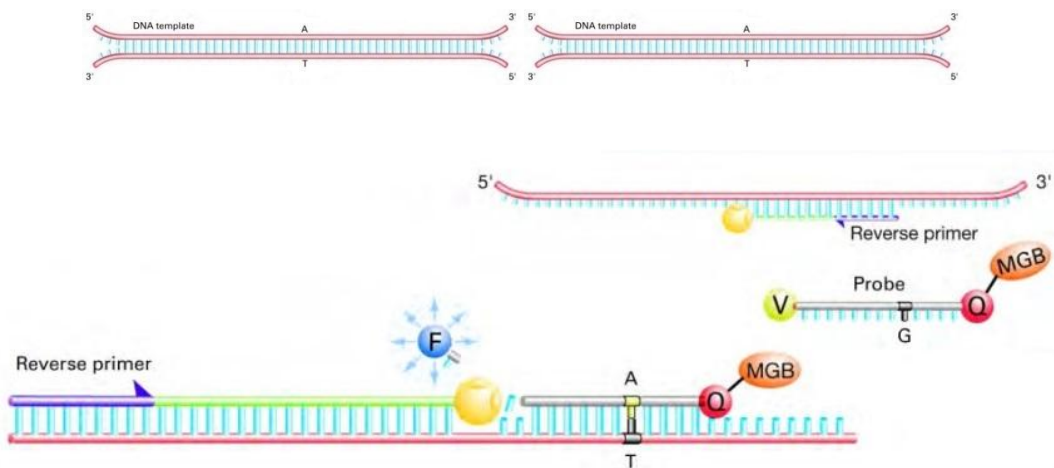
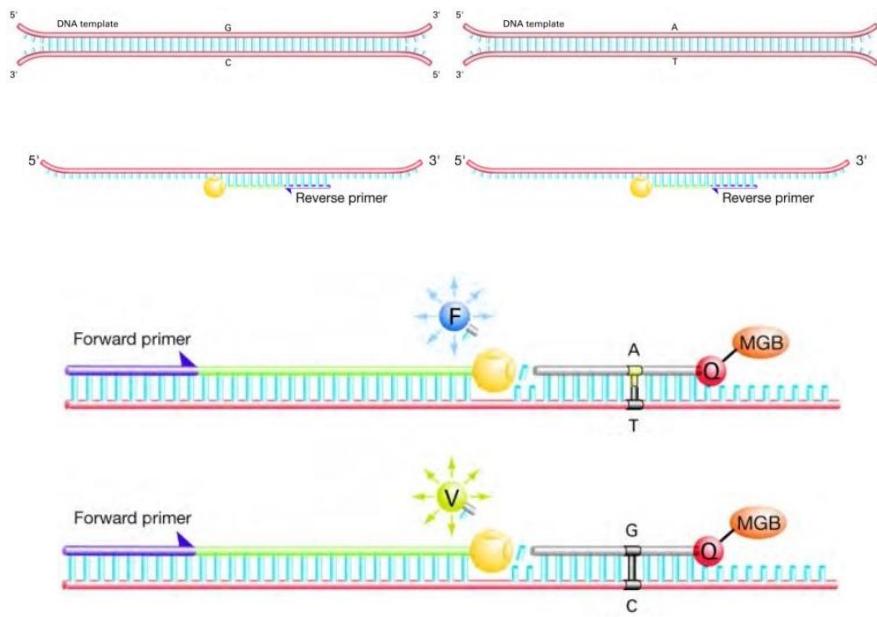


Figura IV-11. Emisión de fluorescencia VIC® y FAM™ debido a que el individuo es heterocigoto (TC).



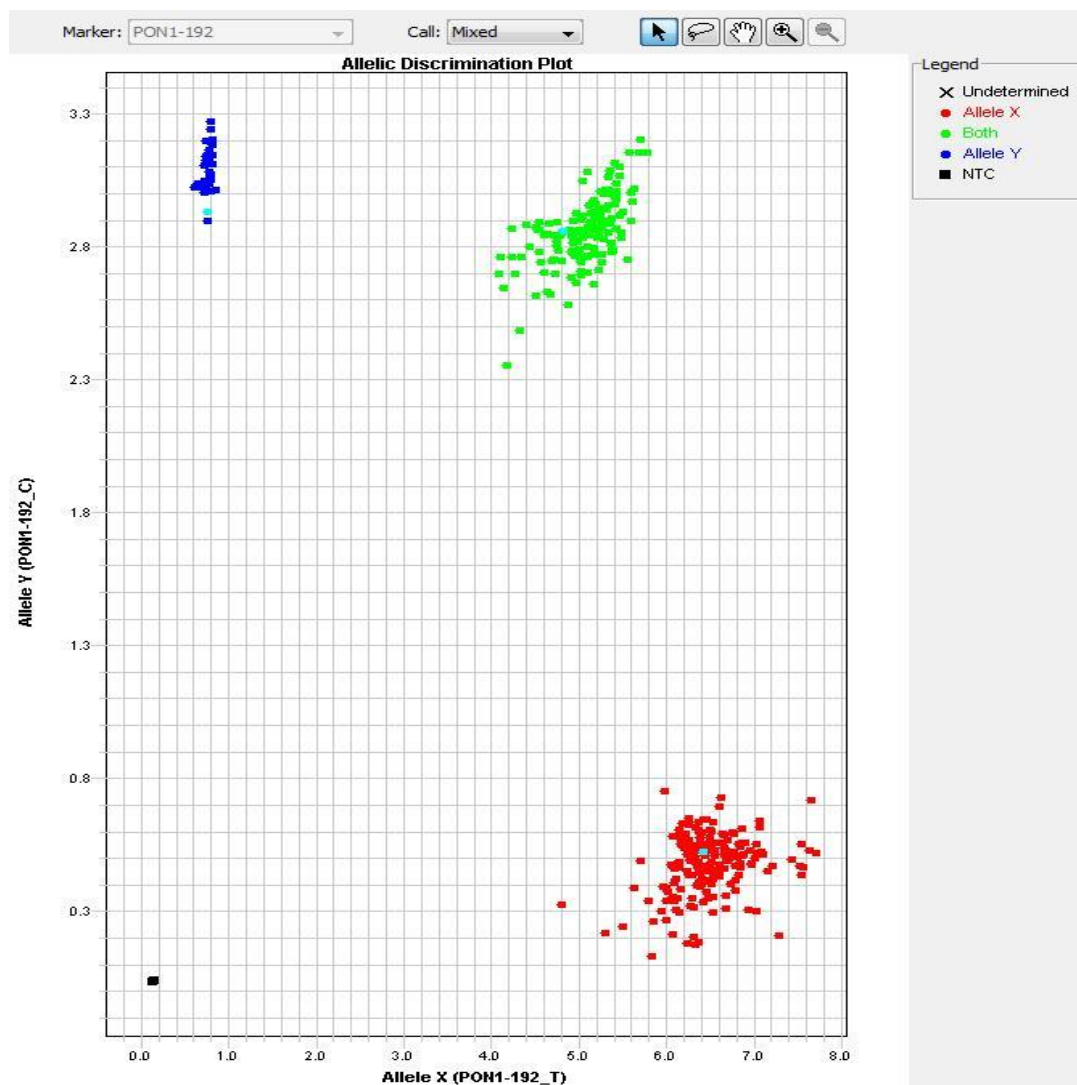
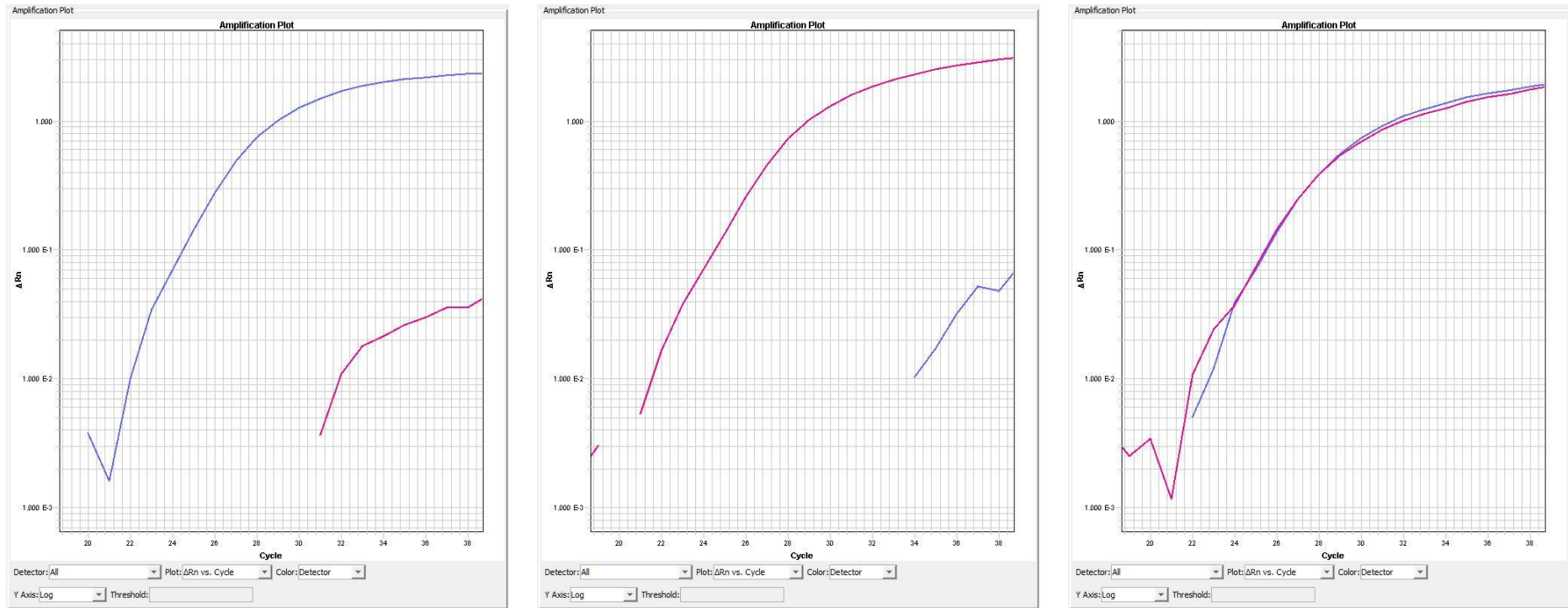


Figura IV-12. Plot de discriminación alélica.

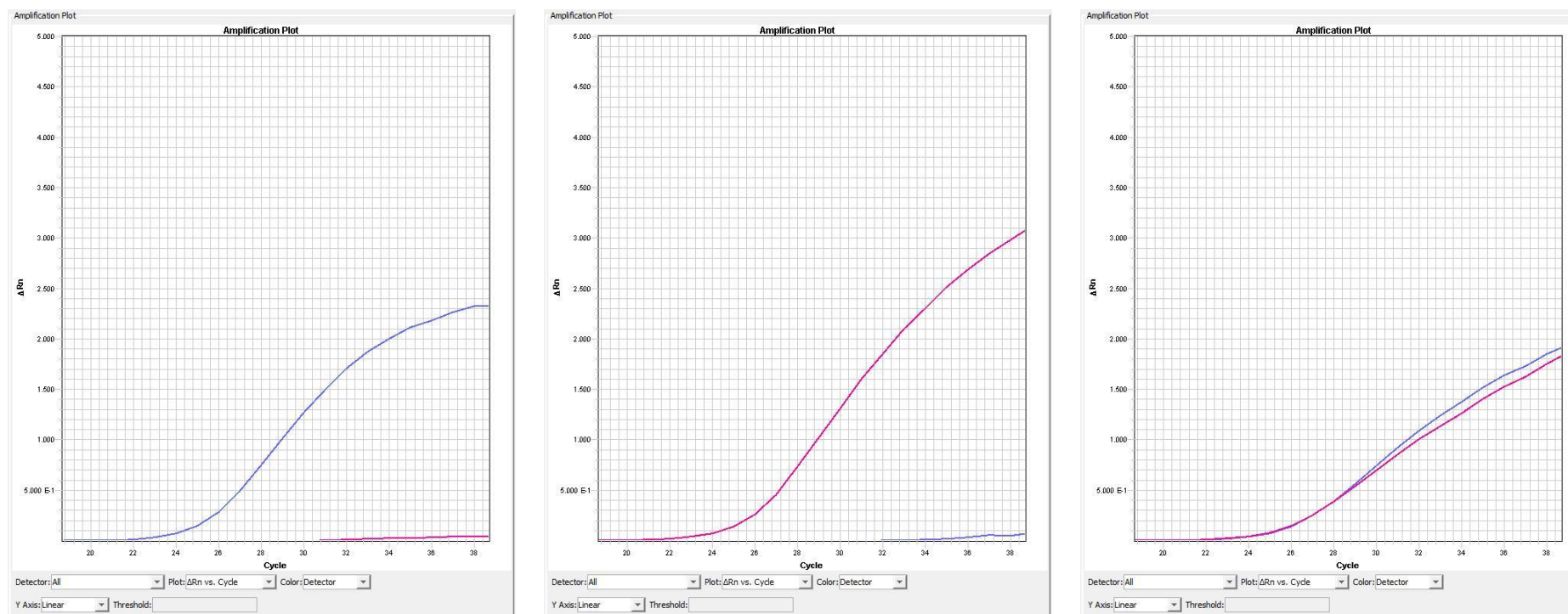
La Figura IV-12 representa los datos de fluorescencia obtenidos en la lectura final (post-read) en un grupo de muestras. Los puntos azules, próximos al eje de coordenadas, y los puntos rojos, próximos al eje de abscisas, son cada uno de los homocigotos. Los puntos verdes son los heterocigotos. El NTC, que corresponde a un control sin ADN, está representado con un cuadrado, localizado cerca del cero de fluorescencia.

Figura IV-13. Representación logarítmica de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos.



La Figura IV-13 representa de forma logarítmica los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR de los diferentes genotipos, dos homocigotos y el último el heterocigoto.

Figura IV-14. Representación lineal de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos.



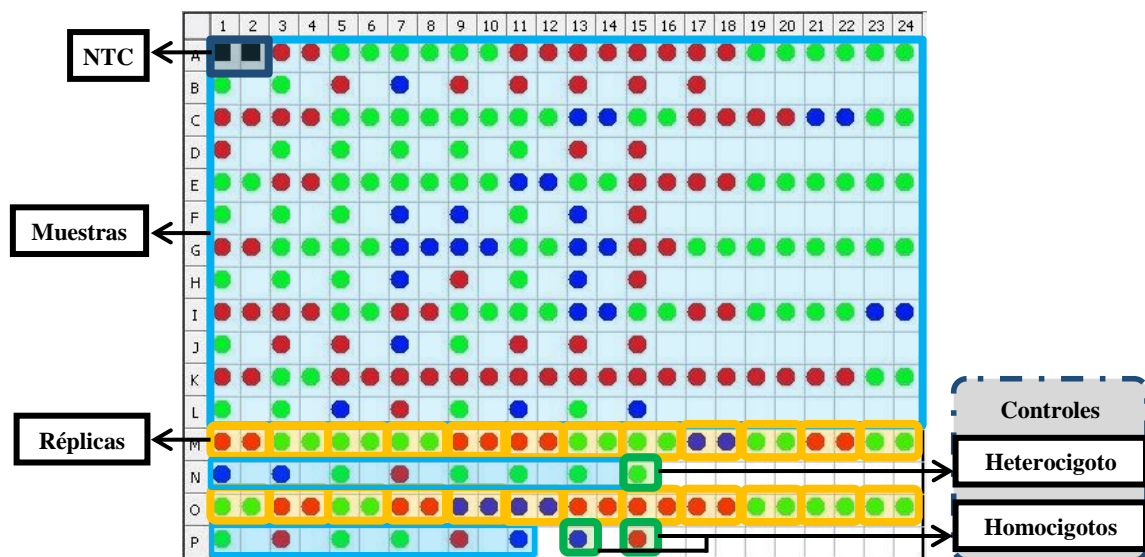
La Figura IV-14 representa de forma lineal los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR de los diferentes genotipos, dos homocigotos y el último el heterocigoto.

IV.C.3 Componentes y Cantidades de PCR

En cada placa para amplificación por PCR es necesario incluir (Figura IV-15)

- **Muestras** individuos de genotipo desconocido.
- **Réplicas** corresponde a reacciones con la misma muestra que contienen componentes y volúmenes idénticos. Se replican el 20% del total de muestras.
- **Controles negativos** muestra que no contiene ADN de ningún individuo pero sí del resto de componentes, denominado NTC (*No Template Control*). Los NTCs no deberían generar ningún producto de amplificación por PCR. Se añaden 2 por cada SNP estudiado.
- **Controles positivos** muestras que contienen genotipos conocidos, validados mediante secuenciación por el método Sanger (homocigoto para el alelo 1, homocigoto para el alelo 2 y heterocigoto para los alelos 1 y 2).

Figura IV-15. Representación esquemática de la localización de cada uno de los tipos de muestras que hay que incluir en una placa óptica para PCR de 384 pocillos.



Las reacciones de PCR de los ensayos de genotipado incluyen los siguientes componentes

- **TaqMan® Genotyping Master Mix** (Figura IV-16) (Applied Biosystems, 2014) (Applied Biosystems, 2010b)

Figura IV-16. TaqMan® Genotyping Master Mix.



Se compone por los siguientes elementos

- Enzima **AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa**, Ultra Pura (UP) es del tipo *hot start*, lo que quiere decir que está inactivada a temperatura ambiente, y requiere de un tiempo inicial de activación que suele ser de 10 min a 95°C. Su función es extender la hebra de ADN a partir de los cebadores hibridados sobre el molde de ADN genómico (ADNg). Mediante su actividad exonucleasa 5'→3' hidroliza las sondas que se han hibridado con su secuencia diana, lo que provoca la separación física del *quencher* con el *reporter*, y por tanto la emisión de fluorescencia de éste último .



- **dNTPs** (Desoxirribonucleótidos trifosfato) necesarios para que la polimerasa realice la extensión en la amplificación por PCR.
- **ROX™ dye** fluorocromo utilizado como referencia pasiva, sirve para normalizar entre las muestras la señal que proviene del *reporter* durante el análisis de los datos, incrementando la precisión en los instrumentos qPCR de Applied Biosystems®. La normalización de la señal (R_n) es necesaria para corregir las fluctuaciones de

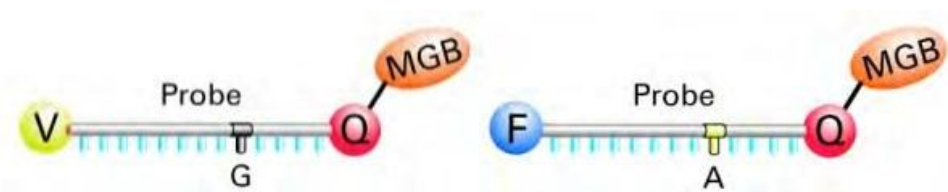
fluorescencia debido a cambios en la concentración o volumen y se calcula para cada pocillo de la siguiente forma

$$R_n = \frac{\text{Intensidad de Emisión del Reporter}}{\text{Intensidad de Emisión de la Referencia Pasiva (ROX™)}}$$

- **Buffer** contiene los componentes de optimización para la amplificación por PCR, necesarios para la correcta discriminación alélica.
- **TaqMan® SNP Genotyping Assay**
 1. Dos **cebadores** específicos de la secuencia donde está localizado el polimorfismo de interés.

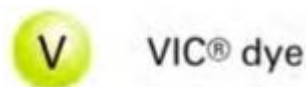


2. Dos sondas **TaqMan® MGB** específicas de locus para detectar sendos alelos del polimorfismo de interés.

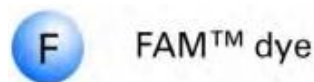


Cada sonda TaqMan® MGB específica de alelo está formada por

- a) Un fluorocromo **reporter** en el extremo de 5'
 - Fluorocromo **VIC®**, unido al extremo 5' de la sonda del alelo 1.



- Fluorocromo **FAM™**, unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2.



- b) Una molécula **MGB**, que aumenta la T_m para una longitud de onda determinada, y que permite el diseño de sondas más cortas (ver en la página 93).



- c) Un **quencher** no fluorescente (NFQ) en el extremo de 3' que permite detectar la fluorescencia del *reporter* con mayor sensibilidad que si fuera un *quencher* fluorescente.



Las cantidades utilizadas para las reacciones de PCR son (Tabla IV-2, pág. 106)

- **ADN genómico (ADNg)** Son necesarios 20 ng de ADNg para una óptima reacción de PCR. Hay dos formas de preparar las muestras a las concentraciones necesarias para realizar los ensayos (Tabla IV-1 más adelante). Se puede añadir, tras repartir los demás componentes de la reacción de PCR, el mismo volumen de ADNg en estado húmedo con la concentración requerida, para lo cual todas las muestras deben tener la misma concentración. Sin embargo, también está la opción de utilizar ADNg evaporado en el fondo del pocillo, que es técnica que se utilizó en el presente estudio. Para ello se prepararon las muestras en placas de 0,2 mL para PCR de 96 pocillos a concentraciones de 10 ng/ μ L con agua libre de ADNsa, y medido por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis) mediante el instrumental Infinite[®] 200 NanoQuant (Tecan), teniendo en cuenta el cociente A_{260}/A_{280} para la pureza del ADNg (Haque et al., 2003).

Se añadieron 2 μ L de cada muestra, mediante pipeta electrónica multicanal 1-10 μ L, en el fondo de placas ópticas de 30 μ L para PCR de 384 pocillos (MicroAmp[®] Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems[®]). En muestras cuya concentración es menor de 10 ng/ μ L, se añadió el volumen necesario hasta completar los 20 ng de ADNg necesarios para la reacción de PCR. Posteriormente las placas ópticas de 384, con ADNg en el fondo de cada pocillo, se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su completa evaporación.

- **Mezcla de reacción** está compuesta por (Tabla IV-2, más adelante)
 1. TaqMan® Genotyping Master Mix (2X).
 2. TaqMan® SNP Genotyping Assay (20X).
 3. Agua libre de DNAsas.

Tabla IV-1. Descripción de los métodos para añadir el ADNg

Método	Descripción	Uso Experimental
ADNg en estado húmedo	<ol style="list-style-type: none"> 1. La mezcla de reacción para genotipado de SNPs es alicuotada en placas ópticas para PCR. 2. Se añade ADNg tras el alicuotado de la mezcla de reacción. <p>Nota En este método se utiliza el líquido usado para resuspender el ADNg como uno de los componentes de la reacción final.</p>	<p>Análisis de un bajo número de SNPs en un gran número de muestras de ADNg.</p>
ADNg secado en el fondo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se añade ADNg en el fondo de los pocillos de las placas ópticas para PCR. 2. El ADNg se seca completamente por evaporación. 3. A continuación se añade mezcla de reacción de genotipado de SNPs 	<p>Este método se puede utilizar en cualquiera de estas condiciones</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento en la concentración de ADN en volúmenes grandes de muestra (2 a 5 µL) para realizar los ensayos. • Número limitado de ADN molde probado repetidamente en diferentes SNPs de estudio. • Número elevado de muestras de ADN preparadas en placas, secadas en el fondo, y almacenadas hasta su uso.

Tabla IV-2. Preparación de la mezcla para la reacción utilizando el método de ADNg secado en el fondo

Componente	Placa de 384 pocillos
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	2,50 µL
TaqMan® SNP Genotyping Assay (20X)	0,25 µL
Agua libre de DNAsas	2,25 µL
Volumen total por pocillo	5,00 µL

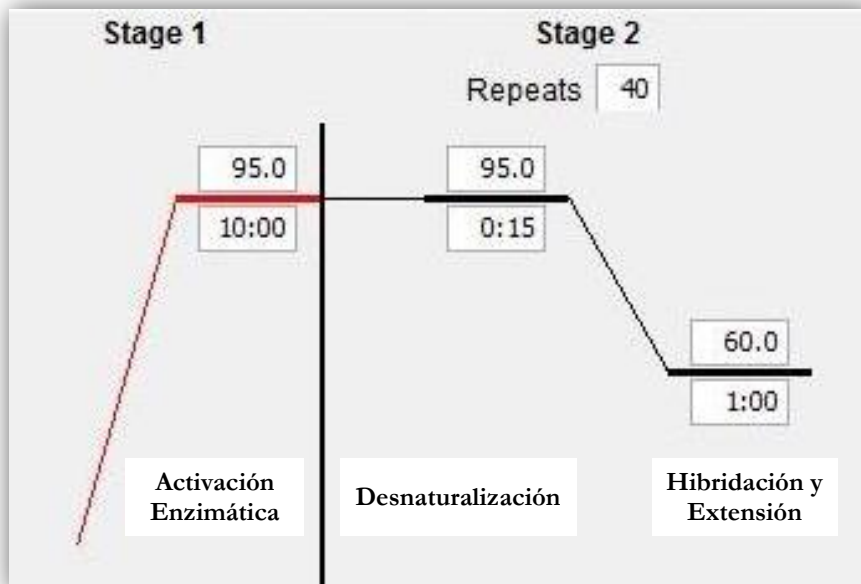
IV.C.4 Condiciones de PCR

Las condiciones generales de PCR utilizadas fueron (ver Tabla IV-3 y Figura IV-17) 95 °C durante 10 min para la activación de la Taq polimerasa y para la desnaturalización del ADN. Posteriormente se realizan 40 ciclos de 95 °C y 15 segundos de desnaturalización y 60 °C durante 1 minuto para hibridación y extensión.

Tabla IV-3. Condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® SNP Genotyping Assay

TaqMan® SNP Genotyping Assay			
Paso	T ^a	Duración	Ciclos
AmpliTaq Gold®, UP, Activación Enzimática	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
Hibridación y Extensión	60 °C	1 minuto	

Figura IV-17. Esquema de las condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® SNP Genotyping Assay [Extraído de Sequence Detection Software (SDS, versión 2.4)]



IV.C.5 Productos TaqMan® SNP Genotyping Assays

A continuación se detallan los diferentes tipos de productos TaqMan® SNP Genotyping Assays diseñados por Life Technologies™ que se han utilizado en el presente estudio

- TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays
- TaqMan® Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assays
- TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays

Se pueden solicitar a Life Technologies™ en diferentes formatos de concentración (20X, 40X y 80X; Tabla IV-4), trabajando siempre en el laboratorio con una solución stock de 20X.

Tabla IV-4. Formatos disponibles de los productos de TaqMan® SNP Genotyping Assays

Producto	Concentración
Predesigned SNP	40X
	80X
DME	20X
Custom SNP	40X
	80X

En la Tabla IV-5 se detalla la información más relevante de cada uno de los ensayos utilizados para el presente estudio, contenida en un archivo .txt denominado Assay Information File (AIF) y que proporciona la casa comercial. Es importante explicar cuál es la terminología usada en el archivo AIF para definir qué sonda se une a qué alelo representado en la secuencia de contexto (*Context Sequence*). Esta es la secuencia de nucleótidos que rodea al SNP y se proporciona en la cadena (+) del genoma en orientación relativa al genoma de referencia NCBI. Los alelos del SNP se incluyen entre corchetes, donde el orden de los alelos está asociado con el tipo de fluorocromo del *reporter* de la sonda, donde [alelo 1 = VIC® dye / alelo 2 = FAM™ dye]. La sonda del alelo 1, marcada con fluorocromo VIC®, corresponde al primer nucleótido dentro de los corchetes de la secuencia de contexto. La sonda del alelo 2, marcada con fluorocromo FAM™, se corresponde con el segundo nucleótido dentro de los corchetes de la secuencia de contexto. Por ejemplo, para la secuencia de contexto...CCGCCCC[A/G]CCCCTCC..., la

sonda marcada con fluorocromo VIC[®] se une al amplicón que contiene el alelo **A** y la sonda marcada con el fluorocromo FAM[™] se une al amplicón que contiene el alelo **G**.

Tabla IV-5. Información más relevante para genotipar los SNPs del presente estudio suministrada por Life Technologies™ con los pedidos de TaqMan® SNP Genotyping Assays.

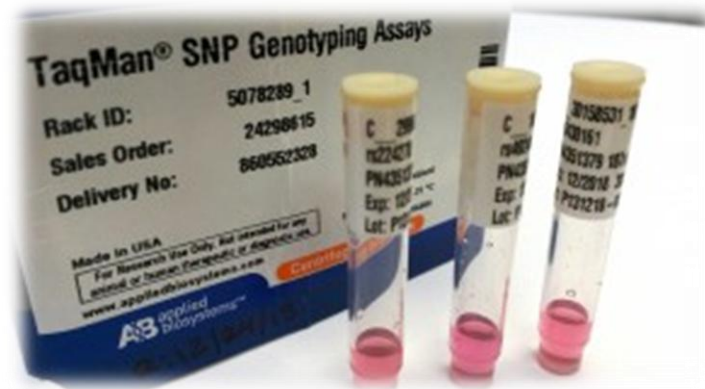
Product Type	Assay ID	Assay Mix Conc.	Context Sequence	Design Strand	Gene Symbol	NCBI SNP Reference	Cytogenetic Band	SNP Type
Predesigned SNP	C__11708905_10	40X	GGGGCAGCGCCGATTGGCCCGCCCC[A/G]CCCCTCCCCGCCGGGTGC GCAGCTA	FWD	PON1	rs705379	7q21.3b	Intergenic/Unknown
Predesigned SNP	C__27479669_20	40X	AATCCTGCTTCCACTCCCATTCTG[C/T]TTCATCAATATTTCTGTAA AATAT	REV	BCHE	rs1803274	3q26.1e	Mis-sense Mutation
Predesigned SNP	C__2411904_20	40X	TCCATGGAAGCCTGGAAAACTTGA[C/T]CTATGTTCTGACAGCAAGA ATTTGC	REV	BCHE	rs1799807	3q26.1e	Mis-sense Mutation
DME	C__2548962_20	20X	TAAACCCAAATACATCTCCAGGAT[C/T]GTAAGTAGGGGTCAAGAA AATAGTG	REV	PON1	rs662	7q21.3b	Mis-sense Mutation
DME	C__2259750_20	20X	GCCAGTCCATTAGGCAGTATCTCCA[A/T]GTCITCAGAGCCAGTTTCT GCCAGA	FWD	PON1	rs854560	7q21.3b	Mis-sense Mutation
DME	C__25986767_70	20X	TTCCCACTATCATTTGATTATTTCCC[A/G]GGAACCCATAACAAATTACT TAAAA	FWD	CYP2C19	rs4244285	10q23.33d	Intergenic/Unknown
DME	C__27102431_D0	20X	AGACCGTTGGGGCGAAAGGGGCGTC[C/T]TGGGGGTGGGAGATGC GGGTAAGGG	REV	CYP2D6	rs3892097	22q13.2b	Acceptor splice site
Custom SNP	AH1R1VW	40X	<u>GGTCAAGCTGCTGAAAATGTTTATGTGCTGGAGAAGGAGG[T/C]GGG</u> <u>GCTGCAGCTGCAGCCAGTAGCAAAGAATCGCACACAC</u>	FWD	CYP3A1	rs2177180	7q21.1	Intron Variant

Product Type	Forward Primer Seq.	Reverse Primer Seq.	Reporter 1 Sequence	Reporter 2 Sequence	Context Sequence
Custom SNP	<u>GTGTGTGCGATTCTTT</u> <u>GCTACTG</u>	<u>GGTCAAGCTGCTGAAA</u> <u>TGTTTATGT</u>	VIC- <u>CAGCCCC[A]CCTCCT</u>	FAM- <u>AGCCCC[G]CCTCCT</u>	<u>GGTCAAGCTGCTGAAAATGTTTATGTGCTGGAGAAGGAGG[T/C]GG</u> <u>GCTGCAGCTGCAGCCAGTAGCAAAGAATCGCACACAC</u>

A continuación se detalla la diferencia entre cada uno de los productos.

IV.C.5.a TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays

Figura IV-18. TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, 2014)



La empresa Life Technologies™ cuenta en su colección con más de 4,5 millones de ensayos TaqMan® prediseñados de todo el genoma humano. Estos ensayos se someten a pruebas de validación frente a un panel de 20 muestras de ADNg, a partir de líneas celulares del Depósito de Células de Coriell (<http://ccr.coriell.org/>), antes de su envío. Dentro del panel, hay 12 muestras masculinas y 8 femeninas, de ellas 7 corresponden a caucásicos, 7 a afroamericanos y 6 a asiáticos.

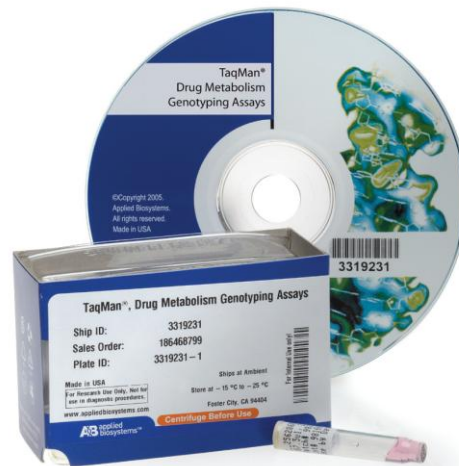
Para buscar el ensayo correspondiente al polimorfismo de interés, hay una herramienta web diseñada por Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com/taqmandme, Figura IV-19) que permite buscar por el número de 'rs' (también llamado *NCBI SNP Reference* o *dbSNP ID*) o por el nombre del gen, entre otras opciones.

Figura IV-19. Captura de pantalla de la herramienta web para la búsqueda de ensayos diseñada por Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com/taqmandme)

The screenshot displays the 'TaqMan® SNP Genotyping Assays' web page. At the top, there is a navigation bar with links for 'Order Support', 'Sign In', 'Register', 'Quick Order', and 'Cart'. The main heading is 'TaqMan® SNP Genotyping Assays'. Below this, a 'Description' section explains that there are 4.5 million SNP assays available, including 3.5 million HapMap SNPs, 70,000 cSNPs, and 160,000 validated assays. A list of features includes a large selection of assays, ease of use, robust design, and a simple workflow. A video player is embedded on the right with the title 'Finding the Right TaqMan® SNP Assay'. Below the description, there are navigation links for 'Search for Assays', 'Specifications', 'Manuals', and 'Help & Support Tools'. The main search area is divided into three sections: 'What type of experiment are you conducting?' with buttons for Gene Expression, SNP Genotyping (selected), Copy Number, siRNA, MicroRNA, Mutation Detection, and Antibody; 'What type of assay do you want?' with buttons for All SNP Genotyping (selected) and Drug Metabolism Assays; and 'What species do you want to target? (Select one or more)' with buttons for Human, Mouse, and All (selected). The 'Enter target information' section has a text input field with placeholder text 'e.g., Assay ID, dbSNP ID, Gene Symbol, hCV ID', a button for 'Enter / Upload Multiple Targets', and a checkbox for 'Include 10kb Flanking Region'. The 'What chromosome position are you interested in?' section has a button for 'Select a single species to search by location'. A 'Search' button is located at the bottom right of the form area.

IV.C.5.b TaqMan® Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assays

Figura IV-20. TaqMan® Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assays (Applied Biosystems, 2011b).



Se trata de una amplia colección de ensayos optimizados para genotipar múltiples tipos de polimorfismos, como SNPs, inserciones y deleciones (indels), y polimorfismos multinucleotídicos (MNPs) en genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos (DME) y proteínas transportadoras. Consta de 2 700 ensayos que detectan polimorfismos de 221 genes seleccionados según su importancia en el metabolismo y transporte de fármacos/tóxicos.

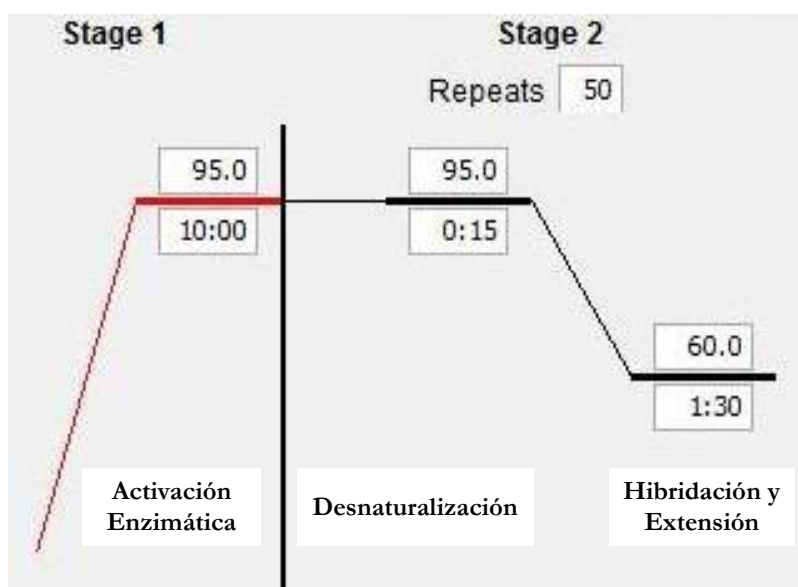
El rendimiento de esta colección de sondas TaqMan® se ha validado en 180 muestras únicas de ADN de cuatro poblaciones humanas, 45 afroamericanos, 45 caucásicos, 45 chinos y 45 japoneses.

En este tipo de ensayos se diseñaron de manera que en general se obtuvieran amplicones más largos (160 pb) con respecto al resto de productos de genotipado TaqMan® de Life Technologies™ (100 pb). Para una mejor definición de los clúster en este tipo de ensayos se establecieron unas modificaciones de las condiciones de termociclador vistas en la Tabla IV-3. El paso de hibridación y extensión aumenta de 60 a 90 segundos, y los ciclos de 40 a 50 (Tabla IV-6 y Figura IV-21).

Tabla IV-6. Condiciones del termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® DME

TaqMan® DME Genotyping Assay			
Paso	T ^a	Duración	Ciclos
AmpliTaq Gold®, UP, Activación Enzimática	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	50
Hibridación y Extensión	60 °C	90 segundos	

Figura IV-21. Esquema de las condiciones del termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® DME [Extraído Sequence Detection Software (SDS, versión 2.4)]



Del mismo modo que en el caso de los ensayos TaqMan® Prediseñados, mediante la herramienta web de Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com/taqmandme), se pueden localizar los ensayos correspondientes a los polimorfismos de DME del presente estudio. La única diferencia es que hay que marcar la casilla “Drug Metabolism Assay”.

Figura IV-22. Captura de pantalla de la herramienta web para la búsqueda de ensayos diseñada por Life Technologies™ (www.lifetechnologies.com/taqmandme)

The screenshot displays the Life Technologies website interface for the 'Drug Metabolism Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays' search tool. The page features a top navigation bar with links for 'Order Support', 'Sign In', 'Register', 'Quick Order', and 'Cart'. Below this is a search bar and a navigation menu with categories like 'Life Sciences', 'Applied Sciences', 'Clinical', and 'Shop All Products'. The main content area is titled 'Drug Metabolism Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays' and includes a breadcrumb trail: 'Home > Life Sciences > PCR > Real-Time PCR (qPCR) > Real-Time PCR Assays > Drug Metabolism Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays'. A sidebar on the left lists various assay types, with 'Drug Metabolism Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays' selected. The main content area provides an overview of the assay technology and a 'Assay Search Tool' section. This tool asks the user to specify the type of experiment (Gene Expression, SNP Genotyping, Copy Number, siRNA, MicroRNA, Mutation Detection, Antibody), the type of assay (All SNP Genotyping, Drug Metabolism Assays), and the target species (Human, Mouse, All). It also includes a section for 'Enter target information' with a text input field (e.g., Assay ID, dbSNP ID, Gene Symbol, hCV ID), a button for 'Enter / Upload Multiple Targets', and a checkbox for 'Include 10kb Flanking Region'. A final section asks for the chromosome position (Number, Position/Start, Position/Stop) with dropdown and input fields. A 'Search' button is located at the bottom right of the search tool.

Figura IV-23. Vista en detalle de una captura de pantalla de la herramienta web para la búsqueda de ensayos diseñada por Life Technologies™

What type of experiment are you conducting?

Gene Expression SNP Genotyping Copy Number siRNA

MicroRNA Mutation Detection Antibody

What type of assay do you want?

All SNP Genotyping Drug Metabolism Assays

What species do you want to target? (Select one or more)

Human Mouse All

Enter target information

e.g., Assay ID, dbSNP ID, Gene Symbol, hCV ID

Include 10kb Flanking Region

What chromosome position are you interested in?

Select a single species to search by location

IV.C.5.c TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays

Figura IV-24. TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, 2011a)



Es un servicio de diseño de ensayos TaqMan® optimizados para un polimorfismo de estudio que no se encuentra en ninguna de las anteriores colecciones (Predesigned SNP y DME). Estos ensayos personalizados son diseñados, sintetizados, formulados, validados, y se entregan en el mismo formato que los productos anteriores.

Este es el caso de uno de nuestros polimorfismos situado en un pseudogen, CYP3AP1*3, g.40G>A (dbSNP rs2177180). Para diseñar el ensayo personalizado se utiliza la herramienta web **Custom TaqMan® Assay Design Tool** (<https://www.lifetechnologies.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>; Figura IV-25)

Figura IV-25. Captura de pantalla de la herramienta web Custom TaqMan® Assay Design Tool para el diseño de ensayos personalizados.

Primero hay que asignar un nombre al proyecto en el apartado “*Status Name*”, por ejemplo CYP3AP1. En el cuadrante “*Sequence*” hay que añadir la secuencia de ADN donde está situado el polimorfismo de estudio con los siguientes requisitos

- Introducir la secuencia en la dirección 5’ a 3’.
- Introducir un tamaño de secuencia de 61 a 5 000 bases.
- La secuencia sólo tiene que estar compuesta por las letras A, C, G, T y N.
- Convertir los códigos IUPAC como R, Y, M, K, S, W, H, B, V y D a N, a excepción del sitios donde está el SNP marcado en el que hay que convertir el código en las bases apropiadas. Por ejemplo, convertir R a [A/G].
- Incluir el SNP entre corchetes [] de la siguiente forma la base para el alelo 1 seguido de una barra diagonal (/), y luego la base para el alelo 2, [Alelo1/Alelo2].

Para buscar fácilmente la secuencia de ADN que rodea al SNP de estudio (secuencia de contexto), se utiliza la base de datos Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP en NCBI SNP Reference <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Se introduce el número de ‘rs’ del SNP de interés, por ejemplo rs2177180, y se pincha en el resultado que más interese (Figura IV-26).

Figura IV-26. Captura de pantalla de la base de datos dbSNP del NCBI donde buscar el SNP de estudio.

The screenshot shows the dbSNP search interface. At the top, there is a search bar with 'SNP' selected and 'rs2177180' entered. Below the search bar are links for 'Save search', 'Limits', 'Advanced', and 'Help'. The main content area is divided into two columns. The left column shows the search results for 'rs2177180 [Homo sapiens]'. The right column shows the 'Search details' and 'Recent activity' sections.

dbSNP SNP [Save search](#) [Limits](#) [Advanced](#) [Help](#)

Display Settings: Summary **Send to:**

rs2177180 [Homo sapiens]

1.
 TGCTACTGGCTGCAGCTGCAGCCCC [A/G] CCTCCTTCTCCAGCACATAAACATT
 Chromosome: 7:99700181
 Gene: CYP3A7-CYP3AP1 (GeneView)
 Functional Consequence: intron variant
 Validated: by 1000G, by 2hit 2allele, by cluster
 Global MAF: C=0.2865/623
 HGVS: NC_000007.14:g.99700181C>T, NG_000856.2:g.40G>A, NM_001256497.1:c.1498-4335G>A, NT_007933.16:g.37193402C>T

Search details

rs2177180 [All Fields]

[See more...](#)

Recent activity

Turn Off Clear

rs2177180 (1) SNP

Una vez dentro del dbSNP del estudio, se selecciona el apartado “*Fasta sequence*” (Figura IV-27), donde está la secuencia de contexto necesaria para copiarla, darle el formato requerido, y pegarla en el cuadrante “*Sequence*” de la herramienta web para el diseño de ensayos TaqMan[®] (Figura IV-28). Y tras pulsar a “Sumit” realizar así el pedido de la sonda de interés.

Figura IV-27. Captura de pantalla de la secuencia que rodea al SNP de estudio en de la base de datos dbSNP del NCBI.

```

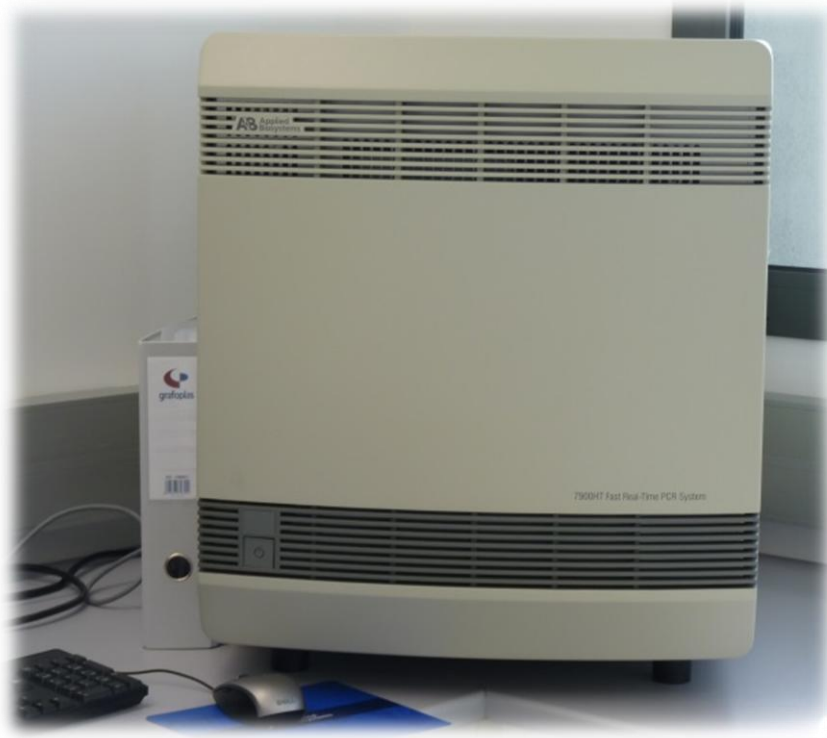
Fasta sequence (Legend)
>gnl|dbSNP|rs2177180|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|snpclass=1|alleles='A/G'|mol=Genomic|build=138
CTCACCTCTG CTAAGGAAA CAGGCACAGA AACCCACAAG GGTGGTAGAG AGGAAATAGG
ACAATAGGAC TGTGTGAGGG GGATAGGAGG CACCCAGAGG AGGAAATGGT TACATCTGTG
TGAGGAGGTT GGTAAAGGAAA GACTTTAACA GAAGGGGTCT GTCTGGCTGG GCGTGCAAGG
ATGTGTAGGA GTCATCTAGG GGGCACAAAT ACACCTCCAGG CAGAGGGAAAT TGCATGGGTA
AAGATCTGCA GTTGTGGCTT GTGGGGATGG ATTTCAAGTA TTCTGGAATG AAGACAGCCA
TGGAAACAAG GGCAGGTGAG AGGATATTTA AGAGGCTTCA TGCCAATGGC TCCACTTCAG
TTTCTGATAA GAACCTCAGT TCCGTGGACT CCCTGATAAA ACTGATTAAG TTGTTTATGA
TTCCCATAG AATATGAACT CAAAGGAGGT AAGCAAAGGG GTGTGTGCGA TTCTTTGCTA
CTGGCTGCAG CTGCAGCCCC
R
CCTCCTTCTC CAGCACATAA ACATTTGAGC AGCTTGACCT AAGACTGCTG TGCAGGGCAG
GGATGCTCCA GGCAGACAGC CCAGCAAACA ACAGCACACA GCTGAAAGTA AGACTCAGAG
GAGACAGTTG AAGAAGGCAA GTGGCGATGG ACCTCATCCC AAATTTGGCG GTGGAAACCT
GGCTTCTCCT GGCTGTCAGC CTTGTGCTCC TCTATCTGTC AGTAACTGTC CAGATTCCCTC
TCCTCTGTTA ACTTGGACTT GGGGTGCTAC TCAGGCCCTT GTTCCCTCAT CTGTTTTAAA
GATCAAAAGA GATGTTCAAG GAGGAGTAGC TTCTGGATG CTACAAACAC ATAGAGGTTA
TTATTGATCT TATGCAGATT TATGAAGAAA TAAATAAGCA TTTGTCCAGC CCACCTTCTA
ATTTTGGTGA CTAGGAGGGT TTGGGGACAG CATTGTGTAG TGGGAATGAT TTGATTAGCT
TAGATTTGAC CTATACTAAT
    
```

Figura IV-28. Captura de pantalla de la herramienta web Custom TaqMan® Assay Design Tool para el diseño de ensayos personalizados.

IV.C.6 Instrumental y Software

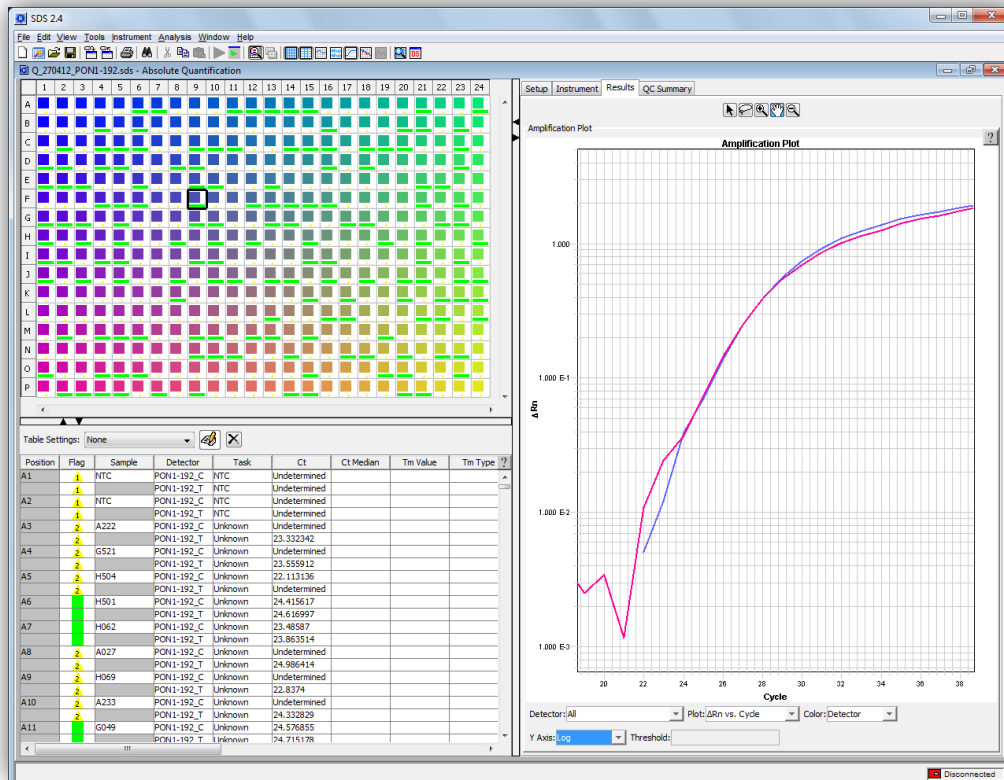
La fluorescencia se detecta utilizando cualquier instrumental de Applied Biosystems® destinado a qPCR. En el presente estudio se utilizó Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR system (Figura IV-29) y los datos resultantes se analizaron en el programa informático SDS versión 2.4.

Figura IV-29. Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR system.



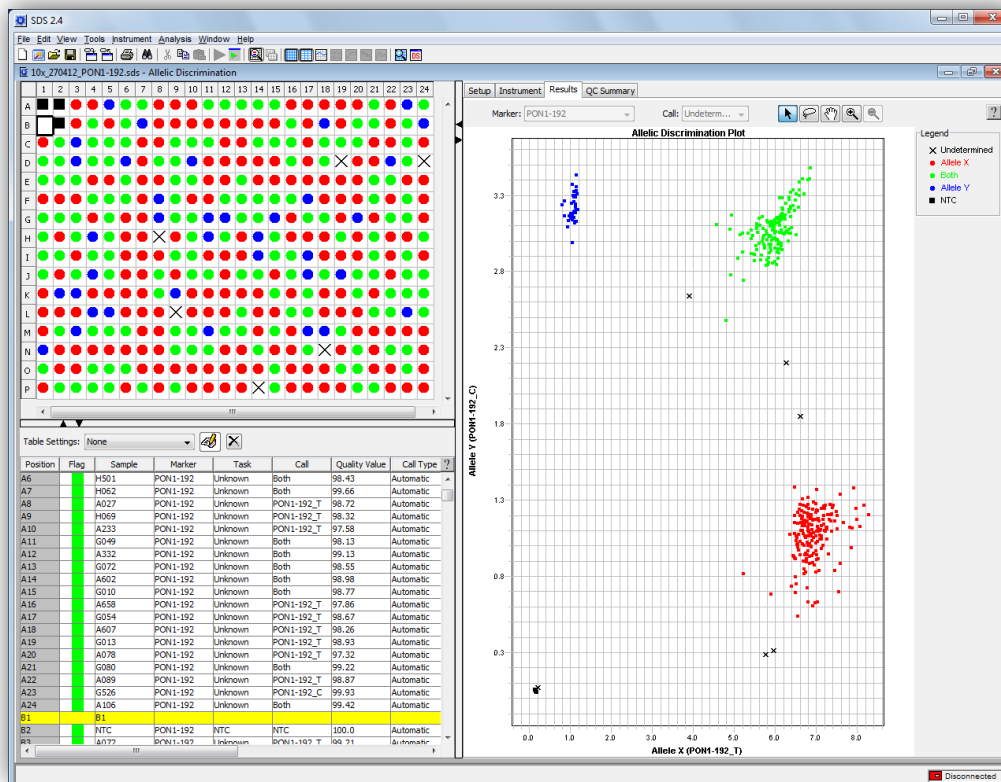
Una vez analizados los resultados con el software SDS, hay que interpretarlos. Por un lado, se obtienen datos de qPCR donde se pueden ver los alelos amplificados según la intensidad de fluorescencia acumulada en cada ciclo de la amplificación por PCR (Figura IV-30).

Figura IV-30. Captura de pantalla del software SDS. Disposición de las muestras en la placa 384 (parte superior izquierda), características de las muestras (parte inferior izquierda) y Panel de amplificación en escala logarítmica (mitad derecha).



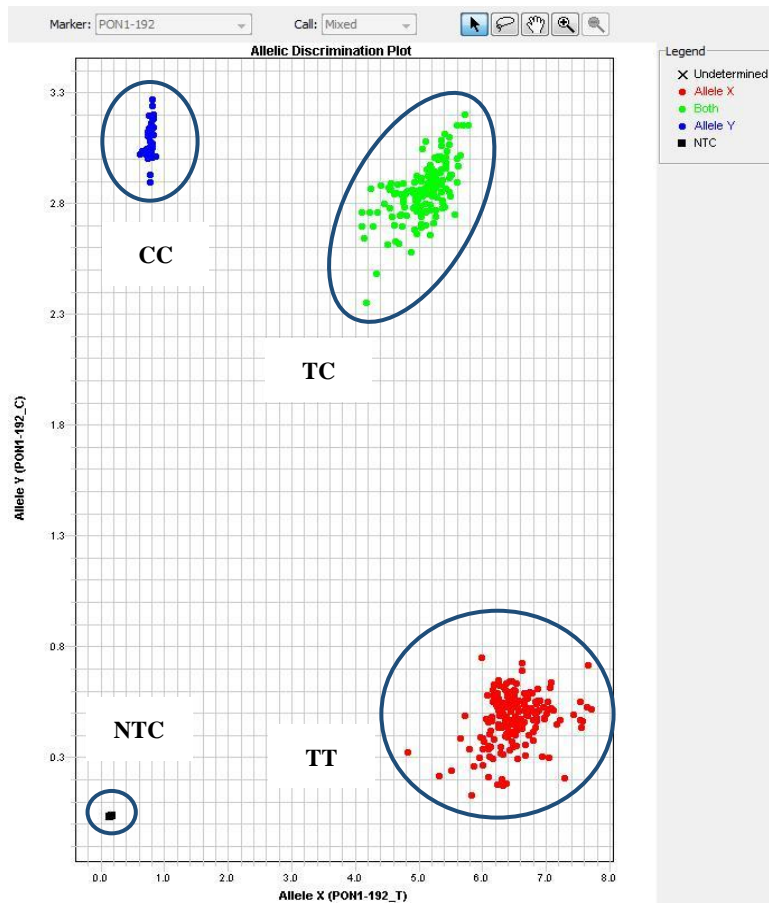
Al concluir la amplificación por PCR, se obtienen resultados de fluorescencia de PCR a tiempo final, donde el software SDS representa los datos de intensidad normalizada R_n del alelo 1 y R_n del alelo 2 con respecto a R_n de la Referencia Pasiva (Figura IV-31).

Figura IV-31. Captura de pantalla del software SDS. Disposición de las muestras en la placa 384 (parte superior izquierda), características de las muestras (parte inferior izquierda) y Panel de discriminación alélica (mitad derecha).



El panel de discriminación alélica del software SDS asigna de forma automática un genotipo (Homocigoto alelo 1, CC; Homocigoto alelo 2, TT; Heterocigoto, TC) según las agrupaciones de muestras que se representan con respecto a los resultados de R_n obtenidos.

Figura IV-32. Plot de discriminación alélica.

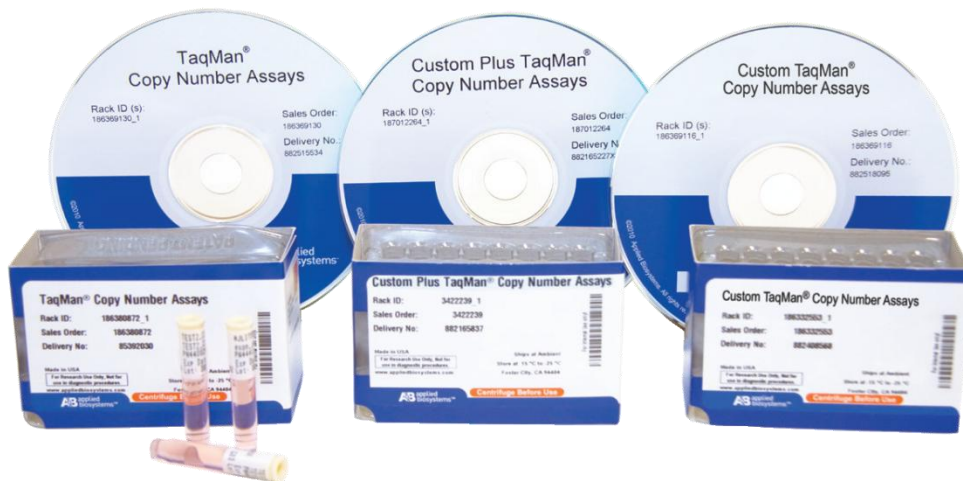


IV.C.7 Detección de Copy Number Variant (CNV)

Las tecnologías basadas en microarrays son herramientas potentes para análisis de CNVs a gran escala, pero no constituyen la plataforma óptima para la validación y detección de CNVs en un alto número de muestras. Para ello se requiere una tecnología más cuantitativa que ofrezca alta precisión, especificidad, facilidad de uso y rendimiento de la muestra, como es el caso del producto de Life Technologies™ llamado TaqMan® Copy Number Assays (CNA).

IV.C.7.a TaqMan® Copy Number Assay (CNA)

Figura IV-33. TaqMan® Copy Number Assays (Applied Biosystems, 2010a)



Applied Biosystems® de Life Technologies™ ha desarrollado más de 1,6 millones de TaqMan® Copy Number Assays (CNAs, ensayos de número de copias) prediseñados para la detección de CNVs de forma más precisa, específica y cuantitativa. Estos ensayos se dirigen a genes (regiones codificantes, exones; y no codificantes, intrones) y zonas intergénicas, y permiten detectar un gran número de muestras y validar los datos obtenidos de microarrays y otras plataformas de genotipado. Los TaqMan® CNAs prediseñados ofrecen cobertura en todo el genoma, abarcando más del 95% de los genes incluidos en la base de datos Reference Sequence (RefSeq) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>) y el 85% de las CNVs incluidas en la Database of Genomic Variants (DGV; versión hg18.v6, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Hay un promedio de 40 ensayos por cada gen y 80 ensayos por cada locus de CNV.

Los ensayos de número de copias (CNAs) permiten detectar de manera cuantitativa el número de copias de ADN combinando la tecnología *TaqMan*[®] y la *qPCR*. *TaqMan*[®] *Copy Number Assay* se ejecuta de forma simultánea con *TaqMan*[®] *Copy Number Reference Assay* en una *qPCR* dúplex. El *Copy Number Assay* detecta el gen diana y el *Reference Assay* detecta una secuencia de un gen que está presente sólo en dos copias en un genoma diploide. Los genes de referencia utilizados en esta tecnología son el gen humano Ribonucleasa P (RNasa P) y la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT).

El número de copias de la secuencia diana en cada muestra de ensayo se determina por la cuantificación relativa (RQ) usando el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$). Este método mide la diferencia de C_T (ΔC_T) entre el objetivo y las secuencias de referencia. A continuación, compara los valores ΔC_T de las muestras de ensayo con una muestra de calibrador conocido por tener dos copias de la secuencia diana. El número de copias de la diana se calcula como dos veces la cantidad relativa.

La sonda marcada con FAM[™] hibrida en una zona del gen de estudio, y la sonda marcada con VIC[®], llamada *TaqMan*[®] *Copy Number Reference Assay*, se une a un gen de referencia. Estos genes de referencia, como se ha dicho, están presentes en dos copias en un genoma diploide, independientemente del número de copias de la diana de interés, y se utilizan para normalizar la entrada de la muestra y minimizar la variación entre los objetivos de la prueba y ensayos de referencia.

Los resultados se analizan por el método de cuantificación relativa usando el software *CopyCaller*[®].

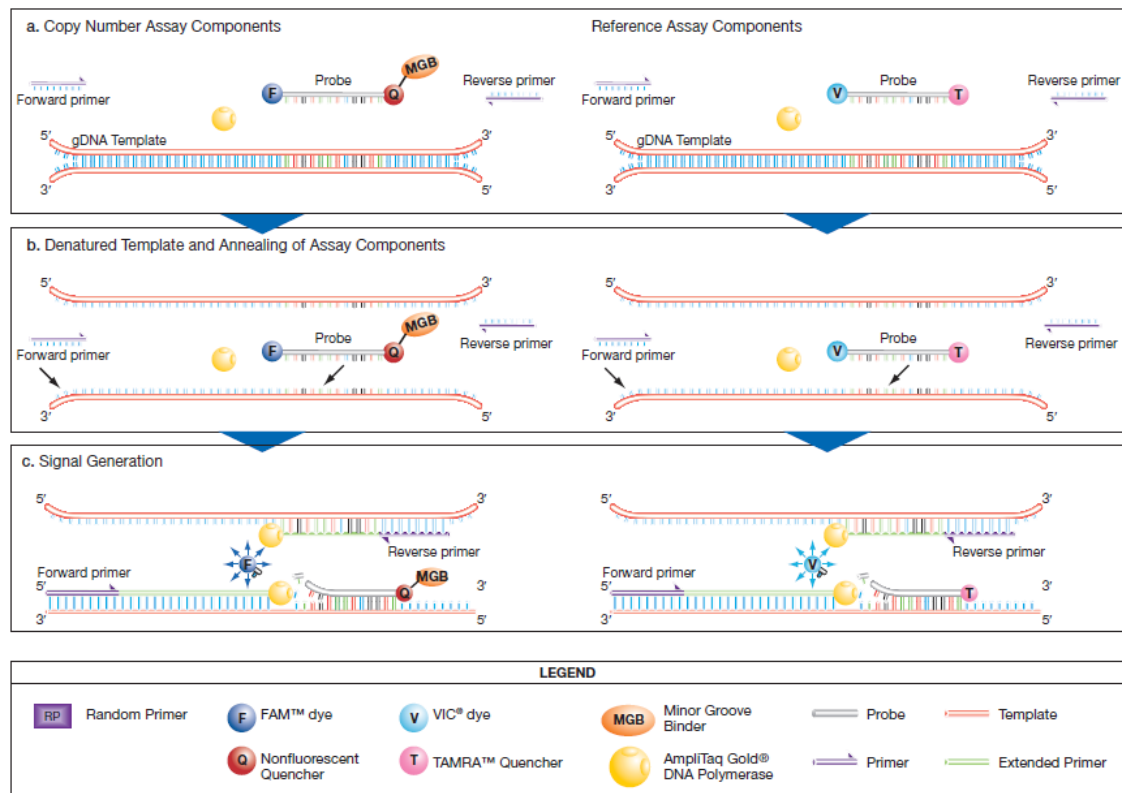
La Figura IV-34 muestra los pasos de la reacción de *PCR* dúplex que contiene los ensayos para el número de copias diana y de referencia, siendo ambos ensayos del tipo nucleasa 5'.

Durante la amplificación por *PCR*

- Se mezclan en un solo tubo, una cantidad de *TaqMan*[®] *Copy Number Assay*, *TaqMan*[®] *Copy Number Reference Assay*, *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix*, y una muestra de ADN_g.
- El ADN_g se desnaturaliza y cada conjunto de cebadores del ensayo hibrida con sus secuencias diana específicas. Cada sonda *TaqMan*[®] hibrida específicamente con su secuencia complementaria entre el sitio de unión del cebador *forward* y *reverse*.
- Cuando las sondas *TaqMan*[®] están intactas, la proximidad del *quencher* al *reporter* hace que se inhiba la emisión de su fluorescencia.

- Durante cada ciclo de PCR, las secuencias diana y referencia se amplifican simultáneamente por AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa. Esta enzima tiene una actividad nucleasa 5' que degrada las sondas que se hibridan a cada secuencia del amplicón.
- Cuando una sonda TaqMan® es degradada por la actividad nucleasa 5' de la AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa, el *reporter* fluorescente se separa del *quencher*, aumentando la emisión de fluorescencia. La acumulación de productos de PCR se puede detectar a tiempo real monitorizando el aumento en la fluorescencia de cada fluorocromo en cada ciclo de PCR.

Figura IV-34. PCR y detección de las secuencias ADN g diana y referencia en una reacción dúplex.



IV.C.7.b Componentes y Cantidades de PCR

En cada placa de amplificación por PCR se necesita incluir lo siguiente

- **Muestras** individuos de genotipo desconocido.
- **Réplicas** a diferencia del genotipado de SNPs, es necesario analizar cada muestra por triplicado para darle mayor solidez a los resultados obtenidos.

- **Controles negativos** son muestras que no contienen ADN de ningún individuo pero sí el resto de componentes, denominado NTC (*No Template Control*). Los NTCs no deberían generar ningún producto de amplificación por PCR. Se añaden 2 por cada SNP estudiado.
- **Control positivo** en este caso se le llama calibrador o muestra de referencia y son muestras con un número de copias conocido. Se añade una muestra por triplicado por cada alelo del CNV a estudiar (homocigoto para la presencia del gen, homocigotos para la ausencia del gen y heterocigoto).

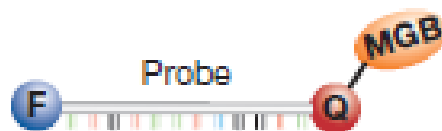
En un ensayo para la cuantificación del número de copias hay cuatro componentes en la reacción

1. **TaqMan® Copy Number Assay.**

- a) Dos cebadores no marcados para amplificar la secuencia diana de interés.
- b) Una sonda TaqMan® MGB para la detección de la secuencia diana de interés.

La sonda incluye

- *Reporter* con fluorocromo FAM™, unido al extremo 5' de la sonda.
- *Quencher* no fluorescente (NFQ) y una molécula MGB unida al extremo 3' de la sonda. La MGB aumenta la temperatura de desnaturalización (T_m) sin aumentar la longitud de la sonda, lo que permite diseñar sondas más cortas.

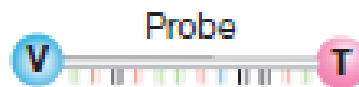


2. TaqMan® Copy Number Reference Assay.

Figura IV-35. Reactivo TaqMan® Copy Number Reference Assay.



- a) Dos cebadores no marcados para la amplificación de la secuencia de referencia.
- b) Una sonda TaqMan® TAMRA™ para la detección de la secuencia de referencia. La sonda incluye
 - *Reporter* con fluorocromo VIC®, unido al extremo 5' de la sonda.
 - *Quencher* con fluorocromo TAMRA™, unido al extremo 3' de la sonda.



Se ofrecen dos opciones para los genes que pueden ser utilizados como genes de referencia endógenos en humanos

- **RNase P** es el ensayo estándar de referencia para el análisis del número de copias. Este ensayo detecta el gen RPPH1, cuyo producto proteico es la ribonucleasa P (RNasa P) tipo H1 (H1RNA). La ubicación del ensayo es chr.14 20811565 (NCBI build 37), con un producto de amplificación de 87 pb localizado dentro de un exón del RPPH1.

- **TERT** es una opción alternativa para el gen de referencia RNAase P. Se recomienda en el caso de que los ensayos con RNasa P funcionen mal, debido a muestras con aberraciones cromosómicas u otros problemas. Este ensayo se dirige al gen de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), situado en el cromosoma 5. La ubicación del ensayo es chr.5 1253373 (NCBI build 37), con un producto de amplificación de 88 pb localizado dentro del exón 16 del gen TERT.
- 3. **TaqMan[®] Genotyping Master Mix**, que contiene AmpliTaq Gold[®] ADN polimerasa, UP (Ultra Puro) y dNTPs requeridos para las amplificaciones por PCR.
- 4. ADN genómico (**ADNg**)

Las cantidades utilizadas para las reacciones de PCR son (Tabla IV-7, pág.131)

- **ADN genómico (ADNg)** Son necesarios 10 ng de ADNg para una reacción óptima de PCR. Como en el caso del genotipado de SNPs (Tabla IV-1 en pág. 106), se utilizó ADNg evaporado en el fondo del pocillo. Para ello se prepararon las muestras en placas de 0,2 mL para PCR de 96 pocillos a concentraciones de 5 ng/ μ L, medido por espectrofotometría en la región de radiación ultravioleta/visible (UV/Vis) mediante el instrumental Infinite[®] 200 NanoQuant (Tecan), teniendo en cuenta el cociente A_{260}/A_{280} para la pureza del ADNg (Haque et al., 2003).

Se añadieron 2 μ L de cada muestra por triplicado, mediante pipeta electrónica multicanal 1-10 μ L, en el fondo de placas ópticas de 30 μ L para PCR de 384 pocillos (MicroAmp[®] Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems[®]). Posteriormente se dejaron secar las placas, con ADNg en el fondo de cada pocillo, a temperatura ambiente hasta su completa evaporación.

- **Mezcla de reacción** está compuesta por (Tabla IV-7)
 1. TaqMan[®] Master Mix (2X)
 2. TaqMan[®] Copy Number Assay (20X)
 3. TaqMan[®] Copy Number Reference Assay (20X)
 4. Agua libre de nucleasas

Tabla IV-7. Preparación de la mezcla para la reacción utilizando el método de ADNg secado en el fondo

Componente	Placa de 384 pocillos
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	5 µL
TaqMan® Copy Number Assay (20X)	0,25 µL
TaqMan® Copy Number Reference Assay	0,25 µL
Agua libre de nucleasa	4,5 µL
Volumen total por pocillo	10 µL

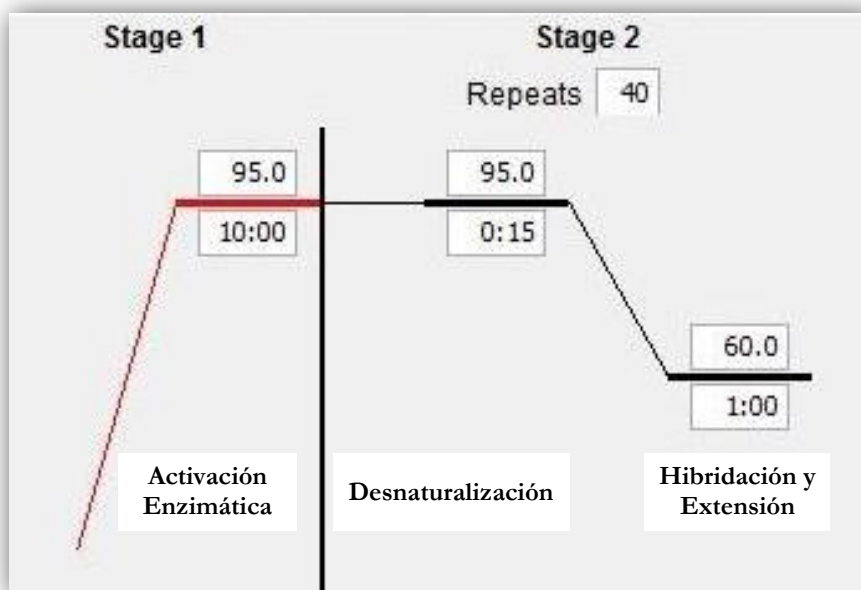
IV.C.7.c Condiciones de PCR

Las condiciones generales de PCR utilizadas fueron (Tabla IV-8 y Figura IV-36) 95 °C durante 10 min para la activación de la Taq polimerasa y la desnaturalización del ADN. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C de desnaturalización y 1 minuto a 60 °C de hibridación y extensión.

Tabla IV-8. Condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de CNVs mediante TaqMan® Copy Number Assay.

TaqMan® Copy Number Assay			
Paso	T ^a	Duración	Ciclos
AmpliTaq Gold®, UP, Activación Enzimática	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
Hibridación y Extensión	60 °C	1 minuto	

Figura IV-36. Esquema de las condiciones generales de termociclador para la amplificación por PCR para la detección de CNVs mediante TaqMan® Copy Number Assay [Extraído Sequence Detection Software (SDS, versión 2.4)]

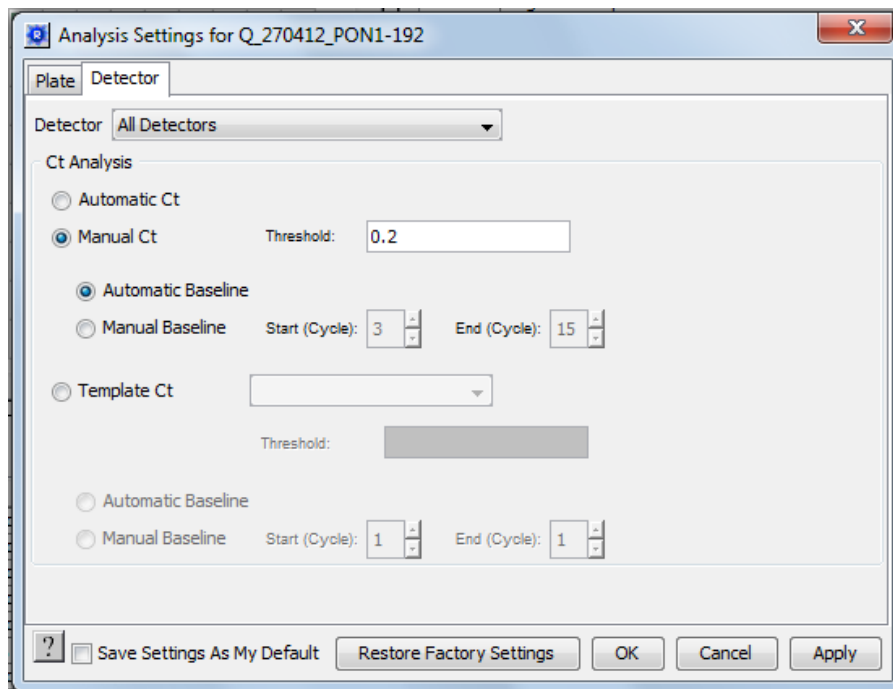


IV.C.7.d Instrumental y Software

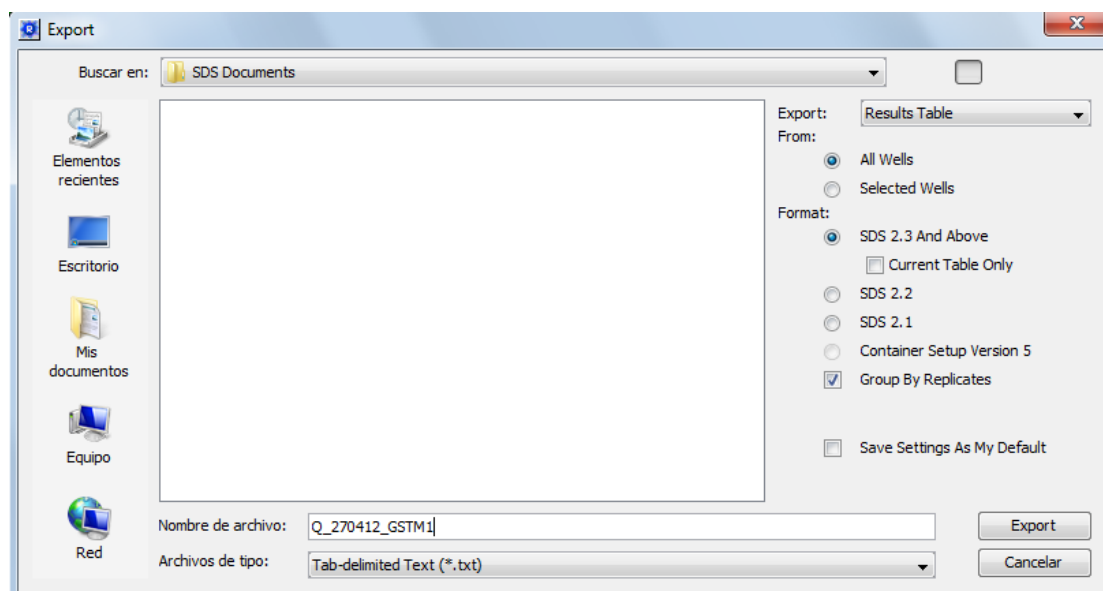
Las muestras se analizaron del mismo modo que en el caso del genotipado de SNPs (ver pág. 120). Sin embargo, tras utilizar el programa SDS v. 2.4, es necesario exportar los datos a otro programa llamado CopyCaller® versión 2.0 (<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software/real-time-pcr/copycaller.html>), que procesará los datos de qPCR y determinará el número de copias de cada muestra.

Antes de exportar los datos a CopyCaller® es necesario analizarlos en SDS Software estableciendo los siguientes parámetros (Figura IV-37)

- Establecer de forma manual el umbral (Threshold) de C_T en 0,2.
- Activar la función *Automatic Baseline*.

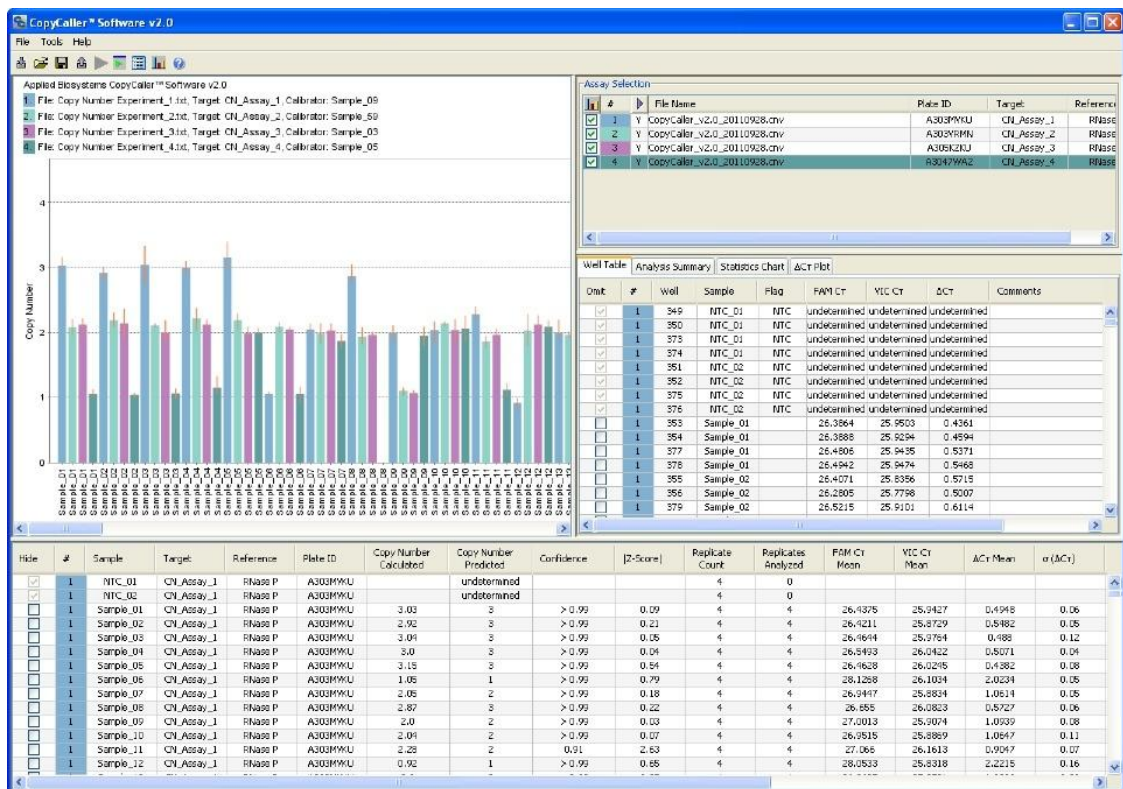
Figura IV-37. Captura de pantalla del *Analysis Setting* del programa SDS.

Se exportan los datos de qPCR en un archivo (.csv o .txt) que incluye los resultados de todos los pocillos de la placa (Figura IV-38).

Figura IV-38. Captura de pantalla del *Export* del programa SDS.

El archivo resultante se importa al programa CopyCaller[®] (Figura IV-39)

Figura IV-39. Captura de pantalla del programa CopyCaller®.

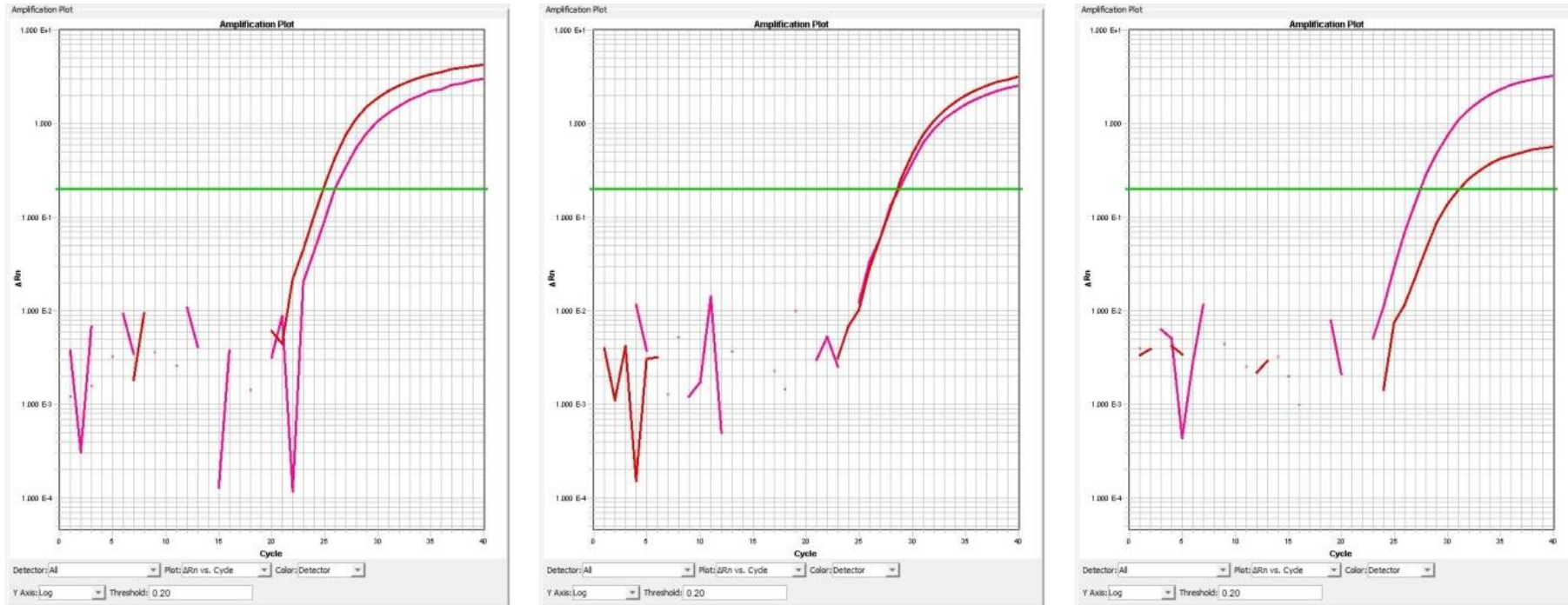


El software CopyCaller® determina el número de copias a partir de los datos de qPCR y métodos estadísticos que ofrecen datos de probabilidad de portar cada uno de los genotipos.

Los datos generados por el ensayo de número de copias es un valor ΔC_T . Este valor es la diferencia en el valor del ciclo umbral (cycle threshold, C_T) entre la secuencia genómica diana con número de copias desconocido y la secuencia de referencia endógena con número conocido que no varía. El valor de C_T es el ciclo de la PCR en el que la concentración de fluorescencia emitida por el *reporter* libre de la sonda TaqMan® es lo suficientemente alta que puede ser detectada por el instrumento de qPCR. Las muestras con más copias de la secuencia diana obtienen un C_T anterior (un número de ciclos inferior) debido a que la PCR tiene más material genético. El gen endógeno de referencia tiene poca variación en el número de copias. Por lo tanto, si un valor de C_T de una muestra con número de copias desconocido es el mismo que el C_T del gen endógeno de referencia, presumiblemente, la muestra de estudio tiene el mismo número de copias. Debido a que el proceso de PCR duplica la cantidad de material genético en cada ciclo, si el C_T de la muestra de estudio es un ciclo más alto, esta muestra debe tener la mitad del número de copias que el gen endógeno de referencia. Si el C_T de la muestra de estudio es un ciclo

menor, debe tener el doble del número de copias que el gen endógeno de referencia (Figura IV-40).

Figura IV-40. Gráficos de los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR de los diferentes genotipos representados de forma logarítmica. El marcador rosa es el gen de referencia RNase P.



En la práctica, la relación entre los valores de C_T y el número de copias que se ha descrito anteriormente puede variar debido a que en la amplificación por PCR no se duplica de manera exacta la concentración de material genético en cada ciclo. Los genes de estudio y referencia son registrados por diferentes fluorocromos (FAM[™] y VIC[®] respectivamente) que pueden diferir en los niveles de detección por el instrumento de qPCR. En general, el contexto de la secuencia de los genes de estudio y referencia no es la misma, y por tanto puede influir diferencialmente el proceso de la PCR. Además, las mutaciones en los genes de estudio y referencia también pueden influir en el proceso de PCR. El resultado final es que la relación real entre los valores de C_T y el número de copias de los genes se desvía del ideal descrito anteriormente. El modelo estadístico que tiene en cuenta esta desviación se describe en la siguiente sección.

IV.C.7.e Modelo estadístico

La naturaleza exponencial del proceso de PCR determina la característica principal del modelo. Al aumentar el número de copias del gen, disminuye la diferencia entre los valores ΔC_T sucesivos. La siguiente ecuación expresa este comportamiento

$$\Delta C_T = K - \log_{1+E} cn$$

Donde K es una constante, E es la eficiencia de la PCR del ensayo de interés, y cn es el número de copias con el rango $[1, \infty)$. Si los procesos bioquímicos y la instrumentación se comportan perfectamente como se describe en la sección anterior, entonces $K = 0$ y $E = 1$. Sin embargo, en la práctica $K \neq 0$ y $E < 1$. En la sección anterior se mencionaron varias causas posibles para esta desviación del ideal. Hay muchas otras causas, tales como fluctuaciones térmicas, diferentes comportamientos de hibridación de cebadores y sondas TaqMan[®] y la concentración de partida de una muestra. Con el uso del gen endógeno de referencia aparentemente se soluciona el principal efecto de la concentración inicial, pero no anula por completo su contribución a la variabilidad. El efecto final es que, incluso si todas las muestras tienen el mismo número de copias, los valores de ΔC_T no son necesariamente los mismos. Para modelar esta desviación, se asume que los valores ΔC_T para las muestras de un número de copias determinado se distribuyen normalmente alrededor de una media que se calcula por la ecuación anterior. Una suposición simplificadora adicional es que la variabilidad de la distribución normal (σ^2) para un número de copias dada es la misma que para el resto de números de copia. Diferentes alelos en el número de copia tienen distintas probabilidades de ocurrir dentro de un conjunto muestral, estas probabilidades vienen determinadas por las características de cada genes en cuestión. En consecuencia, la probabilidad total que cubre la distribución normal para un número de copias determinado se modula por la probabilidad de que aparezca un número de copias dentro del conjunto muestral. Con esto se completa el modelo estadístico que relaciona los valores ΔC_T con cn .

Después de filtrar los datos en cada pocillo, el software CopyCaller[®]

1. Calcula $(\Delta C_T)_w$, nivel de ΔC_T por pocillo, para cada combinación de diana/referencia en cada pocillo.

El software comienza por la normalización de la C_T de cada ensayo diana en cada pocillo con el C_T del ensayo de referencia correspondiente

$$(\Delta C_T)_w = (\Delta C_T)_{t,w} - (\Delta C_T)_{r,w}$$

donde $t = \text{ensayo de diana}$; $w = \text{pocillo}$; $r = \text{ensayo de referencia}$

Este paso ayuda a eliminar las variaciones de volumen y el pipeteado inconsistente en el experimento.

2. Calcula $\mu(\Delta C_T)$, que es la media aritmética del nivel ΔC_T de las repeticiones de la muestra, para cada combinación de gen de estudio/gen de referencia en el análisis.

Este cálculo da una estimación de los valores C_T reales y puede ayudar a reducir el error experimental.

Para cada grupo de réplicas n que representan una combinación de diana/referencia específica, se calcula el valor $\mu(\Delta C_T)$ de la siguiente forma

$$\mu(\Delta C_T) = \frac{\sum_{w=1}^n (\Delta C_T)_w}{n}$$

La forma en que el software CopyCaller[®] calcula el número de copias varía en función de la disponibilidad o no de una muestra calibrador que tiene un número de copias conocido para la diana de interés. En el caso de este estudio, la asignación del número de copias con el software CopyCaller[®] se realizó con un calibrador de la siguiente forma

3. Cálculo de $\Delta\Delta C_T$ para cada combinación de muestra/objetivo en el análisis.

El software calcula los valores de $\Delta\Delta C_T$ para cada ensayo diana y cada muestra sustrayendo $\mu(\Delta C_T)$ del calibrador correspondiente al $\mu(\Delta C_T)$ de cada muestra de ensayo (incluyendo el calibrador) para cada ensayo diana.

$$(\Delta\Delta C_T)_{s,t} = \mu(\Delta C_T)_{s,t} - \mu(\Delta C_T)_{c,t}$$

donde $s = \text{muestra}$; $t = \text{ensayo diana}$; $c = \text{calibrador}$.

4. Calcula el número de copias para cada combinación muestra/objetivo en el análisis.

Cuando un calibrador con un número de copias conocido está disponible, el software CopyCaller[®] calcula el número de copias por redondeo al número entero más próximo en el producto de la siguiente ecuación

$$\text{Número de copias} = cn_c 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

donde cn_c es el número de copias de la secuencia diana en el calibrador, y $\Delta\Delta C_T$ es la diferencia del valor ΔC_T entre la muestra desconocida y el calibrador.

IV.C.7.f Métricas de calidad

El software CopyCaller[®] genera dos métricas de calidad para cada muestra analizada una estimación de la confianza y una estimación de la desviación. Además, el software genera una estimación de la variabilidad de ΔC_T a nivel de placa.

1. Estimación de Confianza

La estimación de confianza para una muestra dada es la probabilidad de que el número de copias calculado esté correctamente asignado en comparación a la probabilidad de que ocurra cualquier otro número, distinto de cero. El software CopyCaller[®] utiliza el número de copias y valores de ΔC_T observados de una muestra para calcular la estimación de confianza para la misma en relación con el modelo teórico que se describe en el apartado “Modelo estadístico” en la página 137. El modelo de estimación de confianza es idéntico al utilizado para estimar el número de copias excepto que la eficiencia de amplificación no se supone el 100% y los valores de los parámetros se estiman de manera diferente.

2. Estimación de la desviación, |z-score|

La estimación de la desviación es el z-score absoluto, que es el valor absoluto del número de desviaciones estándar que separan la media de $\Delta C_{T,\mu_r}$ de las réplicas de una muestra, con la media de la sub-distribución, μ_r , del número de copias asignado.

La estimación de desviación utiliza el modelo estimado para la métrica de confianza y se calcula como

$$|z - score|(\mu_r, cn_{asignado}) = \left| \frac{\mu_r - \mu_{ra}}{\sigma} \right|$$

Si se utilizan barras de número de copias para estimar los valores de confianza, la estimación de |z-score| no se puede calcular porque las barras de número de copias no son distribuciones normales.

3. Estimación de la variabilidad de ΔC_T

La variabilidad de ΔC_T a nivel de la placa es un valor de la desviación estándar, que es una estimación de la variabilidad en las mediciones de ΔC_T para un ensayo en todas las muestras de un análisis. Se deriva mediante el ajuste de los valores de ΔC_T de la muestra a

un modelo que es esencialmente una superposición de los grupos de número de copia distribuciones normales con sus centros en el ΔC_T promedio de cada grupo el número de copias. La variabilidad se supone que es la misma en todos los grupos de número de copias (es decir, el conjunto de distribuciones normales tiene la misma desviación estándar). Este valor de la desviación estándar estimada para el modelo se presenta como la estimación de la variabilidad a nivel de placa.

En general, valores superiores al 0,95 de confianza en las muestras analizadas son considerados óptimos para determinar el número de copias con un potencial estadístico alto.

IV.D Determinación de aductos N7-MedG en el ADN

El tipo de aducto de ADN N7-metildeoxyguanosina (N7-MedG) es uno de los biomarcadores más útiles de la exposición reciente a agentes metilantes, ya que es el aducto predominante formado por estos compuestos y su reparación es relativamente lenta (Saffhill et al., 1985). Se conocen varias técnicas para la detección y cuantificación de N7-MedG en ADN humano, por ejemplo el post-marcaje con moléculas radioactivas ^{32}P (PPL) (Crosbie et al., 2013), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia o electroquímica, inmunoensayo ligado a enzima (Poirier y Weston, 1996), y espectrometría de masas (You y Wang, 2016). Los ensayos basados en la PPL presentan mayor sensibilidad y, por lo tanto, se consideran el método más apropiado para cuantificar N7-MedG, particularmente cuando la cantidad de ADN es limitada. Sin embargo, este tipo de ensayo requiere múltiples separaciones cromatográficas, incluida la cromatografía bidimensional de capa fina, que no se presta a un análisis de alto rendimiento, lo que consume mucho tiempo y es laborioso. Por estas razones, los ensayos de PPL aún no se han aplicado a un gran número de análisis o una amplia variedad de tejidos. Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo que sea rápido y sensible que sea aplicable a estudios epidemiológicos a gran escala usando pequeñas cantidades de ADN.

IV.D.1 Immunoslot blot (ISB)

En el presente estudio, se desarrolló el ensayo de inmunotransferencia llamado Immunoslot Blot (ISB) para medir cantidades de N7-MedG en pequeñas cantidades de ADN (aprox. 5 μg) que se pueden obtener de pequeñas biopsias de rutina. Este ensayo utiliza anticuerpos policlonales contra la forma de N7-MedG unida al anillo de imidazol químicamente estabilizado. Se preparó ADN de timo de ternero modificado con N-Nitroso-N-metilurea (MNU) y se usó para establecer condiciones de ensayo óptimas. El ensayo puede detectar niveles del aducto en el ADN humano a partir de glóbulos blancos, tumor de vejiga, mucosa colorrectal y biopsias de carcinoma de individuos expuestos a agentes metilantes.

Los niveles de N7-MedG se determinaron a partir de ADN extraído de sangre usando este método de ISB previamente publicado (Harrison et al., 2001) con algunas modificaciones

(Gómez-Martín, Altakroni, et al., 2015). En resumen, el ADN de las muestras y los patrones de ADN de timo de ternera metilado con N-nitrosourea metilada se trataron con álcali (NaOH 70 mM, a 37°C durante 30 minutos), se neutralizaron, se desnaturalizaron por calor (5 min a 100°C) y se enfriaron en hielo (10 minutos).

IV.D.1.a Cuantificación de ADN mediante PicoGreen®

Las muestras de ADN extraídas mediante el protocolo para 3 mL del Kit REALPURE “SSS” (DURVIZ SL, 2013) explicado en la sección IV.B.2 más atrás, son diluidas hasta alcanzar una concentración de 50 ng/μL, para ellos es necesario cuantificar por el método de fluorometría PicoGreen®, que consiste en

1. Generar una curva estándar con 10 μL de concentraciones seriadas (0,5; 0,75; 1; 1,2; 1,5; 1,75; 2 ng/μL) a partir de ADN estándar a 100 ng/μL de timo de ternera (Calf Thymus ADN standard, CT ADN estándar) en TE buffer. Cargar los puntos de la curva por duplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos.
2. Diluir las muestras de ADN por duplicado hasta una concentración de 1 ng/μL con TE buffer. Para cada dilución cargar dos réplicas de 10 μL en los pocillos.
3. Preparar la solución de PicoGreen® añadiendo 10 μl del reactivo PicoGreen® en 10 mL TE buffer.
4. Añadir 100 μL de solución de PicoGreen® a cada pocillo y mezclar por pipeteo.
5. Escanear la placa con el instrumental GENios Microplate Reader (Tecan, Austria) (Imagen IV-1 más adelante).
6. Utilizar el software Magellan™ para analizar los resultados. Si el coeficiente de variación (CV) es mayor del 6% en alguno de los duplicados hay que repetir la determinación para esa dilución. El coeficiente de correlación (r) para la curva estándar debe ser de al menos 0,99 (Figura IV-3 en la pág. 90).

IV.D.1.b Protocolo de Immunoslot blot (ISB)

1^{er} DÍA

1. Diluir las muestras de ADN a 50 ng/μL con KH₂PO₄ (10 mM, pH 7) en un volumen de 135 μL.

2. Preparar las dos muestras necesarias para en pasos posteriores generar la curva estándar (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 fmol N7-MeG/ μg ADN)
 - a. Añadir 400 μL de CT ADN estándar a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, diluido en KH_2PO_4 (10 mM, pH 7), en un tubo de 2 mL. Corresponde con ADN comercial UltraPure™ Calf Thymus ADN Solution (Invitrogen™).
 - b. Añadir a un tubo de 0,5 mL con 65 μL de N7 estándar a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ en KH_2PO_4 (10 mM, pH 7). Esta muestra es ADN metilado estándar previamente preparado con CT ADN estándar tratado con N-metil-N-nitrosourea y medido la cantidad de N7-MeG por μg ADN mediante PPL.
3. Las muestras del estudio se preparan de la siguiente forma
 - a. Transferir 65 μL de muestra de ADN a un tubo de 0,5 mL rotulado como **NRO** (non-ring opened, sin anillo abierto) y mantenerlo en hielo.
 - b. Transferir 65 μL de muestra de ADN a un tubo de 0,5 mL rotulado como **RO** (ring opened, anillo abierto) y mantenerlo en hielo.
1. Añadir 1,53 μL de NaOH 3M a cada tubo RO y N7 estándar. No añadirlo a los tubos NRO ni al tubo de CT ADN estándar.
2. Agitar en vortex e incubar a 37° C durante 30 min. No hacer esto con los tubos NRO ni CT ADN estándar.
3. Agitar en vortex de nuevo y centrifugar durante 10 seg después de la incubación.
4. Añadir 200 μL de PBS al tubo de CT ADN estándar y mezclar.
5. Preparar una mezcla con las siguientes cantidades, según el número de tubos de RO y N7 estándar del análisis 1,95 μL de K_2HPO_4 (1M, pH 7); 4,87 μL de HCl (1M); 24,4 μL de PBS 1X (tampón fosfato salino). Añadir 32,22 μL a cada tubo RO y N7 estándar.
6. Añadir 32,75 μL de PBS 1X sólo al tubo NRO.
7. Vortear y centrifugar 10 seg. A continuación, calentar todos los tubos a 99° C durante 5 min, y después enfriar rápidamente en hielo durante 10 min. Centrifugar de 5 a 10 seg tras el enfriado.
8. Añadir 250 μL de acetato de amonio al tubo de CT ADN estándar, y 162,5 μL a cada tubo RO, NRO y N7 estándar. La concentración en todos los tubos debe ser 12,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (=1 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$).

9. Preparar un rango de diluciones de N7 estándar con el CT ADN estándar preparado, en volúmenes de 180 μ L para cada dilución de la curva estándar.
10. Cortar una membrana de nitrocelulosa (NC; Protran[®] BA79, tamaño de poro 0,1 μ m; Whatman[®], Germany) y un trozo de papel Whatman[®] 3MM que se ajuste al tamaño del PR 648 Slot Blot Manifold (GE Healthcare Life Sciences). Usar guantes limpios para la manipulación.
11. Marcar la parte de arriba de la membrana de NC con un lápiz. Humedecer la membrana en 100 mL de agua destilada en una cubeta de plástico de dimensiones no superiores a tres veces el tamaño de la membrana. Desechar el agua y humedecer con 10 mL de acetato de amonio tanto la membrana como el papel 3MM.
12. Montar el instrumental PR 648 Slot Blot Manifold según las indicaciones del fabricante (<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/es/GELifeSciences/80609558>) y unirlo a una bomba de succión (Imagen IV-2 más adelante).
13. Cargar en cada pocillo 80 μ L de cada dilución seriada para la curva estándar (por duplicado), y 80 μ L de cada tubo RO y NRO (por triplicado).
14. Encender la bomba de succión a 200 mVar.
15. Cuando todos los pocillos estén secos, añadir 200 μ L de acetato de amonio 1M a cada uno.
16. Una vez estén todos los pocillos secos de nuevo, retirar el tubo que conecta con la bomba de succión y apagarla.
17. Retirar la membrana de NC y llevarla a un horno a 80° C durante 90 min.
18. Preparar una solución PBS-Tween (PBST) al 0,1% v/v, añadiendo 1 mL de Tween[®] 20 a 1 000 mL de PBS 1X.
19. Preparar la solución PBST-leche al 5% (p/v) añadiendo 5 g de leche en polvo libre de grasa en 100 mL de PBST.
20. Diluir 1/10 la solución PBST-leche 5% con PBST para obtener dicha solución al 0,5% en un volumen final de 100 mL.

21. Bloquear la membrana de NC, en la misma cubeta de plástico limpia utilizada anteriormente, cubriéndola con 90 mL de PBST-leche 5% en agitación durante 60 min a temperatura ambiente.
22. Desechar el PBST-leche 5% y lavar la membrana de NC cubriéndola con 100 mL de PBST y dejarlo en agitación durante 10 min a temperatura ambiente.
23. Preparar 25 mL de solución de anticuerpo primario en un tubo añadiendo 2 μ L de anticuerpo primario policlonal de conejo (\sim 1/10 000) a PBST-leche 0,5% (Harrison et al., 2001). Este anticuerpo se une al grupo imidazol del anillo abierto del N7-MedG. La membrana de NC se incuba en agitación toda la noche a 4°C dentro de una cubeta del mismo tamaño que la membrana de NC.

2º DÍA

24. Lavar la membrana de NC en agitación tres veces con 100 mL de PBST-leche 5% durante 5 min en la misma cubeta a temperatura ambiente.
25. Preparar la solución de anticuerpo secundario, diluyendo el anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés Horseradish Peroxidase) a \sim 1/75 000 (Dako, Denmark) en 20 mL de PBST-leche 0,5%. Incubar la membrana de NC en la cubeta durante 60 min 4° C dentro de la cubeta.
26. Dejar la membrana durante 45 min a temperatura ambiente.
27. Alicuotar 3 mL de la solución A y B del reactivo ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia Biotech) por separado y dejar a temperatura ambiente 20 min en oscuridad.
28. Mientras tanto, lavar la membrana de NC en agitación tres veces con 100 mL de PBST-leche 5% durante 5 min en la misma cubeta a temperatura ambiente.
29. Coger con pinzas una esquina de la membrana y mantenerla verticalmente encima de papel secante hasta su secado completo.
30. Llevar la membrana a un trozo de plástico. Mezclar los dos tubos con la solución A y B, y cubrir de forma homogénea toda la superficie de la membrana de NC durante 3 min en oscuridad.
31. Coger con pinzas una esquina de la membrana y mantenerla verticalmente encima de papel secante durante 3 segundos para eliminar el exceso de líquido. Llevarla a

- un trozo de plástico limpio abierto por la mitad, de dimensiones un poco superiores a la membrana de NC, y cerrarlo dejando una capa homogénea de reactivo. Evitar la formación de burbujas tocando lo menos posible la superficie de la membrana.
32. Colocar la membrana dentro de un casete radiográfico de exposición a rayos-X en un cuarto oscuro (Imagen IV-3, pág. 148), con una película fotográfica (Hyperfilm™ ECL, Amersham) encima y cerrarlo.
 33. Después de 30 seg de exposición, revelar la película en *Developer* primero y en *Fixer* después, reactivos químicos de KODAK GBX, y finalmente en agua, con una duración de unos 3 min cada uno. Si las bandas visualizadas no se ven con claridad o al contrario están demasiado intensas (tomar de referencia la curva estándar), repetir desde el punto 35 cambiando los tiempos de exposición (por ejemplo, de 2 a 15 min).
 34. Escanear la película fotográfica revelada mediante un escáner óptico y cuantificar la intensidad de cada banda mediante ImageJ software.
 35. Calcular los niveles de N7-MedG de las muestras problema, expresada en fmol/ μ g ADN (μ mol N7-MedG/mol dG), sustrayendo los valores de intensidad obtenidos en NRO e interpolando estos valores resultantes en la curva estándar generada (Figura IV-41 en la pág. 148).

Imagen IV-1. Instrumental GENios Microplate Reader (Tecan, Austria) para la lectura por PicoGreen.



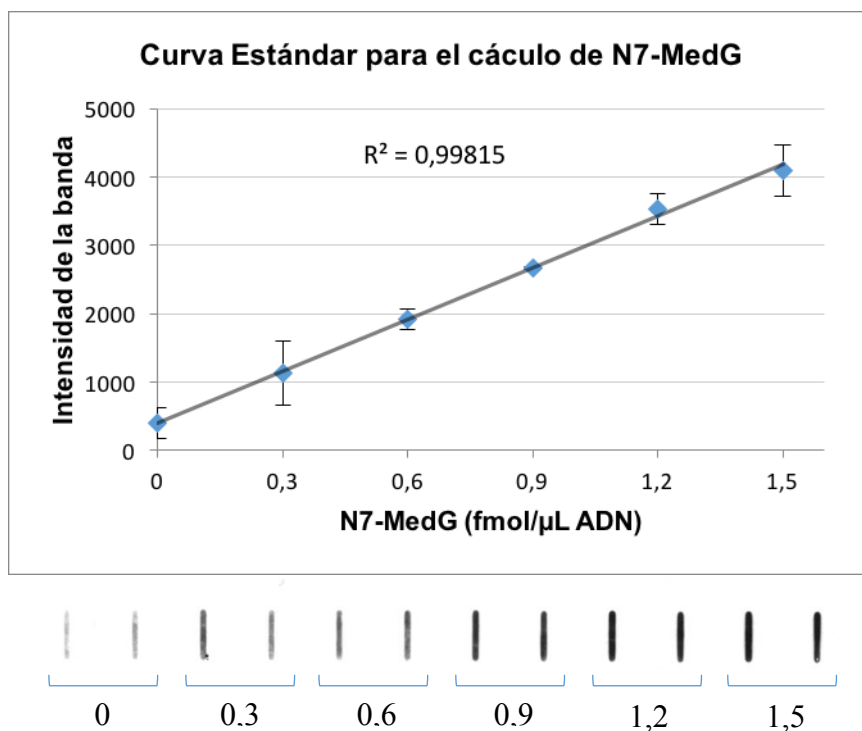
Imagen IV-2. Instrumental PR 648 Slot Blot Manifold junto a la bomba de succión.



Imagen IV-3. Casete radiográfico de exposición a rayos-X donde se coloca una película fotográfica (Hyperfilm™ ECL, Amersham)



Figura IV-41. Gráfico de la curva estándar con 6 puntos por duplicado de muestras estándar con diferentes cantidades de N7-MedG. Debajo del gráfico está la imagen de la película fotográfica en la que se observan las diferentes bandas para cada estándar por duplicado (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5). Los valores de intensidad son calculados con el software ImageJ.



IV.E Análisis estadístico

IV.E.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon gracias al complemento de Excel GenAlEx.

IV.E.2 Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE)

Para la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) de los polimorfismos estudiados, se ha efectuado la prueba χ^2 de Pearson, comparando las frecuencias genotípicas observadas en el estudio con las frecuencias esperadas obtenidas mediante el principio del HWE. Para el análisis se han utilizado tres software diferentes con objeto de comparar los datos GenAlEx, Haploview y Arlequin.

IV.E.3 Desequilibrio de ligamiento (LD)

Mediante el software Haploview 4.2 (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) se analizó el desequilibrio de ligamiento (LD) (Barrett et al., 2005) y se calcularon los valores D' , r^2 y el IC 95% (intervalo de confianza al 95%) entre pares de SNPs. El análisis del LD se realizó por separado según los dos orígenes ancestrales diferentes de la población de estudio.

IV.E.4 Haplotipos

El software Haploview 4.2 (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) también se utilizó para determinar los haplotipos.

IV.E.5 Modelos mixtos

Los niveles de N7-MedG fueron transformados logarítmicamente para normalizar su distribución. Como se tomaron muestras de sangre de un mismo individuo en dos periodos diferentes de una misma temporada agrícola, en los que se determinaron N7-MedG y las actividades colinesterasa eritrocitaria y sérica, los datos dobles de N7-MedG y colinesterasas para cada individuo se ajustaron para medidas repetidas y se analizaron mediante modelos lineales de efectos mixtos. Los sujetos se consideraron como efectos aleatorios y todos los demás factores se añadieron como efectos fijos. Todos los análisis se realizaron en R versión 3.01 utilizando el paquete lme4 (<http://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>) y los valores de P específicos de cada parámetro se calcularon en base a aproximaciones de Satterthwate utilizando el paquete lmerTest (<http://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/lmerTest.pdf>). Mediante la prueba de correlación de Pearson se analizó la correlación entre las variables continuas (niveles N7-MedG, actividad colinesterasa, edad, IMC y el número de tazas de café / té consumidas por día). Se utilizó la prueba t de *student* para comparar si había diferencias en los valores medios de N7MedG, AChE y BChE en cada período de estudio según sexo, consumo de tabaco y alcohol y equipos de protección individual utilizados. Estos análisis se realizaron con el paquete de software estadístico SPSS (SPSS 20.0 para Windows).

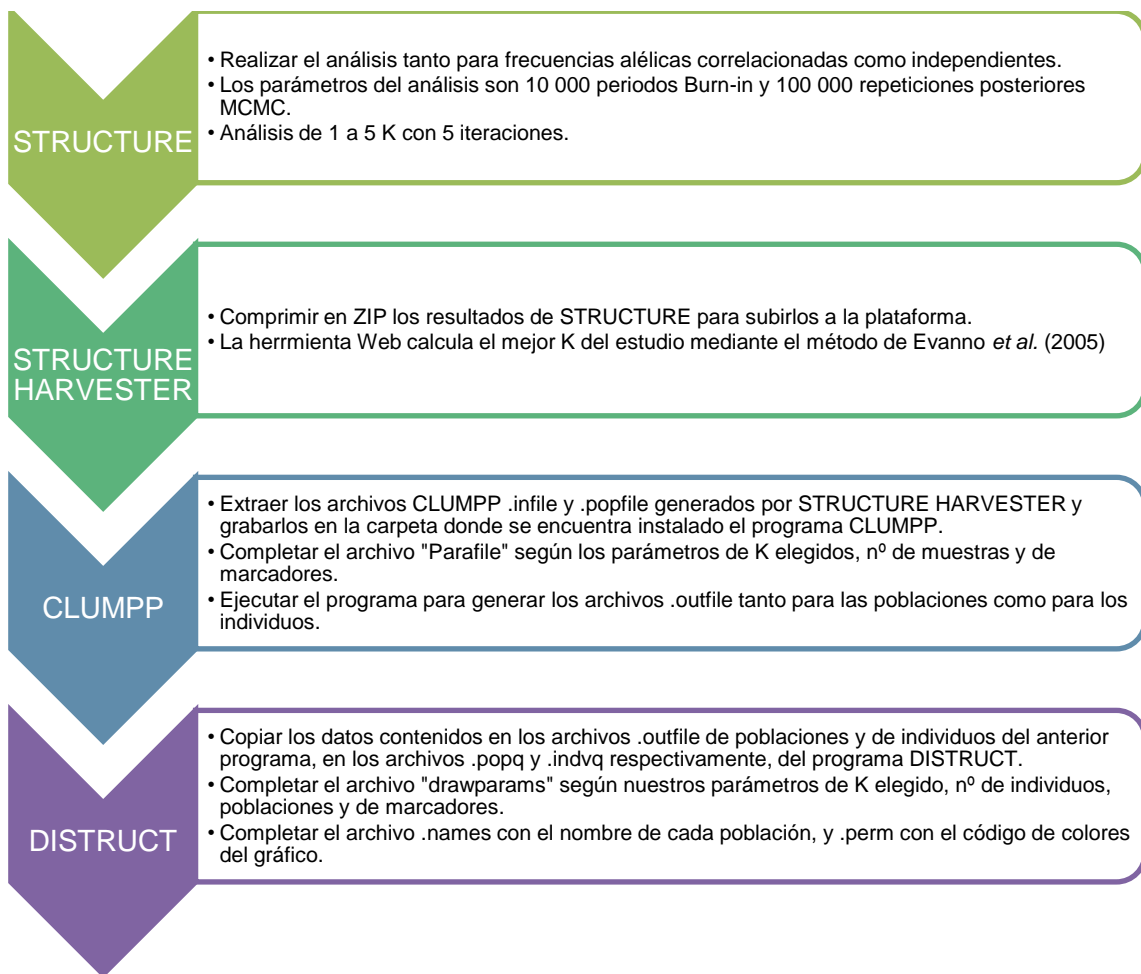
IV.E.6 Estructura Poblacional

La estructura poblacional se analizó mediante métodos Bayesianos, que son los más utilizados en la actualidad. Estos métodos se basan en determinar si unas partes del genoma, llamados clúster, se heredan con mayor frecuencia desde una población parental. Este método asigna individuos a poblaciones estimando las frecuencias alélicas de cada locus. Pritchard et al. (2000) establecieron este método para identificar diferentes poblaciones y, una vez identificadas, se estudia la ascendencia de los individuos (Pritchard et al., 2000). Para ello se parte de dos modelos uno no-combinado, que asume que los individuos proceden de únicamente de una de las K poblaciones y el otro es un modelo combinado, que permite mezcla de los ancestros; es decir, una fracción q_K del genoma de un individuo viene de la subpoblación K ($\sum_K q_K = 1$). Estos modelos están disponibles

en el programa STRUCTURE v2.3.4 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/>). El requerimiento del mismo es que las frecuencias alélicas de la población se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg y que no haya ligamiento entre los loci, por lo que se requiere un muestreo adecuado.

El flujo de trabajo para el análisis de la estructura poblacional requiere del uso secuencial de varios programas informáticos, esquematizado en la Figura IV-42.

Figura IV-42. Esquema del flujo de trabajo con los diferentes programas utilizados para el análisis de la estructura poblacional



Antes de estudiar la estructura poblacional con el programa STRUCTURE, es necesario realizar diferentes análisis para determinar si las poblaciones de estudio siguen un modelo combinado o no-combinado y si los marcadores genéticos se comportan de manera correlacionada o independiente. Además, es necesario calcular el menor valor de K que recoge la estructura principal de los datos del estudio. En el presente estudio el mejor valor de K se puede inferir mediante dos métodos

- **Uso de la probabilidad logarítmica para cada K, $\text{LnP(D)} = \text{L(K)}$** Cuando el valor de K calculado se aproxima al K verdadero, L (K) se estabiliza en una meseta (o sigue aumentando ligeramente) y tiene una alta varianza entre análisis (Rosenberg et al., 2001). Se usa el test no paramétrico de Wilcoxon.
- **Uso de Delta K (ΔK)** Cálculo basado en el cambio de probabilidad (ΔK) (Evanno et al., 2005). ΔK muestra un pico claro en el valor K verdadero.

Para realizar estos cálculos en STRUCTURE, se estableció un número alto de repeticiones, debido a la similitud de las muestras de estudio, con 10 000 periodos “*burn-in*”¹, seguidos de 100 000 repeticiones posteriores según el método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC). Se calculó un número de componentes ancestrales (K) de partida de 1 a 5.

Los datos obtenidos se tratan posteriormente con el programa online STRUCTURE HARVESTER (http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) para determinar el mejor valor de K mediante los dos métodos detallados anteriormente. Una vez elegido el mejor valor de K, se pueden descargar los archivos de dicho valor, tanto de los individuos como de las poblaciones, y que son necesarios para su posterior análisis en el software CLUMPP. Este programa agrupa los datos de las carreras (*runs*) analizados con el valor de K elegido, tanto para el dato absoluto en cada individuo como para el valor promedio de la población. Posteriormente, se utiliza el software DISTRUCT para representar la distribución de las diferentes componentes ancestrales en los individuos y poblaciones de estudio.

¹ “*Burn-in*” hace referencia a un método para encontrar un punto de partida. Es un término coloquial que describe cómo se realizan algunas iteraciones al comienzo de una simulación Montecarlo basada en cadenas de Markov (MCMC). Según el *burn-in* se puede empezar por cualquier parte, por ejemplo en x, entonces se ejecuta la cadena de Markov para n pasos, corriendo todos los datos hasta alcanzar una estabilidad estocástica. Este es el período de *burn-in*. En la ejecución del *burn-in* cada iteración se usa en los cálculos MCMC. (<http://users.stat.umn.edu/~geyer/mcmc/burn.html>)

V RESULTADOS

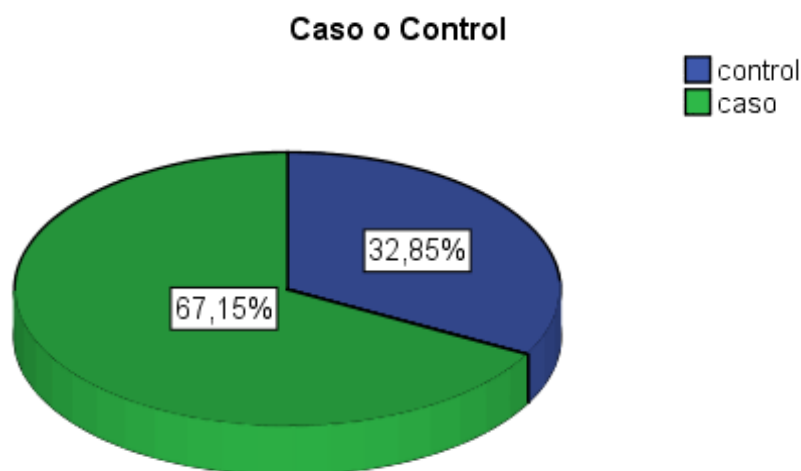
V.A Análisis descriptivo de la población de estudio

V.A.1 Sujetos de estudio

En este estudio han participado un total de 277 individuos que residen en la provincia de Almería, principalmente en el Poniente almeriense, Vícar y Almería capital. Se pueden agrupar de diferentes formas según los siguientes criterios

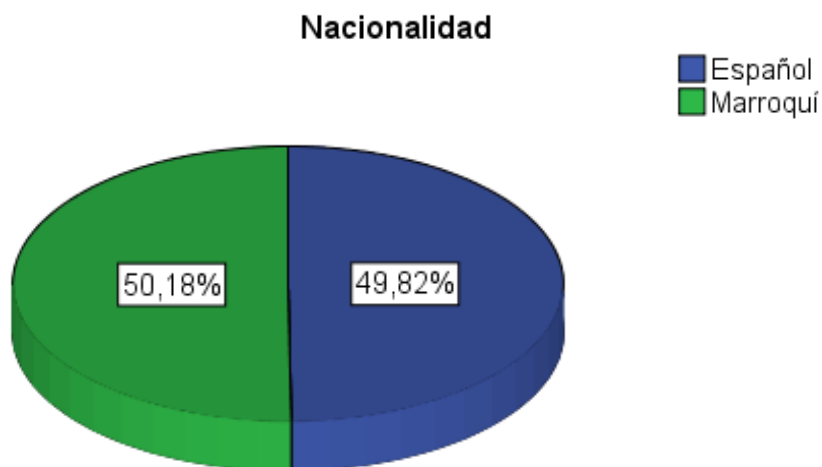
- Según **exposición** a plaguicidas (Figura V-1) 186 son agricultores de invernadero que presentaban exposición ocupacional a plaguicidas (67,1% del total) y que se han denominado también casos, término que, aunque no es del todo exacto, sí resulta intuitivo. Por el contrario, 91 individuos (32,9% del total) eran trabajadores que se realizaron revisiones de salud en el Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Almería y que no presentaban exposición ocupacional a plaguicidas y, a efectos de este trabajo, se denominan no expuestos o controles. En la siguientes tabla y diagrama de sectores se puede apreciar la distribución de la muestra.

Figura V-1. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según exposición a plaguicidas.



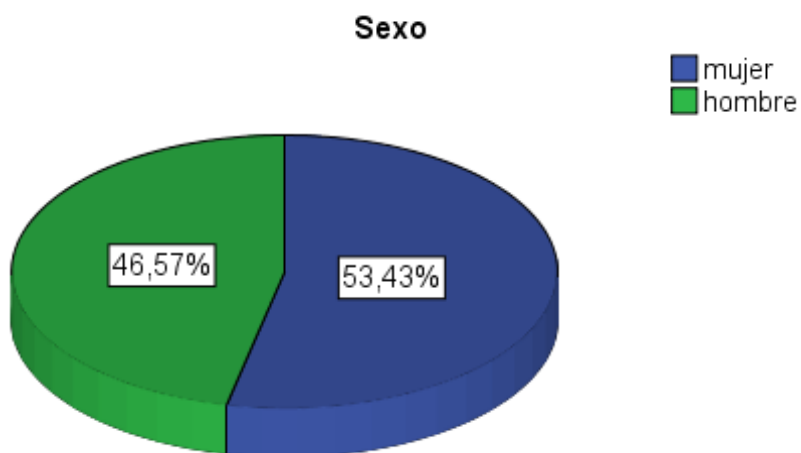
- Según **origen poblacional** (Figura V-2) 138 individuos (49,8% del total de la muestra) son españoles y 139 (50,2%) marroquíes. En el siguiente diagrama de sectores se representa la distribución de la muestra

Figura V-2. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según el origen poblacional.



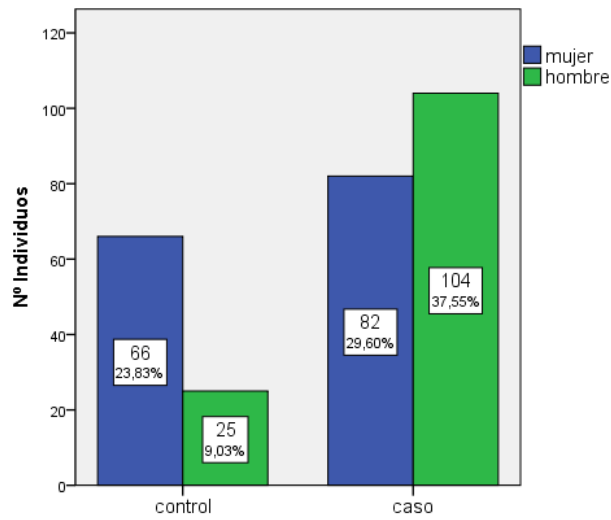
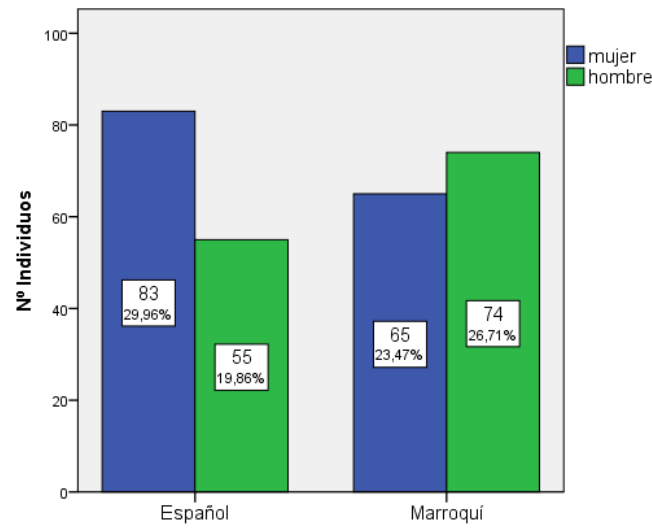
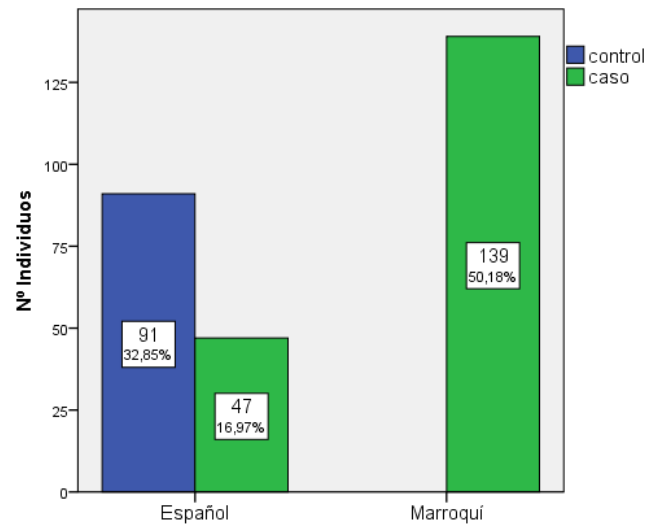
- Según el **género** al que pertenecen (Figura V-3) hay datos de los 277 individuos, 148 (53,6%) son mujeres, y 128 (46,4%) hombres. En el siguiente diagrama de sectores se puede apreciar la distribución de la muestra

Figura V-3. Diagrama de sectores de la distribución de la muestra según sexo.



En la Figura V-4 se representa la población de estudio clasificada según las variables “Exposición”, “Origen Poblacional” y “Sexo”, De las 149 mujeres, 84 (56,4%) son españolas y 65 (43,6%) marroquíes; de todas ellas 66 (44,3%) corresponden al grupo de no expuestos o control y 83 (55,7%) al de expuestos o casos. Por otro lado, de los 131 hombres, 55 (20,99%) son españoles y 70 (26,72%) marroquíes; de ellos 25 (19,1%) son controles y 106 (80,9%) casos. Mientras que en los controles el 100% son de origen español, en los casos hay 49 españoles, de los que 18 (36,7%) son mujeres y 31 (63,3%) hombres. Los 140 casos restantes son marroquíes, de los cuales 65 (46,4%) son mujeres y 75 (53,6%) hombres.

Figura V-4. Gráfico de barras agrupadas según el sexo, origen poblacional y exposición a plaguicidas.



V.A.2 Variables sociodemográficas y antropométricas

Estos datos se han obtenido a partir de los cuestionarios aplicados a los trabajadores y que incluyen edad, peso y altura. Mediante el índice de Quetelet se calculó el IMC (kg/m^2). En la Tabla V-1 se muestran las características demográficas y estilo de vida de los controles y trabajadores que participan en el estudio. En la Tabla V-2 se muestran la media y su error típico, mediana, desviación típica, mínimo y máximo de estas variables.

Tabla V-1. Características demográficas y estilo de vida de los trabajadores y trabajadoras que participan en el estudio.

		Controles	Trabajadores	<i>p</i>
Edad		48,1 ± 9.1	37.8 ± 8.1	0,001
Sexo	Hombres	25 (19,4%)	104 (80,6%)	0,001
	Mujeres	66 (44,6%)	82 (55,4%)	
Hábito de fumar	Sí	28 (62,2)%	17 (37,8 %)	0,001
	No	2 (5,3%)	18 (94,7%)	
Consumo alcohol	Sí	45 (78,9%)	12 (21,1%)	0,001
	No	39(30,2%)	90 (69,8%)	
Nivel estudios	Sin estudios o Primarios	16(5,4%)	105 (94,6%)	0,001
	Secundarios o Bachillerato	17(62,1%)	11 (37,9%)	

Tabla V-2. Valores estadísticos de la edad, peso, altura e IMC.

	Edad	kg	cm	IMC (kg/m²)
N	221	247	242	240
Media	41,95	72,10	166,73	25,91
Error típ. de la media	0,71	0,93	0,64	0,30
Mediana	41,00	70,00	165,00	24,98
Desv. típ.	10,48	14,65	10,025	4,66
Mínimo	18	43	144	16,38
Máximo	66	133	198	42,78

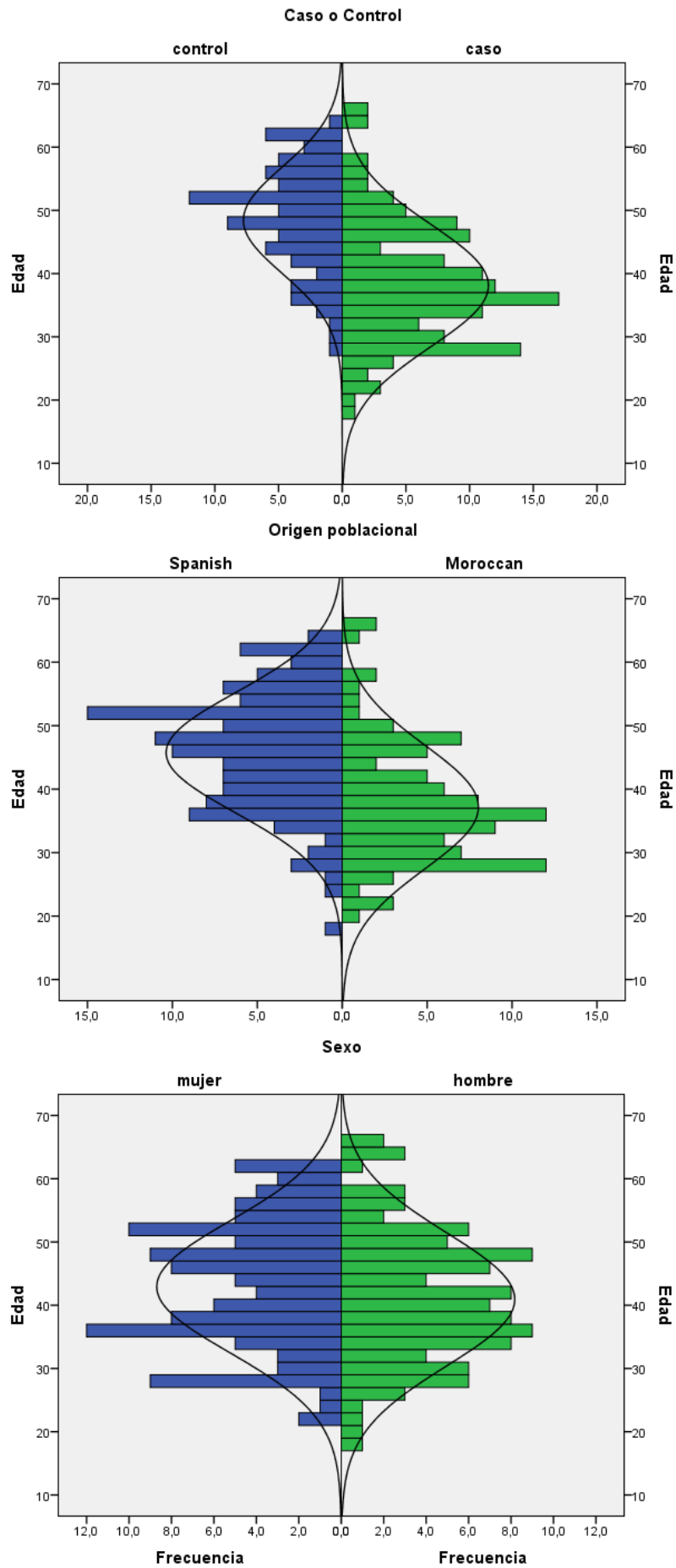
- **Edad**

La edad media de la población de estudio es de $41,95 \pm 10,48$ años (rango 18-66; n= 221). En la Tabla V-2 se indica la edad media de cada uno de los subgrupos en que se ha dividido la población de estudio, observando diferencias estadísticamente significativas al comparar por exposición y nacionalidad. Los controles y españoles tienen una edad significativamente mayor que la de los expuestos y marroquíes.

La Figura V-5 muestra el histograma de frecuencias de la edad, clasificado según las variables “exposición”, “origen poblacional” y “sexo”.

La distribución de frecuencias por sexo se distribuye de forma muy parecida (42,82 años en mujeres y 41,01 años en hombres). Por el contrario, la distribución varía según exposición y origen poblacional.

Figura V-5. Histograma de frecuencias de la edad con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo.



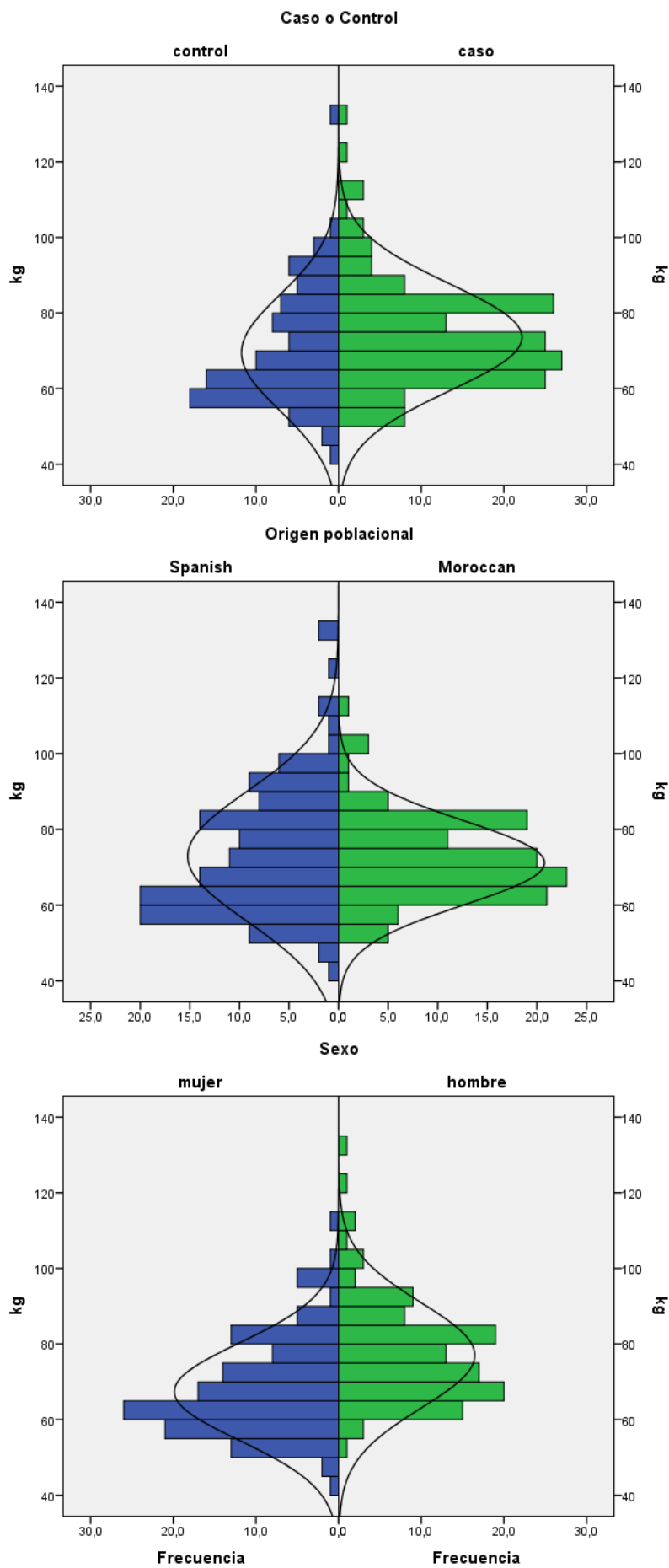
- **Peso**

El peso medio de todos los individuos estudiados es de $72,10 \pm 14,65$ kg (rango 43-133; n= 242). En la Tabla V-2 se muestra el peso medio de cada uno de los subgrupos de la población de estudio, observando diferencias estadísticamente significativas al comparar por exposición y sexo. Los expuestos y hombres tienen un peso significativamente mayor que los controles y mujeres.

En la Figura V-6 se representa el correspondiente histograma de frecuencias, donde el peso se estratifica según “exposición”, “origen poblacional” y “sexo”.

Se puede observar que la distribución de frecuencias por nivel de exposición y origen poblacional se distribuye de forma muy parecida. Por el contrario, la distribución según sexo es diferente.

Figura V-6. Histograma de frecuencias del peso con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo.

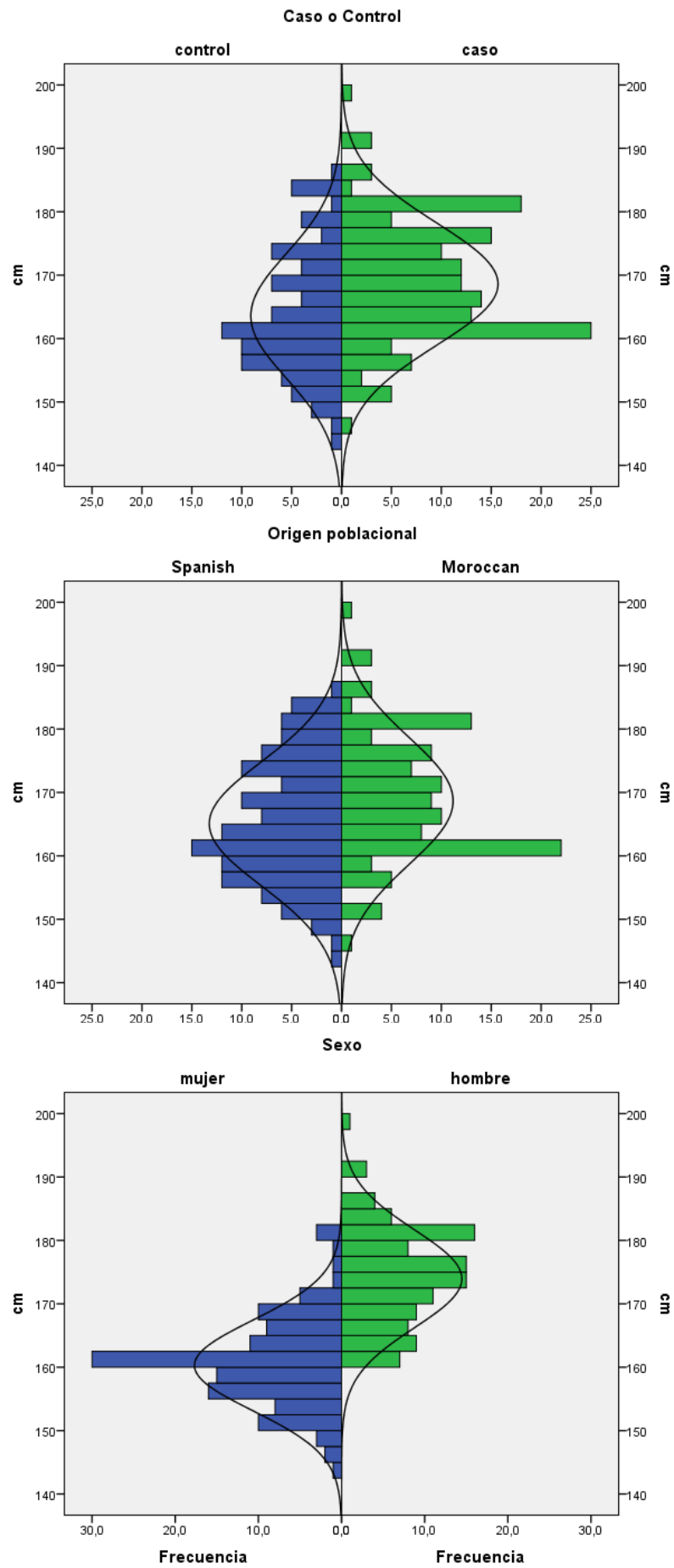


- **Altura**

La altura media de todos los individuos estudiados es de $166,73 \pm 10,03$ cm (rango 144-198; n= 247). En la Tabla V-2 se muestra la altura media de cada uno de los subgrupos de la población de estudio, observando diferencias estadísticamente significativas al comparar por exposición, nacionalidad y sexo. Los expuestos, marroquíes y hombres son significativamente más altos que los controles, españoles y mujeres.

En la Figura V-7 se representa el correspondiente histograma de frecuencias, donde la altura se estratifica según “exposición”, “origen poblacional” y “sexo”. Se puede observar que la distribución de frecuencias según sexo es diferente.

Figura V-7. Histograma de frecuencias de la altura con respecto a la exposición, origen poblacional y sexo.



V.B Genotipado de las muestras de estudio

V.B.1 Frecuencias Alélicas

En los siguientes gráficos y tablas (Figura V-8 y Tabla V-3) se presentan los resultados de las frecuencias alélicas de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados en la población española y marroquí.

Figura V-8. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas de diez loci para las dos poblaciones de estudio.

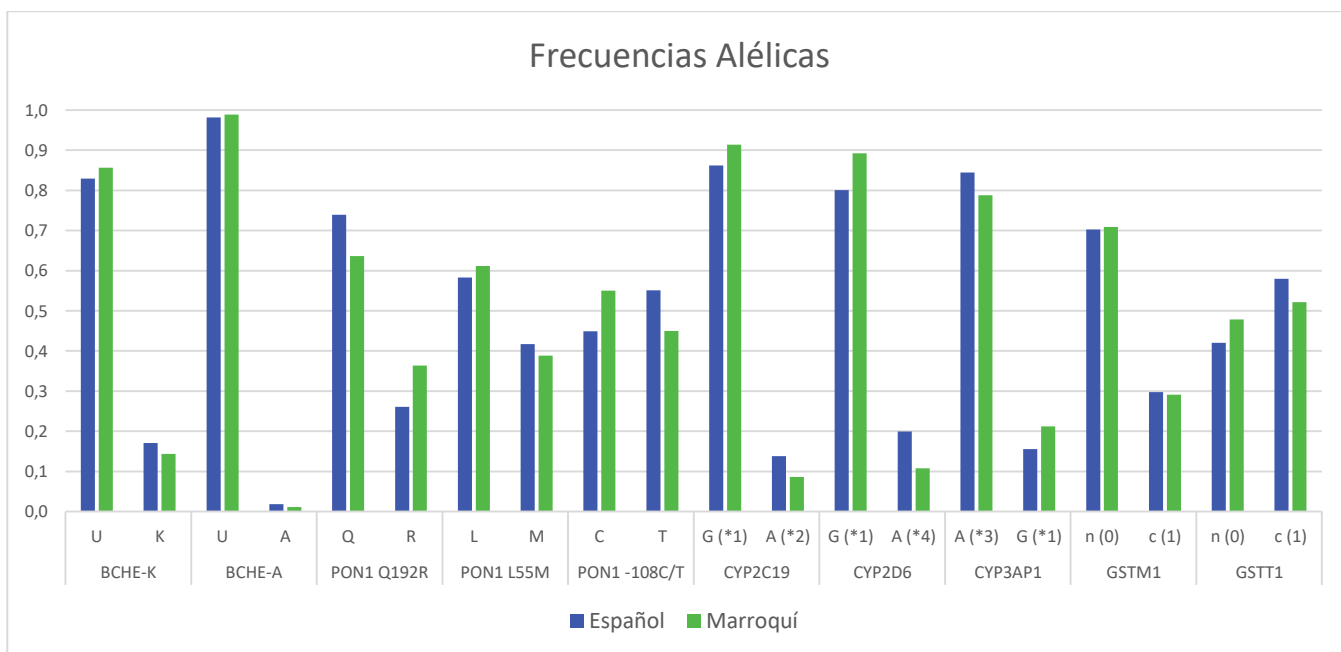


Tabla V-3. Frecuencias alélicas de diez loci para población total y estratificado por origen ancestral.

Locus	Alelo	Todos	Español	Marroquí	p^1
<i>BCHE-K</i>	U	0,843	0,830	0,856	0,226
	K	0,157	0,170	0,144	
<i>BCHE-A</i>	U	0,986	0,982	0,989	0,470
	A	0,014	0,018	0,011	
<i>PON1 Q192R</i>	Q	0,688	0,739	0,637	0,012
	R	0,312	0,261	0,363	
<i>PON1 L55M</i>	L	0,597	0,583	0,612	0,146
	M	0,403	0,417	0,388	
<i>PON1 -108C/T</i>	C	0,500	0,449	0,550	0,002
	T	0,500	0,551	0,450	
<i>CYP2C19</i>	G (*1)	0,888	0,862	0,914	0,133
	A (*2)	0,112	0,138	0,086	
<i>CYP2D6</i>	G (*1)	0,847	0,801	0,892	0,023
	A (*4)	0,153	0,199	0,108	
<i>CYP3A4</i>	A (*3)	0,816	0,844	0,788	<0,001
	G (*1)	0,184	0,156	0,212	
<i>GSTM1</i>	n ² (*0)	0,706	0,703	0,709	0,771
	c ³ (*1)	0,294	0,297	0,291	
<i>GSTT1</i>	n (*0)	0,449	0,420	0,478	0,008
	c (*1)	0,551	0,580	0,522	

¹p-valor de Chi-cuadrado; ²null alelo nulo, delección del gen; ³carrier alelo funcional, presencia del gen. Se resalta en negrita los valores con una significancia \leq a 0,05.

Se observan diferencias significativas en la distribución de frecuencias alélicas *PON1 Q192R*, *PON1-108C/T*, *CYP3A1*, *CYP2D6* y *GSTT1* entre las poblaciones española y marroquí.

- **PON1 Q192R** la población española presenta una mayor frecuencia de alelo Q que la marroquí.
- **PON1 -108C/T** la población española presenta una menor frecuencia de alelo C que la marroquí.
- **CYP3A1** la población española muestra una mayor frecuencia de alelo A que la marroquí.
- **CYP2D6** la población española presenta una menor frecuencia de alelo G que la marroquí.
- **GSTT1** la población española presenta una menor frecuencia de alelo funcional (*1) que la marroquí.

V.B.2 Frecuencias Genotípicas

En los siguientes gráficos y tablas (Figura V-9 y Tabla V-4) se presentan los resultados de las frecuencias genotípicas de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados en la población española y marroquí.

Figura V-9. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de diez loci para las dos poblaciones de estudio.

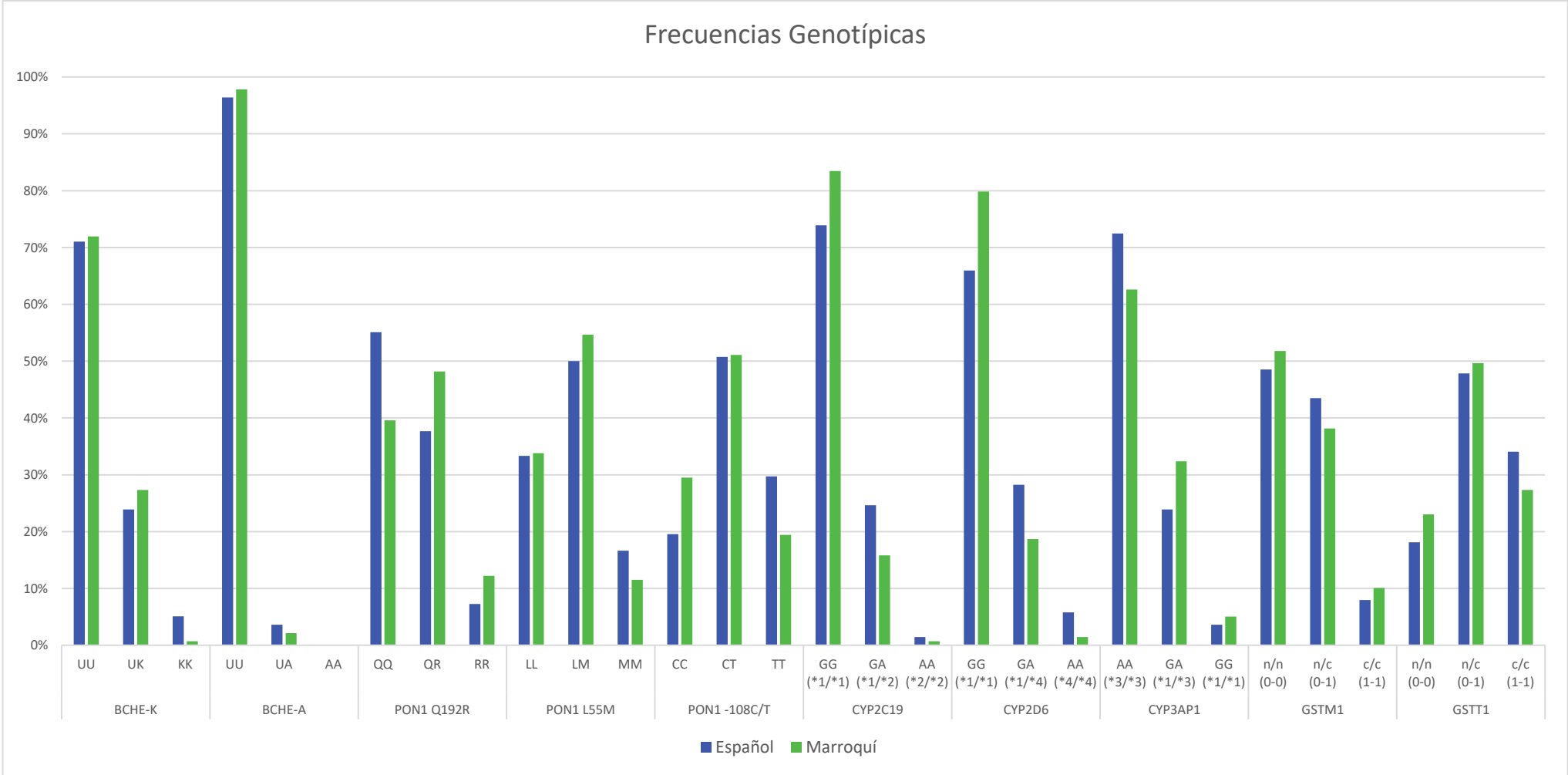


Tabla V-4. Frecuencias genotípicas de diez loci para población total y estratificado por origen ancestral. (n, %).

Locus	Genotipo	Todos	Español	Marroquí	p^1
<i>BCHE-K</i>	UU	198 (71,5)	98 (71,0)	100 (71,9)	0,096
	UK	71 (25,6)	33 (23,9)	38 (27,4)	
	KK	8 (2,9)	7 (5,1)	1 (0,7)	
<i>BCHE-A</i>	UU	269 (97,1)	133 (96,4)	136 (97,9)	0,501
	UA	8 (2,9)	5 (3,6)	3 (2,1)	
	AA	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>PON1 Q192R</i>	QQ	131 (47,3)	76 (55,1)	55 (39,6)	0,021
	QR	119 (42,9)	52 (37,7)	67 (48,2)	
	RR	27 (9,8)	10 (7,2)	17 (12,2)	
<i>PON1 L55M</i>	LL	93 (33,6)	46 (33,3)	47 (33,8)	0,075
	LM	145 (52,3)	69 (50,0)	76 (54,7)	
	MM	39 (14,1)	23 (16,7)	16 (11,5)	
<i>PON1 -108C/T</i>	CC	68 (24,5)	27 (19,6)	41 (29,5)	0,004
	CT	141 (50,9)	70 (50,7)	71 (51,1)	
	TT	68 (24,6)	41 (29,7)	27 (19,4)	
<i>CYP2C19</i>	GG (*1/*1)	218 (78,7)	102 (73,9)	116 (83,5)	0,315
	GA (*1/*2)	56 (20,2)	34 (24,6)	22 (15,8)	
	AA (*2/*2)	3 (1,1)	2 (1,5)	1 (0,7)	
<i>CYP2D6</i>	GG (*1/*1)	202 (72,9)	91 (65,9)	111 (79,9)	0,094
	GA (*1/*4)	65 (23,5)	39 (28,3)	26 (18,7)	
	AA (*4/*4)	10 (3,6)	8 (5,8)	2 (1,4)	
<i>CYP3A1</i>	AA (*3/*3)	187 (67,5)	100 (72,5)	87 (62,6)	<0,001
	GA (*1/*3)	78 (28,2)	33 (23,9)	45 (32,4)	
	GG (*1/*1)	12 (4,3)	5 (3,6)	7 (5,0)	
<i>GSTM1</i>	n ² /n (*0/*0)	139 (50,2)	67 (48,5)	72 (51,8)	0,659
	n/c ³ (*0/*1)	113 (40,8)	60 (43,5)	53 (38,1)	
	c/c (*1/*1)	25 (9,0)	11 (8,0)	14 (10,1)	
<i>GSTT1</i>	n/n (*0/*0)	57 (20,6)	25 (18,1)	32 (23,0)	0,030
	n/c (*0/*1)	135 (48,8)	66 (47,8)	69 (49,6)	
	c/c (*1/*1)	85 (30,7)	47 (34,1)	38 (27,4)	

¹ p-valor de Chi-cuadrado; ² null alelo nulo, delección del gen; ³ carrier alelo funcional, presencia del gen. Se resalta en negrita los valores con una significaciacia $\leq 0,05$.

Tabla V-5. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia (“Funcional”) de los genes GSTs estudiados para población total y estratificado por origen ancestral. (n, %).

Locus	Genotipo	Todos	Español	Marroquí	<i>p</i> ¹
<i>GSTM1</i>	Nulo (*0/*0)	139 (50,2)	67 (48,6)	72 (51,8)	0,367
	Funcional (*0/*1 + *1/*1)	138 (49,8)	71 (51,4)	67 (48,2)	
<i>GSTT1</i>	Nulo (*0/*0)	57 (20,6)	25 (18,1)	32 (23,0)	0,039
	Funcional (*0/*1 + *1/*1)	220 (79,4)	113 (81,9)	107 (77,0)	

¹p-valor de Chi-cuadrado. Se resalta en negrita los valores con una significancia \leq a 0,05.

Se observan diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas *PON1 Q192R*, *PON1-108C/T*, *CYP3A1* y *GSTT1* entre las poblaciones española y marroquí.

- **PON1 Q192R** la población española presenta una mayor frecuencia de genotipos QQ que la marroquí.
- **PON1 -108C/T** la población española presenta una menor frecuencia de genotipo CC que la marroquí.
- **CYP3A1** la población española muestra una mayor frecuencia de genotipo *3/*3 que la marroquí.
- **GSTT1** la población española presenta una menor frecuencia de genotipo nulo (*0/*0) que la marroquí (Tabla V-5).

Asimismo, se observan diferencias cercanas a la significancia para los polimorfismos *BCHE-K*, *PON1 L55M* y *CYP2D6*4*.

Por otro lado en los siguientes gráficos y tablas (Figura V-10, Tabla V-6 y Tabla V-7) se presentan los resultados de las frecuencias genotípicas de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados en la población del presente estudio **clasificados en controles y trabajadores**.

Figura V-10. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de diez loci para los grupos Controles y Trabajadores.

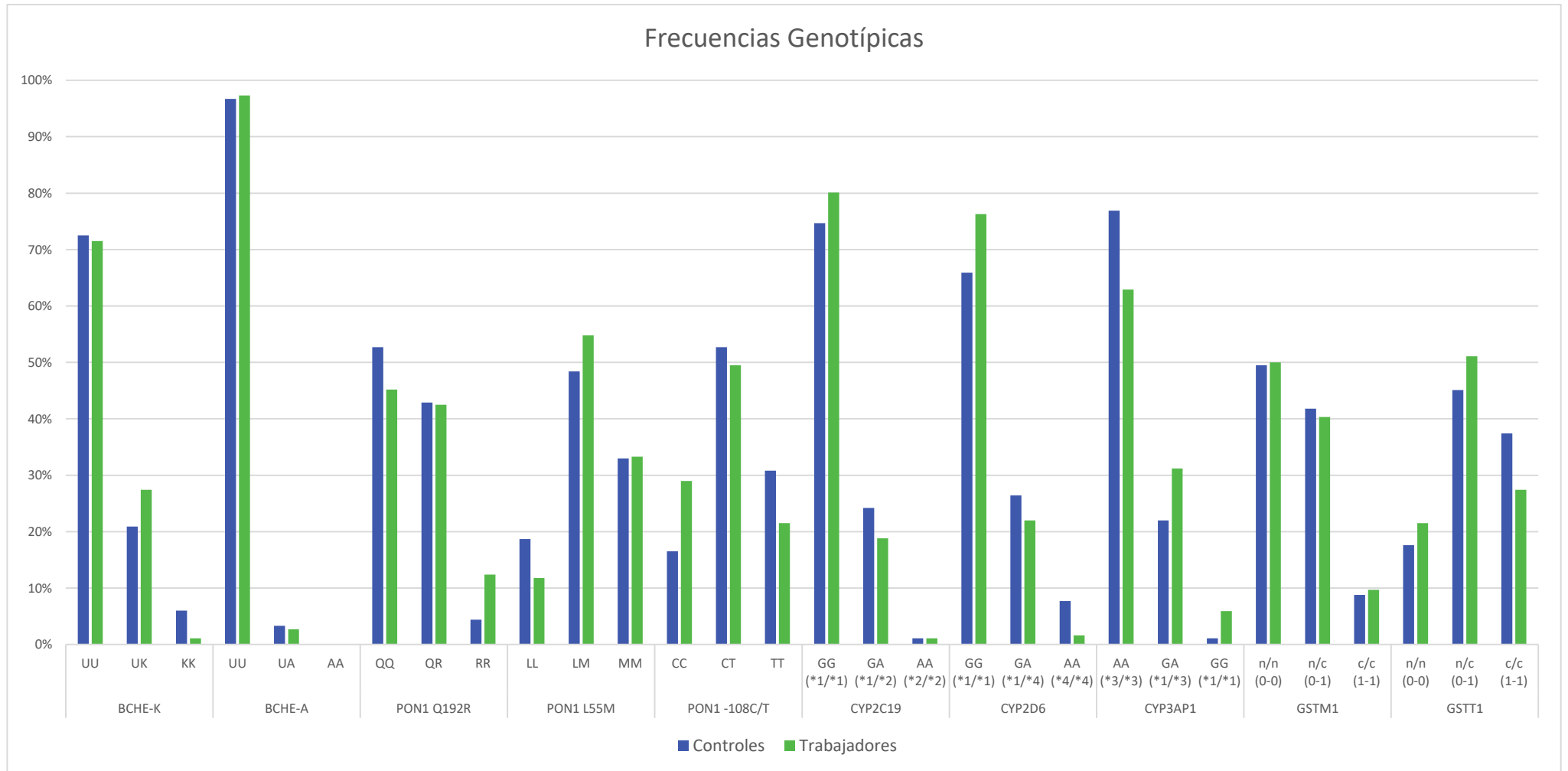


Tabla V-6. Frecuencias genotípicas para los grupos Controles y Trabajadores (n, %).

Locus	Genotipo	Controles	Trabajadores	<i>p</i> ¹
BCHE-K	UU	66 (72,5)	133 (71,5)	0,024
	UK	19 (20,9)	51 (27,4)	
	KK	6 (6,6)	2 (1,1)	
BCHE-A	UU	88 (96,7)	181 (97,3)	0,776
	UA	3 (3,3)	5 (2,7)	
	AA	0 (0,0)	0 (0,0)	
PON1 Q192R	QQ	48 (52,7)	84 (45,2)	0,094
	QR	39 (42,9)	79 (42,5)	
	RR	4 (4,4)	23 (12,4)	
PON1 L55M	LL	17 (18,7)	22 (11,8)	0,282
	LM	44 (48,4)	102 (54,8)	
	MM	30 (33,0)	62 (33,3)	
PON1 -108C/T	CC	15 (16,5)	54 (29,0)	0,047
	CT	48 (52,7)	92 (49,5)	
	TT	28 (30,8)	40 (21,5)	
CYP2C19	GG (*1/*1)	68 (74,7)	149 (80,1)	0,583
	GA (*1/*2)	22 (24,2)	35 (18,8)	
	AA (*2/*2)	1 (1,1)	2 (1,1)	
CYP2D6	GG (*1/*1)	60 (65,9)	142 (76,3)	0,022
	GA (*1/*4)	24 (26,4)	41 (22,0)	
	AA (*4/*4)	7 (7,7)	3 (1,6)	
CYP3A4	AA (*3/*3)	70 (76,9)	117 (62,9)	0,032
	GA (*1/*3)	20 (22,0)	58 (31,2)	
	GG (*1/*1)	1 (1,1)	11 (5,9)	
GSTM1	n²/n (*0/*0)	45 (49,5)	93 (50,0)	0,958
	n/c³ (*0/*1)	38 (41,8)	75 (40,3)	
	c/c (*1/*1)	8 (8,8)	18 (9,7)	
GSTT1	n/n (*0/*0)	16 (17,6)	40 (21,5)	0,236
	n/c (*0/*1)	41 (45,1)	95 (51,1)	
	c/c (*1/*1)	34 (37,4)	51 (27,4)	

¹ p-valor de Chi-cuadrado; ² null alelo nulo, delección del gen; ³ carrier alelo funcional, presencia del gen. Se resalta en negrita los valores con una significancia $\leq 0,05$

Tabla V-7. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia ("Funcional") de los genes GSTs estudiados para controles y trabajadores (n, %).

Locus	Genotipo	Controles	Trabajadores	<i>p</i> ¹
GSTM1	Nulo (*0/*0)	45 (49,5)	93 (50,0)	
	Funcional (*0/*1 + *1/*1)	46 (50,5)	93 (50,0)	
GSTT1	Nulo (*0/*0)	16 (17,6)	40 (21,5)	
	Funcional (*0/*1 + *1/*1)	75 (82,4)	107 (78,5)	

¹p-valor de Chi-cuadrado. Se resalta en negrita los valores con una significancia $\leq 0,05$.

Se observan diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas *BCHE-K*, *PON1-108C/T*, *CYP2D6* y *CYP3AP1* entre controles y trabajadores

- **BCHE-K** los controles presentan mayor frecuencia del genotipo KK que los trabajadores.
- **PON1 -108C/T** los controles presenta mayor frecuencia de genotipo TT que los trabajadores.
- **CYP2D6** los controles presenta mayor frecuencia del genotipo *4/*4 que los trabajadores.
- **CYP3AP1** los controles muestran una mayor frecuencia de genotipo *3/*3 que los trabajadores.

V.B.3 Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE)

Para evaluar si los loci estudiados se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) o, por el contrario, se desvían del mismo se ha efectuado la prueba χ^2 de Pearson, comparando las frecuencias genotípicas observadas en el estudio con las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante el principio del HWE. Para el análisis se han utilizado tres software diferentes, con el objetivo de comparar los datos GenAEx, Haploview y Arlequin. Se han obtenido valores de probabilidad superiores a 0,05 en todos los polimorfismos genéticos, lo que indica que se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sólo en el locus *PON1 L55M* de marroquíes se ha aplicado la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Tabla V-8. Cálculo del Equilibrio Hard-Weinberg en las dos poblaciones de estudio mediante tres software diferentes GenAEx, Haploview y Arlequin.

Locus	Español			Marroquí		
	GenAEx	Haploview	Arlequin	GenAEx	Haploview	Arlequin
<i>BCHE-K</i>	0,071	0,1986	0,13977	0,196	0,4724	0,46808
<i>BCHE-A</i>	0,828	1,0	1,0	0,898	1,0	1,0
<i>PON1 Q192R</i>	0,788	0,4306	0,38071	0,621	0,6386	0,58196
<i>PON1 L55M</i>	0,737	1,0	1,0	0,075	0,06	0,04550
<i>PON1 -108C/T</i>	0,769	1,0	1,0	0,706	0,5222	0,48763
<i>CYP2C19*2</i>	0,659	1,0	1,0	0,969	1,0	1,0
<i>CYP2D6*4</i>	0,179	0,2163	0,17036	0,737	1,0	0,67564
<i>CYP3A1*3</i>	0,285	0,9005	0,64402	0,708	0,982	0,82815
<i>GSTM1</i>	0,630	0,9262	0,84315	0,366	1,0	0,83507
<i>GSTT1</i>	0,828	1,0	1,0	0,950	1,0	1,0

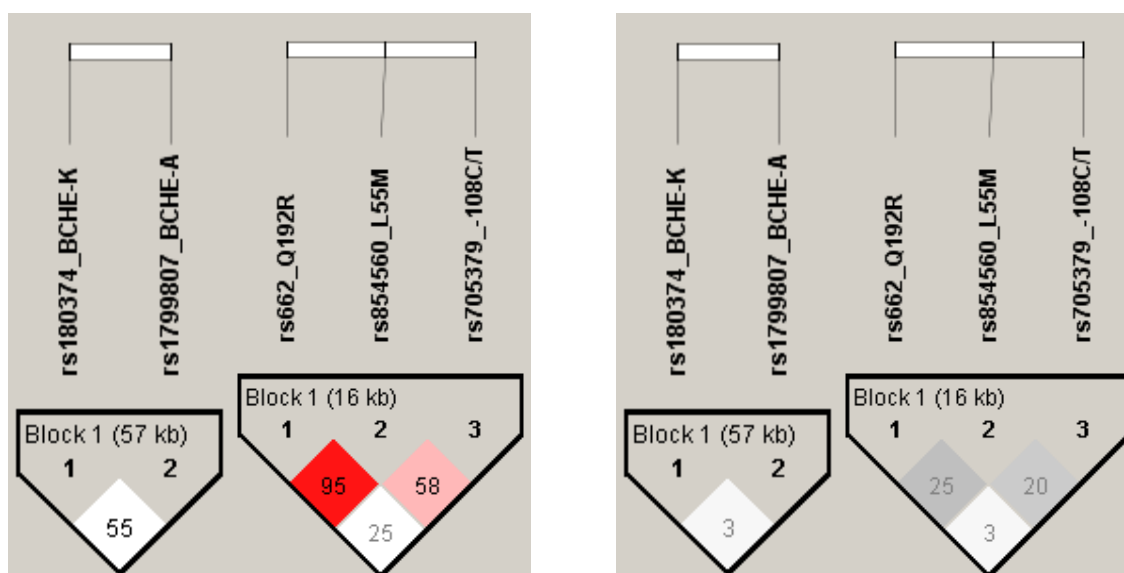
*Los valores de la tabla corresponde al p-valor de los estadísticos utilizados en cada software.

V.B.4 Desequilibrio de ligamiento (LD)

V.B.4.a Españoles

Los datos del análisis de LD para los SNPs estudiados en los genes *PON1* y *BCHE* para españoles se presentan en la Tabla V-3 y Figura V-11. En el caso del gen *PON1*, el polimorfismo *PON1* Q192R está en LD con *PON1* L55M (D' 0,953) y *PON1* -108C/T ($p < 0,001$ para cada par). El polimorfismo *PON1* L55M también está en LD con *PON1* -108C/T. Los valores más altos de D' estimados fueron 0,953 y 0,587, lo que indica dependencia de los polimorfismos genéticos que afectan a la *PON1*. A pesar de los valores relativamente altos de D' , que sugieren un fuerte LD, los valores de r^2 son bajos (0,250 y 0,201 respectivamente), lo que indica que ninguno puede ser remplazado por los otros, es decir, que no hay ningún polimorfismo T-A-G. En el caso del gen *BCHE*, los polimorfismos *BCHE*-A y *BCHE*-K están en LD, con un valor D' de 0,552 y r^2 de 0,031. Este último es mucho menor debido a que las frecuencias alélicas de los polimorfismos son muy diferentes, algunas de ellas muy bajas.

Figura V-11. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs estudiados rs1803274 (*BCHE*-K), rs1799807 (*BCHE*-A), rs662 (*PON1* Q192R), rs854560 (*PON1* L55M) y rs705379 (*PON1* -108C/T) en los individuos de origen español.



El número dentro de cada cuadrante indica el coeficiente de correlación de ligamiento (r^2) [Izq.] y el coeficiente de LD (D') [Dcha.] del ligamiento específico de dos SNPs, obtenido a partir del software Haploview. El color representa el valor de D'/LOD estándar (tonos de color rojo) [Izq.] y el valor de r^2 (tonos de color gris) [Dcha.] entre dos SNPs.

Tabla V-9. Valores de los parámetros del desequilibrio de ligamiento (LD) obtenidos al comparar pares de polimorfismos genéticos que se encuentran en un mismo cromosoma.

L1	L2	D'	LOD	r ²	CI _{low}	CI _{hi}	Dist
rs180374_BCHE-K	rs1799807_BCHE-A	0,552	1,05	0,031	0,14	0,84	57249
rs662_Q192R	rs854560_L55M	0,953	10,1	0,25	0,78	0,99	8638
rs662_Q192R	rs705379_-108C/T	0,257	0,94	0,031	0,06	0,45	16449
rs854560_L55M	rs705379_-108C/T	0,587	7,18	0,201	0,42	0,71	7811

D' parámetro LD normalizado (valores >0,8 indican fuerte LD).

Dist distancia en bases entre los loci.

CI_{low} - CI_{hi} límite inferior y superior del 95% de nivel de confianza en D'.

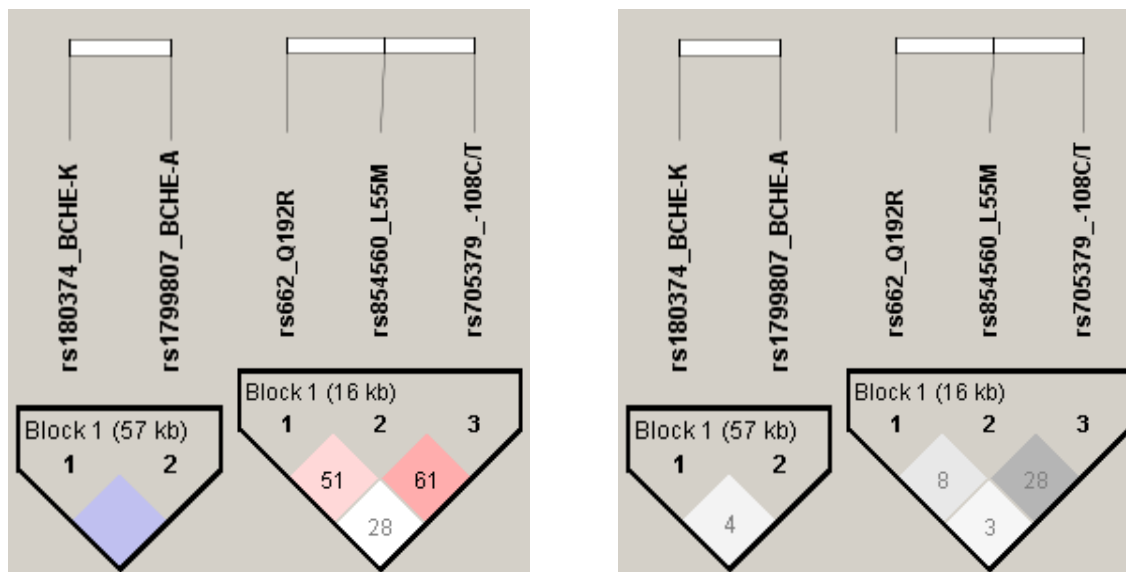
LOD logaritmo de las probabilidades de que exista LD entre dos loci (valores > 2 indica LD significativo).

r² coeficiente de correlación entre dos loci (valores > 0,8 indican fuerte LD).

V.B.4.b Marroquíes

Los datos del análisis de LD para los SNPs estudiados en los genes *PON1* y *BCHE* para marroquíes se presentan en la Tabla V-4 y Figura V-12. En el caso del gen *PON1*, el polimorfismo *PON1 Q192R* está en LD con *PON1 L55M* y *PON1 -108C/T* ($p < 0,001$ para cada par). El polimorfismo *PON1 L55M* también está en LD con *PON1 -108C/T*. Los valores más altos de D' estimados fueron 0,514 y 0,611, y sus valores de r² fueron 0,087 y 0,289 respectivamente, lo que indica que ninguno puede ser remplazado por los otros, es decir, que no hay ningún polimorfismo T-A-G. En el caso del gen *BCHE*, los polimorfismos *BCHE-A* y *BCHE-K* están en fuerte LD con un valor en D' de 1, sin embargo el valor en r² es bajo (0,046) debido a que las frecuencias alélicas de los polimorfismos son muy diferentes.

Figura V-12. Análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs estudiados rs1803274 (BCHE-K), rs1799807 (BCHE-A), rs662 (PON1 Q192R), rs854560 (PON1 L55M) y rs705379 (PON1 -108C/T) en los individuos de origen marroquí.



El número dentro de cada cuadrante indica el coeficiente de correlación de ligamiento (r^2) [Izq.] y el coeficiente de LD (D') [Dcha.] del ligamiento específico de dos SNPs, obtenido a partir del software Haploview. El color representa el valor de D'/LOD estándar (tonos de color rojo) [Izq.] y el valor de r^2 (tonos de color gris) [Dcha.] entre dos SNPs.

Tabla V-10. Valores de los parámetros del desequilibrio de ligamiento (LD) obtenidos al comparar pares de polimorfismos genéticos estudiados que se encuentran en un mismo cromosoma.

L1	L2	D'	LOD	r^2	CI_{low}	CI_{hi}	Dist
rs180374_BCHE-K	rs1799807_BCHE-A	1,0	1,15	0,046	0,18	0,99	57249
rs662_Q192R	rs854560_L55M	0,514	2,9	0,087	0,28	0,69	8638
rs662_Q192R	rs705379_-108C/T	0,284	1,17	0,034	0,08	0,47	16449
rs854560_L55M	rs705379_-108C/T	0,611	9,35	0,289	0,47	0,72	7811

D' parámetro LD normalizado (valores $>0,8$ indican fuerte LD).

Dist distancia en bases entre los loci.

CI_{low} - CI_{hi} límite inferior y superior del 95% de nivel de confianza en D' .

LOD logaritmo de las probabilidades de que exista LD entre dos loci (valores > 2 indica LD significativo).

r^2 coeficiente de correlación entre dos loci (valores $> 0,8$ indican fuerte LD).

V.B.5 Haplotipos

Los datos de frecuencias haplotípicas de los polimorfismos estudiados en los genes *BCHE* y *PON1* se muestran en la Tabla V-11 y Tabla V-12 respectivamente. En cuanto al gen *BCHE*, el haplotipo más frecuente es el G-A, tanto en españoles (81,4%) como en marroquíes (86,3%), que corresponde al alelo Usual o salvaje de los dos polimorfismos *BCHE* estudiados. No se ha obtenido ningún haplotipo A-G para marroquíes. En el caso del gen *PON1*, el haplotipo más frecuente fue A-T-T (Q-L-T) en españoles (36,2%) y el A-A-C (Q-M-C) en marroquíes (29,9%). No se ha obtenido ningún haplotipo G-T-C (R-L-C) para españoles.

Tabla V-11. Frecuencias haplotípicas de los dos polimorfismos del gen *BCHE* estudiados (rs1803274 y rs1799807) en población española y marroquí.

Variante K rs1803274	Variante Atípica rs1799807	Espanoles	Marroquíes
U (G)	U (A)	0,814	0,863
K (A)	U (A)	0,164	0,129
K (A)	A (G)	0,014	0

*Los valores corresponde al p-valor de Chi-cuadrado. Se resaltan en negrita los alelos que confieren menos riesgo de susceptibilidad a plaguicidas.

Tabla V-12. Frecuencias haplotípicas de los tres polimorfismos del gen *PON1* estudiados (rs662, rs854560 y rs705379) en población española y marroquí.

Q192R rs662	L55M rs854560	-108C/T rs705379	Espanoles	Marroquíes
Q (A)	L (T)	T	0,362	0,275
Q (A)	M (A)	C	0,213	0,299
R (G)	M (A)	C	0,138	0,190
R (G)	M (A)	T	0,115	0,113
Q (A)	M (A)	T	0,095	0,031
Q (A)	L (T)	C	0,069	0,031
R (G)	L (T)	C	0	0,052

*Los valores corresponde al p-valor de Chi-cuadrado. Se resaltan en negrita los alelos que confieren menos riesgo de susceptibilidad a plaguicidas.

V.C Estudio comparativo con otras poblaciones

En las Tabla V-13 a la Tabla V-16 se comparan las frecuencias alélicas observadas en la población española del presente estudio para cada polimorfismo genético con las de otros estudios, incluida la población marroquí del presente estudio, correspondientes al resto de continentes (población europea, americana, asiática y africana). Para ello se han desagregado la población española y marroquí.

En cuanto a los dos polimorfismos de *BCHE* estudiados, la población española no muestra diferencias significativas con el resto de poblaciones europeas. Las frecuencias son también muy parecidas a las americanas, salvo en el caso de los amerindios brasileños ($p=0,001$) y los Huilliches chilenos ($p=0,032$), que muestran frecuencias de *BCHE-K* significativamente diferentes de las españolas. En cuanto a las frecuencias de *BCHE-A*, en las poblaciones asiáticas y africanas no se encuentra el alelo atípico.

En los tres polimorfismos de *PON1* estudiados, la población española no muestra diferencias significativas con el resto de poblaciones europeas, excepto en finlandeses en el caso de *PON1 L55M* y *-108C/T*. Sin embargo, con respecto al resto de poblaciones de otros continentes las diferencias son significativas en la mayoría de los casos.

Para los polimorfismos estudiados de tres genes que pertenecen al grupo de los citocromos P450, al igual que en los anteriores casos, la población española no muestra diferencias significativas frente al resto de poblaciones europeas. Las frecuencias son también muy parecidas en las americanas, excepto en población de americanos mestizos ($p=0,007$) y mejicanos de Los Ángeles ($p=0,004$), en el caso de *CYP3A11*. En general, para asiáticos y africanos, las diferencias son significativas en los tres polimorfismos. Solo para las poblaciones africanas, en el polimorfismo *CYP2C19*, las diferencias no son tan acusadas.

En el caso de los polimorfismos de CNVs en *GSTM1* y *GSTT1*, se obtienen resultados parecidos a los anteriores casos, en poblaciones europeas no hay diferencias significativas, y en americanos sólo en el caso de amerindios africanos. En asiáticos hay más diferencias en *GSTT1* que en *GSTM1*. En africanos, son las poblaciones de Sudáfrica ($p=0,001$) y Zimbabue ($p=0,001$) las que tiene frecuencias significativamente diferentes en *GSTM1*, mientras que en *GSTT1* sólo es la población de Zimbabue ($p=0,029$).

Tabla V-13. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos BCHE estudiados en diferentes poblaciones mundiales y su comparación con las obtenidas en el presente estudio.

Población	Referencia	<i>BCHE-K</i> (rs1803274, A539T) ^b			<i>BCHE-A</i> (rs1799807, D70G) ^c		
		(U) G	(K) A	<i>p</i> ^d	(U) A	(A) G	<i>p</i>
EUROPA							
Espanoles (n=138)	Presente estudio	0,830	0,170	-	0,982	0,018	-
Daneses (n=25)	Jensen et al., 1996	0,820	0,180	0,784	-	-	-
Escoceses (n=51)	Gaffney and Campbell, 1994	0,804	0,196	0,815	-	-	-
Estonios (n=976)	Nelis et al., 2009	0,846	0,154	0,406	-	-	-
Franceses (n=29)	Li et al., 2008	0,810	0,190	0,746	-	-	-
Rusos (n=25)	Li et al., 2008	0,860	0,140	0,799	-	-	-
Europeos (n=379)	Abecasis et al., 2012	0,813	0,187	0,873	0,985	0,015	0,706
Finlandeses (n=93)	Abecasis et al., 2012	0,855	0,145	0,405	0,989	0,011	0,650
Británicos de Inglaterra y Escocia (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,798	0,202	0,692	0,989	0,011	0,999
Toscanos de Italia (n=98)	Abecasis et al., 2012	0,770	0,230	0,314	0,964	0,036	0,695

^b Variante Kalow (K) (nt 1615, GCA to ACA); G = alelo usual (salvaje), A = variante alélica K (BCHE*539T).

^c La variante atípica (A) (nt 209, GAT to GGT); A = alelo usual (salvaje), G = alelo atípico (BCHE*70G).

^d *p* nivel de significación estadística al comparar cualquier población mundial con la española del presente estudio mediante el test de Mantel-Haenszel.

Población	Referencia	<i>BCHE-K</i> (rs1803274, A539T) ^b			<i>BCHE-A</i> (rs1799807, D70G) ^c		
		(U) G	(K) A	<i>p</i> ^d	(U) A	(A) G	<i>p</i>
AMÉRICA							
Brasileños (n= 1398)	Negrão et al., 2013	0,817	0,183	0,955	-	-	-
Amerindios de Brasil (n=244)	Furtado et al., 2006	0,963	0,037	0,001	-	-	-
Euro-Brasileños (n=95)	(R. L. Souza et al., 1998)	0,816	0,184	0,966	-	-	-
Afro-Brasileños (n=82)	(R. L. Souza et al., 1998)	0,829	0,171	0,845	-	-	-
Norteamericanos (n=47)	Bartels et al., 1992	0,872	0,128	0,396	-	-	-
Huilliches de Chile (n= 52)	Shibuta et al., 1994	0,942	0,058	0,032	-	-	-
Amerindios mestizos (n=181)	Abecasis et al., 2012	0,870	0,130	0,233	0,981	0,019	0,999
Colombianos de Medellín (n=60)	Abecasis et al., 2012	0,850	0,150	0,593	0,983	0,017	0,999
Mejicanos de Los Ángeles, EE.UU. (n=66)	Abecasis et al., 2012	0,871	0,129	0,422	0,992	0,008	0,999
Puertorriqueños (n=55)	Abecasis et al., 2012	0,891	0,109	0,218	0,964	0,036	0,624

Población	Referencia	<i>BCHE-K</i> (rs1803274, A539T) ^b			<i>BCHE-A</i> (rs1799807, D70G) ^c		
		(U) G	(K) A	<i>p</i> ^d	(U) A	(A) G	<i>p</i>
ASIA							
Japoneses (n= 116)	Shibuta et al., 1994	0,836	0,164	0,716	-	-	-
Trabajadores chinos expuestos a OPs (n=241)	Kuang et al., 2006	0,863	0,137	0,250	-	-	-
Palestinos (n=51)	Li et al., 2008	0,810	0,190	0,815	-	-	-
Coreanos (n=53)	Kenneth K. Kidd et al. ^e	0,806	0,194	0,904	-	-	-
Asiáticos del este (n=286)	Abecasis et al., 2012	0,837	0,163	0,666	1,000	0	0,034
Han de Pekín, China (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,840	0,160	0,747	1,000	0	0,270
Han del sureste de China (n=100)	Abecasis et al., 2012	0,875	0,125	0,288	1,000	0	0,266
Japoneses en Tokio (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,792	0,208	0,548	1,000	0	0,282
ÁFRICA							
Marroquíes (n=139)	Presente estudio	0,856	0,144	0,311	0,989	0,011	0,370
Biaka, tribu de la República Centroafricana (n=31)	Li et al., 2008	0,890	0,110	0,253	-	-	-
Mozambiqueños, Argelia (n=30)	Li et al., 2008	0,850	0,150	0,851	-	-	-
Africanos (n=246)	Abecasis et al., 2012	0,860	0,140	0,263	1,000	0	0,046
SE de EE.UU. ancestros de africanos (n=61)	Abecasis et al., 2012	0,811	0,189	0,795	1,000	0	0,554
Luhya, tribu de Webuye,, Kenia (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,887	0,113	0,156	1,000	0	0,270
Yoruba, tribu de Ibadan, Nigeria (n=88)	Abecasis et al., 2012	0,864	0,136	0,375	1,000	0	0,284

^c Datos no publicados.

Los espacios en blanco indican que no hay información disponible sobre la frecuencia alélica.

Tabla V-14. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos PON1 estudiados en diferentes poblaciones mundiales y su comparación con las obtenidas en el presente estudio.

Población	referencia	PON1 (rs662, Q192R)			PON1 (rs854560, L55M)			PON1 (rs705379, -108C/T)		
		Q	R	<i>p</i> ^a	L	M	<i>p</i>	C	T	<i>p</i>
EUROPA										
Espanoles (n=138)	Presente estudio	0,739	0,261	-	0,583	0,417	-	0,449	0,551	-
Espanoles (n=141)	Hernández et al., 2003	0,700	0,300	0,491	0,597	0,403	0,605	0,380	0,620	0,448
Espanoles (n=395)	Ng et al., 2004	0,716	0,284	0,609	0,618	0,382	0,278	-	-	-
Estonios (n=976)	Nelis et al., 2009	0,754	0,246	0,703	-	-	-	-	-	-
Franceses (n=858)	Ng et al., 2004	0,760	0,240	0,597	0,621	0,379	0,210	-	-	-
Finlandeses (n=169)	Antikainen et al., 1996	0,737	0,263	0,992	-	-	-	-	-	-
Europeos (n=379)	Abecasis et al., 2012	0,710	0,290	0,512	0,649	0,351	0,081	0,513	0,487	0,090
Finlandeses de Finlandia (n=93)	Abecasis et al., 2012	0,747	0,253	0,962	0,694	0,306	0,040	0,613	0,387	0,006
Británicos de Inglaterra y Escocia (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,657	0,343	0,158	0,680	0,320	0,070	0,483	0,517	0,411
Toscanos de Italia (n=98)	Abecasis et al., 2012	0,740	0,260	0,921	0,633	0,367	0,299	0,490	0,510	0,344

^a *p* nivel de significación estadística al comparar cualquier población mundial con la española del presente estudio mediante el test de Mantel-Haenszel. Los espacios en blanco indican que no hay información disponible sobre la frecuencia alélica.

Población	referencia	<i>PON1</i> (rs662, Q192R)			<i>PON1</i> (rs854560, L55M)			<i>PON1</i> (rs705379, -108C/T)		
		Q	R	<i>p</i> ^a	L	M	<i>p</i>	C	T	<i>p</i>
AMÉRICA										
Peruanos (n=89)	Cataño et al., 2006	0,539	0,461	0,002	-	-	-	0,613	0,388	0,007
Costarricenses (n=518)	Sen-Banerjee et al., 2000	0,760	0,240	0,601	0,260	0,740	0,001	-	-	-
Mejicanos (n=214)	Rojas-García et al., 2005	0,510	0,490	0,001	0,840	0,160	0,001	0,450	0,550	0,698
Americanos mestizos (n=181)	Abecasis et al., 2012	0,525	0,475	0,001	0,757	0,243	0,001	0,522	0,478	0,104
Colombianos de Medellín (n=60)	Abecasis et al., 2012	0,558	0,442	0,009	0,733	0,267	0,025	0,517	0,483	0,247
Mejicanos de Los Ángeles, EE.UU. (n=66)	Abecasis et al., 2012	0,500	0,500	0,001	0,826	0,174	0,001	0,530	0,470	0,168
Puertorriqueños (n=55)	Abecasis et al., 2012	0,518	0,482	0,002	0,700	0,300	0,065	0,555	0,445	0,087
ASIA										
Trabajadores chinos expuestos a OPs (n=241)	Kuang et al., 2006	0,378	0,622	0,001	0,981	0,019	0,001	-	-	-
Coreanos (n=988)	Shin, 2009	0,703	0,297	0,388	0,943	0,057	0,001	-	-	-
Han, China (n=475)	Wang et al., 2002	0,352	0,648	0,001	1,000	0	0,001	0,557	0,443	0,007
Tailandeses (n=202)	Phuntuwate et al., 2005	0,710	0,290	0,529	0,950	0,050	0,001	0,250	0,750	0,001
Asiáticos del este (n=286)	Abecasis et al., 2012	0,358	0,642	0,001	0,969	0,031	0,001	0,561	0,439	0,011
Han de Pekín, China (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,397	0,603	0,001	0,974	0,026	0,001	0,526	0,474	0,137
Han del sureste de China (n=100)	Abecasis et al., 2012	0,370	0,630	0,001	0,980	0,020	0,001	0,590	0,410	0,013
Japoneses en Tokio (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,303	0,697	0,001	0,949	0,051	0,001	0,567	0,433	0,048

Población	referencia	<i>PON1</i> (rs662, Q192R)			<i>PON1</i> (rs854560, L55M)			<i>PON1</i> (rs705379, -108C/T)		
		Q	R	<i>p</i> ^a	L	M	<i>p</i>	C	T	<i>p</i>
ÁFRICA										
Marroquíes (n=139)	Presente estudio	0,637	0,363	0,012	0,612	0,388	0,249	0,550	0,450	0,014
Ovambos, tribu de Namibia (n=123)	Fujihara et al., 2011	0,321	0,679	0,001	-	-	-	-	-	-
Ghaneses (n=118)	Fujihara et al., 2011	0,364	0,636	0,001	-	-	-	-	-	-
Africanos (n=246)	Abecasis et al., 2012	0,252	0,748	0,001	0,848	0,152	0,001	0,921	0,079	0,001
SE de EE.UU. ancestros de africanos (n=61)	Abecasis et al., 2012	0,402	0,598	0,001	0,820	0,180	0,001	0,861	0,139	0,001
Luhya, tribu de Webuye,, Kenia (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,211	0,789	0,001	0,856	0,144	0,001	0,943	0,057	0,001
Yoruba, tribu de Ibadan, Nigeria (n=88)	Abecasis et al., 2012	0,193	0,807	0,001	0,858	0,142	0,001	0,938	0,062	0,001

Tabla V-15. Frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos CYP450 estudiados en diferentes poblaciones mundiales y su comparación con las obtenidas en el presente estudio.

Población	Referencia	CYP2C19 (rs4244285)			CYP2D6 (rs3892097)			CYP3A1 (rs2177180)		
		G (*1)	A (*2)	<i>p</i> ^a	G (*1)	A (*4)	<i>p</i>	A (*3)	G (*1)	<i>p</i>
EUROPA										
Espanoles (n=138)	Presente estudio	0,862	0,138	-	0,801	0,199	-	0,844	0,156	-
Italianos varones de Bergamo (n=82)	Pimenoff et al., 2012	0,841	0,159	0,562	-	-	-	-	-	-
Italianos de Piamonte (n=54)	Pimenoff et al., 2012	0,805	0,195	0,202	-	-	-	-	-	-
Británicos (n=78)	Pimenoff et al., 2012	0,877	0,123	0,963	-	-	-	-	-	-
Franceses (n=28)	Sistonen et al., 2007	-	-	-	0,818	0,182	0,835	-	-	-
Europeos (n=379)	Abecasis et al., 2012	0,852	0,148	0,619	0,809	0,191	0,885	0,933	0,067	0,177
Finlandeses de Finlandia (n=93)	Abecasis et al., 2012	0,780	0,220	0,089	0,871	0,129	0,185	0,941	0,059	0,196
Británicos de Inglaterra y Escocia (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,843	0,157	0,570	0,758	0,242	0,357	0,927	0,073	0,377
Toscanos de Italia (n=98)	Abecasis et al., 2012	0,908	0,092	0,359	0,811	0,189	0,973	0,913	0,087	0,806

^a *p* nivel de significación estadística al comparar cualquier población mundial con la española del presente estudio mediante el test de Mantel-Haenszel.

Población	Referencia	<i>CYP2C19</i> (rs4244285)			<i>CYP2D6</i> (rs3892097)			<i>CYP3A4</i> (rs2177180)		
		G (*1)	A (*2)	<i>p</i> ^a	G (*1)	A (*4)	<i>p</i>	A (*3)	G (*1)	<i>p</i>
AMÉRICA										
Brasileños (n=615)	Santos et al., 2011	0,831	0,169	0,265	-	-	-	-	-	-
Amerindios (n=183)	Santos et al., 2011	0,896	0,104	0,460	-	-	-	-	-	-
Americanos mestizos (n=181)	Abecasis et al., 2012	0,867	0,133	0,955	0,848	0,152	0,337	0,785	0,215	0,007
Colombianos de Medellín (n=60)	Abecasis et al., 2012	0,875	0,125	0,989	0,842	0,158	0,444	0,825	0,175	0,122
Mejicanos de Los Ángeles, EE.UU. (n=66)	Abecasis et al., 2012	0,856	0,144	0,682	0,886	0,114	0,187	0,742	0,258	0,004
Puertorriqueños (n=55)	Abecasis et al., 2012	0,873	0,127	0,953	0,809	0,191	0,945	0,791	0,209	0,066
ASIA										
Han, China (n=200)	Shi et al., 2011	0,671	0,329	0,001	-	-	-	-	-	-
Palestinos (n=46)	Sistonen et al., 2007	-	-	-	0,922	0,078	0,088	-	-	-
Asiáticos de este (n=286)	Abecasis et al., 2012	0,666	0,334	0,001	0,998	0,002	0,001	0,715	0,285	0,001
Han de Pekín, China (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,680	0,320	0,001	0,995	0,005	0,001	0,680	0,320	0,001
Han del sureste de China (n=100)	Abecasis et al., 2012	0,640	0,360	0,001	1,000	0	0,001	0,725	0,275	0,001
Japoneses en Tokio (n=89)	Abecasis et al., 2012	0,680	0,320	0,001	1,000	0	0,001	0,742	0,258	0,002

Población	Referencia	<i>CYP2C19</i> (rs4244285)			<i>CYP2D6</i> (rs3892097)			<i>CYP3A4</i> (rs2232238)		
		G (*1)	A (*2)	<i>p</i> ^a	G (*1)	A (*4)	<i>p</i>	A (*3)	G (*1)	<i>p</i>
ÁFRICA										
Marroquíes (n=139)	Presente estudio	0,914	0,086	0,330	0,892	0,108	0,064	0,788	0,212	0,001
Mandenka, tribu de África occidental (n=56)	Pimenoff et al., 2012	0,786	0,214	0,143	-	-	-	-	-	-
Mozambiqueños, Argelia (n=29)	Sistonen et al., 2007	-	-	-	0,870	0,130	0,467	-	-	-
Africanos (n=246)	Abecasis et al., 2012	0,831	0,169	0,297	0,939	0,061	0,001	0,317	0,683	0,001
SE de EE.UU. ancestros de africanos (n=61)	Abecasis et al., 2012	0,885	0,115	0,758	0,885	0,115	0,162	0,434	0,566	0,001
Luhya, tribu de Webuye,, Kenia (n=97)	Abecasis et al., 2012	0,794	0,206	0,120	0,969	0,031	0,001	0,273	0,727	0,001
Yoruba, tribu de Ibadan, Nigeria (n=88)	Abecasis et al., 2012	0,835	0,165	0,406	0,943	0,057	0,004	0,284	0,716	0,001

Tabla V-16. Frecuencias de los genotipos homocigoto nulo e individuos con al menos una copia de los polimorfismos genéticos GSTs estudiados en diferentes poblaciones mundiales y su comparación con las obtenidas en el presente estudio.

Población	Referencia	CNV de <i>GSTM1</i>			CNV de <i>GSTT1</i>		
		Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	p^8	Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	p
EUROPA							
Español (n=138)	Presente estudio	0,486	0,514	-	0,181	0,819	-
Daneses (n=202)	Okkels et al., 1996	0,500	0,500	0,394	-	-	-
Finlandeses (n=142)	Hirvonen et al., 1993	0,437	0,563	0,484	-	-	-
Estonios (n=151)	Mikelsaar et al., 1994	0,503	0,497	0,670	-	-	-
Franceses (n=172)	Jourenkova et al., 1997	0,517	0,483	0,493	0,163	0,837	0,799
Alemanes (n=216)	Jahnke et al., 1996	0,518	0,482	0,460	0,130	0,870	0,549
Holandeses (n=207)	Oude Ophuis et al., 1998	0,522	0,478	0,429	0,198	0,792	0,259
Portugueses (n=84)	Moreira et al., 1996	0,524	0,476	0,510	-	-	-
Españoles (n=200)	González et al., 1998	0,520	0,480	0,451	-	-	-
España (n=60)	Esteller et al., 1997	0,467	0,533	0,881	0,120	0,880	0,510
Suecos (n=208)	Warholm et al., 1994	0,519	0,481	0,455	-	-	-
Suecos (n=270)	Warholm et al., 1995	-	-	-	0,100	0,900	0,122
Británicos (n=561 and 484)	Heagerty et al., 1996	0,551	0,449	0,126	0,190	0,810	0,294

⁸ p nivel de significación estadística al comparar cualquier población mundial con la española del presente estudio mediante el test de Mantel-Haenszel.

Los espacios en blanco indican que no hay información disponible sobre la frecuencia alélica.

Población	Referencia	CNV de <i>GSTM1</i>			CNV de <i>GSTT1</i>		
		Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	<i>p</i> ⁸	Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	<i>p</i>
ÁMERICA							
Americanos caucásicos (n=213)	Chen et al., 1996	0,535	0,465	0,297	0,150	0,850	0,960
Amerindios africanos (n=203)	Chen et al., 1996	0,276	0,724	0,001	0,241	0,759	0,045
Venezolanos no mestizos (n=120)	Chiurillo et al., 2013	0,510	0,490	0,630	0,110	0,890	0,299
Americanos mejicanos (n=146)	Kelsey et al., 1997	0,397	0,603	0,169	0,123	0,877	0,480
OCEANÍA							
Australianos (n=200)	Butler et al., 1997	0,540	0,460	0,264	0,190	0,810	0,368
ASIA							
Japoneses con cáncer (n=194)	Tatewaki et al., 2009	0,698	0,302	0,001	0,686	0,314	0,001
Japoneses (n=150)	Naoe et al., 2000	0,513	0,487	0,522	0,540	0,560	0,001
Coreanos varones (n= 1051)	Cho et al., 2005	0,539	0,461	0,182	0,543	0,457	0,001
Chinos de Shanghái (n= 219)	Shen et al., 1998	0,488	0,512	0,849	0,493	0,517	0,001
Chinos de Singapur (n=1194)	Seow et al., 2002	0,455	0,545	0,600	0,399	0,601	0,001
Indios del norte de India (n=130)	Agrawal et al., 2010	0,292	0,708	0,002	0,108	0,892	0,280

Población	Referencia	CNV de <i>GSTM1</i>			CNV de <i>GSTT1</i>		
		Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	p^8	Nulo (*0/*0)	Funcional (*0/*1+*1/*1)	p
ÁFRICA							
Marroquíes (n=139)	Presente estudio	0,518	0,482	0,435	0,230	0,770	0,028
Egipcios (n=34)	Abdel-Rahman et al., 1996	0,441	0,559	0,698	0,147	0,853	0,941
Ghaneses (n=49)	McGlynn et al., 1995	0,388	0,612	0,274	-	-	-
Surafricanos (n=96)	Masimirembwa et al., 1998	0,229	0,771	0,001	0,197	0,803	0,361
Zimbabuenses (n=148)	Masimirembwa et al., 1998	0,243	0,757	0,001	0,260	0,740	0,029

V.D Determinación de aductos N7-MedG en el ADN

Las características sociodemográficas de la población estudiada se muestran en la Tabla V-17. La edad media de los participantes fue de 38,9 años (rango 22-57) y la mayoría de ellos (74%) eran varones. No se encontraron diferencias sociodemográficas ni en los estilos de vida al comparar por género, con la única excepción del consumo de alcohol, ya que ninguna mujer informó del consumo de alcohol.

Tabla V-17. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio de aductos de N7-MedG.

	Todos los participantes (n=39)	Hombre (n= 28)	Mujer (n= 11)	p³
Edad	38,9 ± 8,3	38,6 ± 8,2	39,80 ± 9,11	0,71
IMC	25,47 ± 4,28	25,14 ± 4,65	26,94 ± 2,73	0,31
Tabaco¹	0,13 ± 0,34	0,18 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,14
Alcohol¹	0,23 ± 0,43	0,32 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,05
Café/té²	1,74 ± 0,97	1,79 ± 0,88	1,64 ± 1,21	0,68

¹Porcentaje de usuarios actuales (expresado en forma decimal); ²Número de tazas de café o té al día; ³ p-valor de Chi-cuadrado.

La comparación de los parámetros bioquímicos estudiados (N7-MedG, AChE y BChE) entre los dos periodos con diferente exposición a plaguicidas se muestra en la Tabla V-18. Los niveles de N7-MedG fueron significativamente mayores en el periodo de alta exposición que en el de baja exposición. Por el contrario, la AChE y BChE (utilizados como biomarcadores de exposición a plaguicidas) mostraron el comportamiento opuesto, ya que sus valores fueron significativamente más bajos en el período de alta exposición a plaguicidas. Los resultados del modelo mixto lineal univariante fueron comparables a los obtenidos tras ajustar el modelo por edad, sexo, IMC, consumo de tabaco, alcohol y café/té y polimorfismos genéticos PON1 192, GSTM1 y GSTT1, que se consideraron

como factores de confusión ya que pueden estar potencialmente asociados con el daño alquilante del ADN.

Tabla V-18. Modelo de análisis mixtos para evaluar la asociación entre niveles de N7-MedG y exposición a plaguicidas (evaluada mediante las actividades colinesterasas) en los dos periodos de estudio

	Alta vs. Baja exposición (95%CI)¹	<i>P</i>	Alta vs. Baja exposición (95%CI)²	<i>P</i>
Log N7-MedG	0,45 (0,07 0,82)	0,02	0,42 (-0,004 0,839)	0,06
N7-MedG	0,23 (0,04 0,43)	0,02	0,18 (-0,020 0,374)	0,08
AChE	-2,85 (-0,70 -1,03)	<0,01	-2,90 (-4,74 -1,02)	<0,01
BChE	-213,23 (-276,05 -148,41)	<0,001	-230,76 (-292,71 -162,26)	<0,001

Unidades $\mu\text{mol N7-MedG/mol dG}$ (N7-MedG), U/g Hb (AChE), U/L (BChE)

¹ Modelo univariante lineal de efectos mixtos con los participantes como intercepto aleatorio.

² Modelo lineal de efectos mixtos ajustado por polimorfismos genéticos (*PON1 192*, *GSTM1*, *GSTT1*), edad, sexo, IMC, consumo de tabaco, alcohol y café/té.

Al estratificar por sexo (Tabla V-19) los trabajadores varones mostraron niveles significativamente más altos de N7-MedG y significativamente más bajos de AChE y BChE en el periodo de alta exposición a plaguicidas con respecto al de baja exposición. Las trabajadoras mostraron niveles similares de N7-MedG y AChE en ambos periodos, aunque su actividad BChE fue significativamente menor en el periodo de alta exposición a los plaguicidas.

Tabla V-19. Niveles de N7-MedG, AChE y BChE estratificados según sexo en los dos periodos de estudio (alta y baja exposición).

	Hombres			Mujeres		
	Baja Exposición	Alta Exposición	<i>P</i>	Baja Exposición	Alta Exposición	<i>P</i>
N7-MedG ¹	0,42 ± 0,41	0,75 ± 0,69	0,03	0,57 ± 0,67	0,57 ± 0,53	0,46
AChE	21,01 ± 3,50	17,65 ± 3,84	0,01	18,24 ± 3,93	17,73 ± 4,48	0,72
BChE	1213,83 ± 185,70	1008,56 ± 177,05	0,00	1126,45 ± 223,07	859,37 ± 151,06	0,00

Unidades $\mu\text{mol N7-MedG/mol dG}$ (N7-MedG), U/g Hb (AChE), U/L (BChE)

¹Se muestran los valores originales en la tabla en lugar de la transformación logarítmica para una mejor comprensión. Sin embargo, el análisis estadístico se ha realizado a partir de datos de transformación logarítmica.

En cada periodo estudiado, se compararon N7-MedG, AChE y BChE por edad, sexo, índice de masa corporal, consumo de tabaco, alcohol y de café/té. Las únicas diferencias significativas observadas fueron (i) cuando BChE se comparó por sexo, ya que en el periodo de alta exposición a plaguicidas las mujeres tenían una actividad significativamente más baja que los hombres (859 ± 151 frente a 1010 ± 177 , $p = 0,020$) y (ii) la actividad AChE se correlacionó significativamente con el IMC en ambos periodos ($r = 0,452$; $p = 0,007$ en baja exposición y $r = 0,389$; $p = 0,045$ en alta exposición).

Los niveles de N7-MedG, AChE y BChE no mostraron correlación significativa en cada uno de los periodos de estudio (Tabla V-20).

Tabla V-20. Correlación (coeficiente rho de Spearman) entre N7-MedG, AChE y BChE en cada uno de los periodos estudiados

	N7-MedG	AChE	BChE
<i>Alta exposición</i>			
N7-MedG	-	0,023	0,082
AChE	0,023	-	0,297
BChE	0,082	0,297	-
<i>Baja exposición</i>			
N7-MedG	-	0,148	0,140
AChE	0,148	-	-0,117
BChE	0,140	-0,117	-

La Tabla V-21 muestra los niveles de N7-MedG con respecto a los polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de plaguicidas. Se observaron diferencias marginalmente significativas en el polimorfismo de *GSTM1*, con una respuesta de dosis génica. Los portadores de genotipo nulo presentaban niveles altos de N7-MedG con respecto a heterocigotos y homocigotos para el alelo funcional. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los polimorfismos de *GSTT1* y *PON1 Q192R*.

Tabla V-21. Niveles de N7-MedG según los polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de plaguicidas en los dos periodos de estudio.

	Baja Exposición		Alta Exposición	
	N7-MedG ¹	<i>p</i>	N7-MedG ¹	<i>p</i>
<i>GSTM1</i>		0,76		0,06
*0/*0	0,56 ± 0,60		0,92 ± 0,74	
*0/*1	0,38 ± 0,36		0,60 ± 0,56	
*1/*1	0,41 ± 0,46		0,29 ± 0,22	
<i>GSTT1</i>		0,23		0,34
*0/*0	0,21 ± 0,14		0,43 ± 0,41	
*0/*1	0,55 ± 0,45		0,84 ± 0,66	
*1/*1	0,55 ± 0,63		0,74 ± 0,74	
<i>PON1 Q192R</i>		0,73		0,12
QQ	0,50 ± 0,52		0,58 ± 0,64	
QR	0,41 ± 0,43		0,59 ± 0,59	
RR	0,49 ± 0,58		1,10 ± 0,66	

Unidades $\mu\text{mol N7-MedG/mol dG}$ (N7-MedG).

¹Se muestran los valores originales en la tabla en lugar de la transformación logarítmica para una mejor comprensión. Sin embargo, el análisis estadístico se ha realizado a partir de datos de transformación logarítmica.

V.E Análisis de la estructura poblacional

V.E.1 Muestras del estudio, españoles y marroquíes

En el presente estudio, se realizó en primer lugar el análisis en los dos grupos poblacionales, españoles y marroquíes, para observar el nivel de parentesco entre ellas, según el procedimiento descrito en el apartado de Material y Métodos. El modelo que mejor se ajusta este análisis es el no-combinado independiente y el mejor valor de K determinado fue $K=2$ (Media $\text{LnP}(K) = -2024,7$; Delta $K = 456,5$), representado en negrita en la Tabla V-22.

La Figura V-13 representa gráficamente por un lado, los valores de la media de LnP en cada K analizada, siendo la más negativa la igual a 2; y por otro, los valores correspondientes a Delta K , siendo mayor en K igual a 2, indicando de esta manera cual es el valor de K que explica mejor las diferencias existentes entre las poblaciones estudiadas. Si se observa la Figura V-14, los análisis se han hecho con dos poblaciones asumidas, $K=2$. El programa examina pares de variables genéticas determinando dos componentes ancestrales que separen a las poblaciones, y se analizan los individuos buscando la presencia de éstas. Las dos componentes ancestrales en esta imagen se representan en verde y en rojo, y los individuos se tiñen de verde o de rojo, o de ambos, según exista una mayor o menor presencia de la componente ancestral. En la Tabla V-23 se indica la proporción de cada componente ancestral que contiene cada población de estudio.

Tabla V-22. Determinación del mejor valor de K para el análisis de la estructura poblacional entre españoles y marroquíes.

Tipo de Análisis		K	Media LnP(K)	DevEst LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
Combinado	Correlacionado	2	-2054,6	2,1	31,6	93,3	44,9
Combinado	Independiente	2	-2049,3	3,0	37,0	85,7	29,0
No-Combinado	Correlacionado	2	-2038,8	1,9	47,4	130,8	70,2
No-Combinado	Independiente	2	-2024,7	0,2	61,6	102,1	456,5
Combinado	Correlacionado	3	-2116,2	22,3	-61,6	12,6	0,6
Combinado	Independiente	3	-2098,0	4,3	-48,7	10,3	2,4
No-Combinado	Correlacionado	3	-2122,2	9,9	-83,4	19,4	2,0
No-Combinado	Independiente	3	-2065,2	0,8	-40,5	14,1	16,7
Combinado	Correlacionado	4	-2190,5	57,5	-74,3	4,2	0,1
Combinado	Independiente	4	-2156,9	5,2	-58,9	18,6	3,6
No-Combinado	Correlacionado	4	-2225,1	20,8	-102,8	106,1	5,1
No-Combinado	Independiente	4	-2091,6	1,2	-26,4	0,8	0,7

Figura V-13. Gráficos de la media de $\text{LnP}(K)$ [arriba] y Delta K [abajo] frente a los diferentes K analizados en las dos poblaciones del presente estudio, española y marroquí.

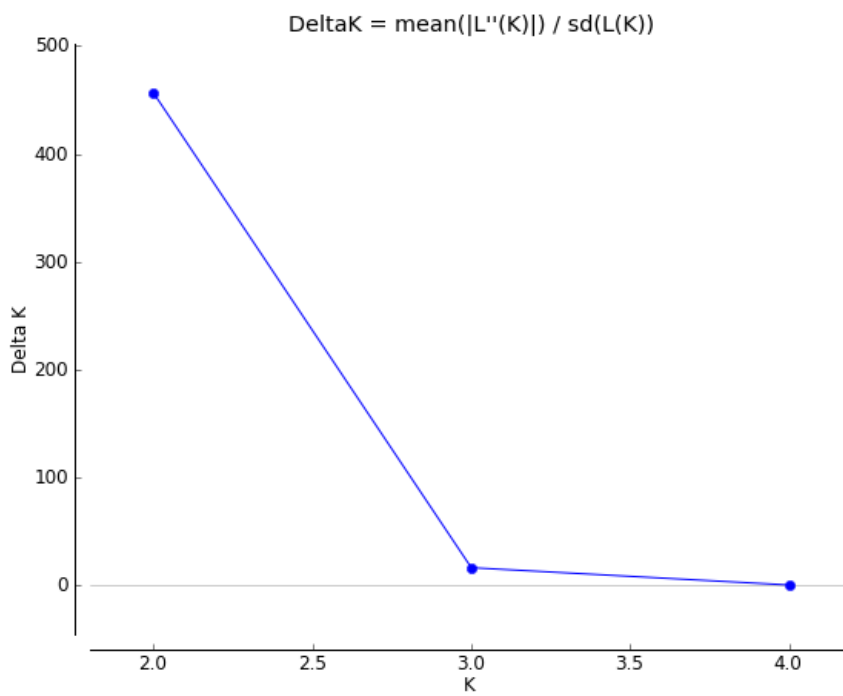
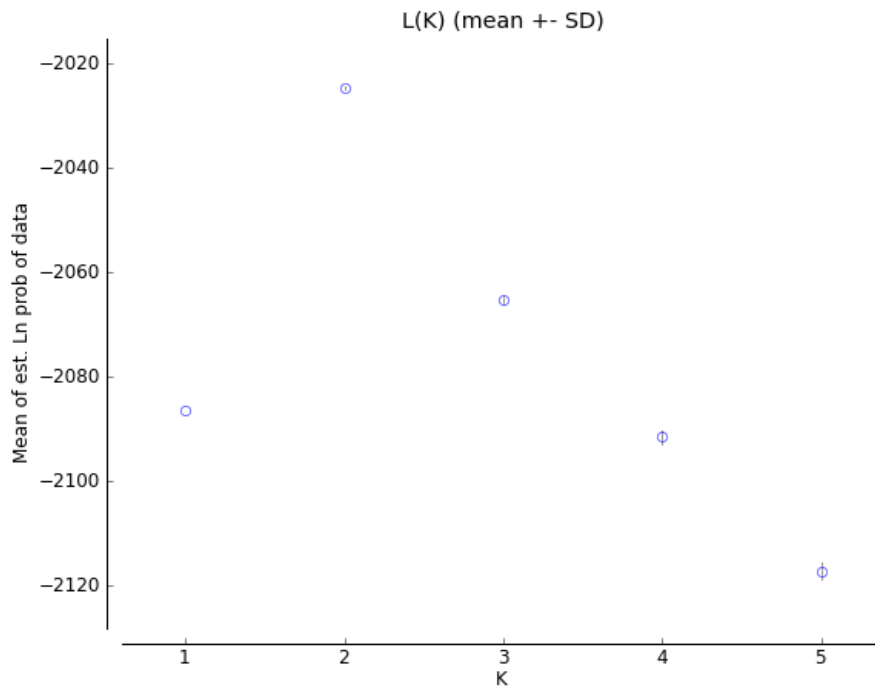
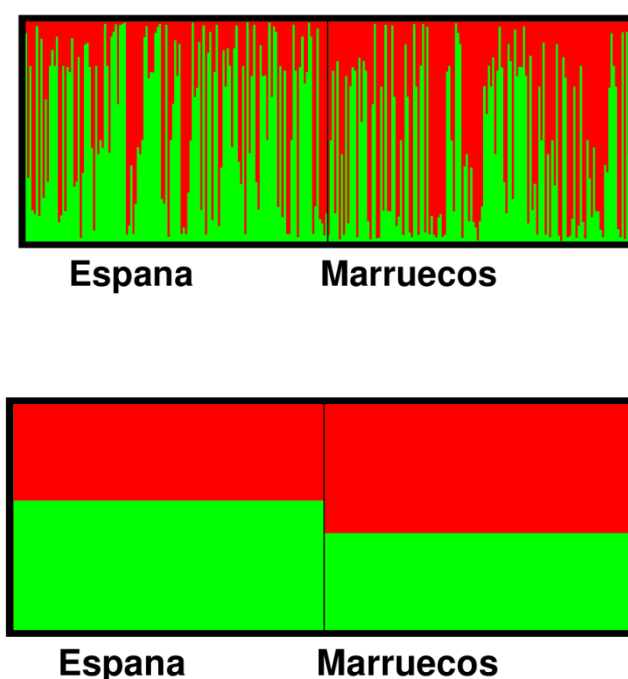


Tabla V-23. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=2 de las 2 poblaciones de estudio.

Población	Componentes ancestrales	
	roja	verde
Españoles	0,426	0,574
Marroquíes	0,570	0,430

Figura V-14. Análisis estructural de las 2 poblaciones del presente estudio. Imágenes obtenidas en DISTRUCT a partir de datos de CLUMPP de individuos españoles y marroquíes del presente estudio, previamente analizados en STRUCTURE, asumiendo poblaciones formadas por dos componentes ancestrales (K=2).



Cada individuo se representa con una fina línea vertical, que está dividida en los colores asignados a cada K representando la pertenencia estimada de cada individuo de cada clúster K (gráfico superior). Asignación media de cada población a los clústeres resultantes del análisis de estructura (gráfico inferior).

V.E.2 Muestras del estudio, junto con población europea y africana

Posteriormente se efectuó el mismo análisis para comparar las poblaciones de estudio junto a otros dos grupos poblacionales (europeos y africanos), cuya información se obtuvo a partir de la base de datos 1 000 Genomes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012). De esta forma se puede detectar si en un grupo muestral existen diferencias significativas que permitan diferenciar poblaciones distintas. El modelo que mejor se ajusta este análisis

es el no-combinado correlacionado y el mejor valor de K determinado fue $K=2$, representado en negrita en la Tabla V-24 (Media $\text{LnP}(K) = -6420,3$; Delta $K = 1505,0$).

La Figura V-15 representan gráficamente por un lado, los valores de la media de LnP en cada K analizada, siendo la más negativa la igual a 2; y por otro, los valores correspondientes a Delta K , siendo mayor en K igual a 2, indicando de esta manera cual es el valor de K que explica mejor las diferencias existentes entre las poblaciones estudiadas. Si se observa la Figura V-16, los análisis se ha hecho con dos y tres poblaciones asumidas, $K=2$ y $K=3$. El programa busca K componentes ancestrales que separen a las poblaciones, y se analizan los individuos buscando la presencia de éstas. Las componentes ancestrales en esta imagen se representan en verde, rojo y azul, y los individuos se tiñen de verde, rojo y/o azul, según exista una mayor o menor presencia de la componente. En la Tabla V-25 y Tabla V-26 se indican las proporciones de cada componente ancestral que contiene cada población de estudio.

Tabla V-24. Determinación del mejor valor de K para el análisis de la estructura poblacional entre los dos grupos poblacionales del estudio (españoles y marroquíes), población africana y población europea.

Tipo de Análisis		K	Media $\text{LnP}(K)$	DevEst $\text{LnP}(K)$	$\text{Ln}'(K)$	$ \text{Ln}''(K) $	Delta K
Combinado	Correlacionado	2	-6546,2	14,5	512,7	421,7	29,0
Combinado	Independiente	2	-6505,3	5,7	553,7	460,2	80,9
No-Combinado	Correlacionado	2	-6420,3	0,4	638,7	569,1	1505,0
No-Combinado	Independiente	2	-6421,4	0,4	637,6	541,4	1490,2
Combinado	Correlacionado	3	-6455,2	11,4	91,0	130,1	11,4
Combinado	Independiente	3	-6411,8	6,3	93,5	173,7	27,4
No-Combinado	Correlacionado	3	-6350,8	4,3	69,5	161,5	37,6
No-Combinado	Independiente	3	-6325,3	1,1	96,2	194,1	178,5
Combinado	Correlacionado	4	-6494,3	56,7	-39,1	168,2	3,0
Combinado	Independiente	4	-6491,9	8,5	-80,1	4,1	0,5
No-Combinado	Correlacionado	4	-6442,7	27,1	-91,9	234,6	8,6
No-Combinado	Independiente	4	-6423,2	2,7	-98,0	55,1	20,3

Figura V-15. Gráficos de la media de $\text{LnP}(K)$ [arriba] y Delta K [abajo] frente a los diferentes K analizados en las dos poblaciones del presente estudio (españoles y marroquíes), africanos y europeos.

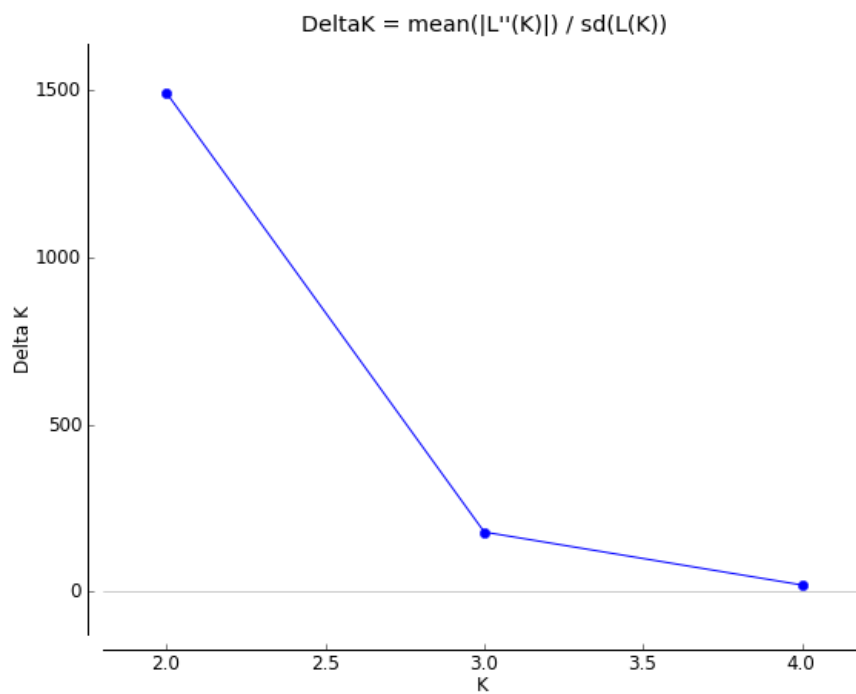
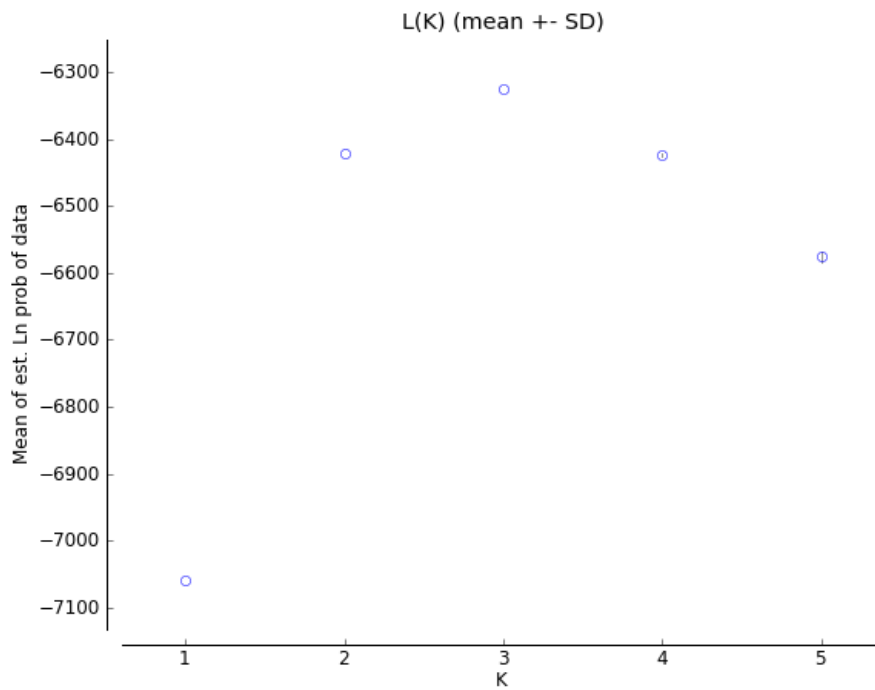
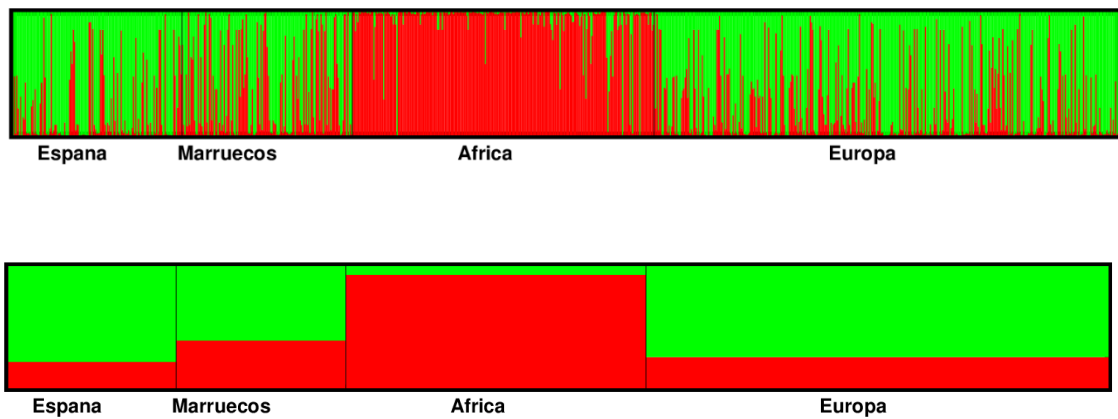


Tabla V-25. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=2 de 4 poblaciones.

Población	Componentes ancestrales	
	roja	verde
Espanoles	0,216	0,784
Marroquíes	0,391	0,609
Africanos	0,929	0,071
Europeos	0,255	0,745

Figura V-16. Análisis estructural de 4 poblaciones. Imágenes obtenidas en DISTRUCT a partir de datos tanto de individuos como de poblaciones de CLUMPP, previamente analizados en STRUCTURE, asumiendo poblaciones formada por dos componentes ancestrales (K=2);

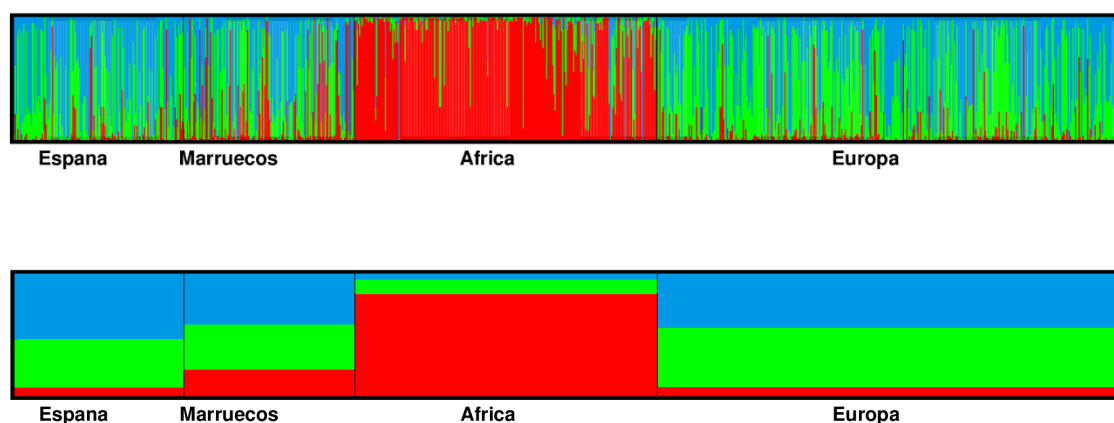


Cada individuo se representa con una fina línea vertical, que está dividida en los colores asignados a cada K representando la pertenecía estimada de cada individuo de cada clúster K (gráfico superior). Asignación media de cada población a los clústeres resultantes del análisis de estructura (gráfico inferior).

Tabla V-26. Proporciones de cada componente ancestral para el análisis estructural K=3 de 4 poblaciones.

Población	Componentes ancestrales		
	roja	verde	azul
Espanoles	0,071	0,395	0,534
Marroquíes	0,217	0,368	0,415
Africanos	0,835	0,118	0,047
Europeos	0,075	0,483	0,442

Figura V-17. Análisis estructural de 4 poblaciones. Imágenes obtenidas en DISTRUCT a partir de datos tanto de individuos como de poblaciones de CLUMPP, previamente analizados en STRUCTURE, asumiendo poblaciones formada por tres componentes ancestrales (K=3).



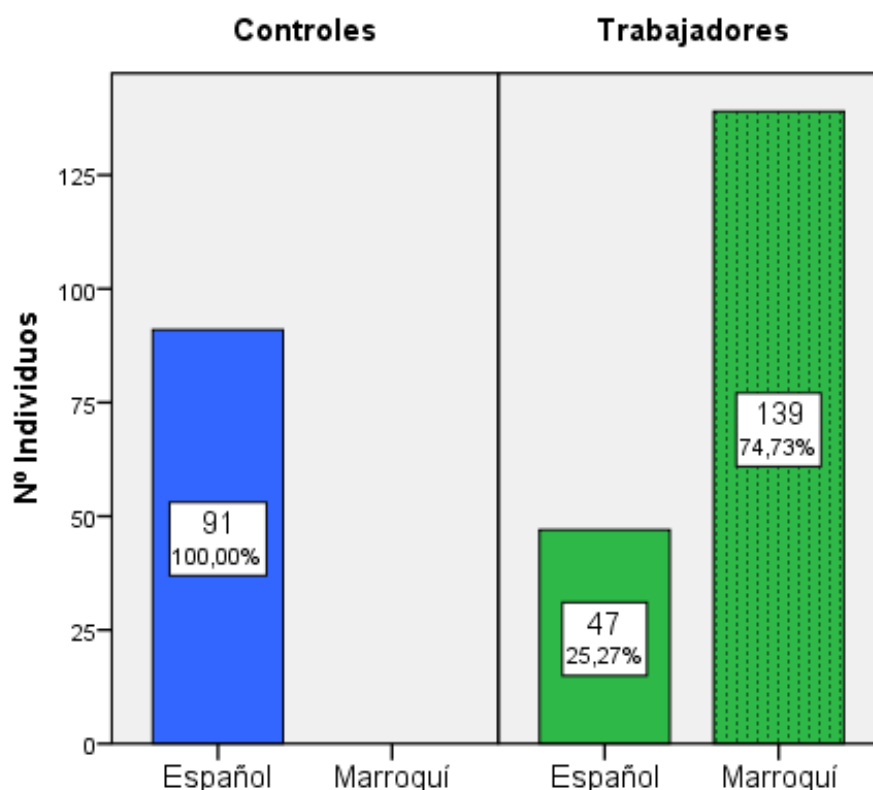
Cada individuo se representa con una fina línea vertical, que está dividida en los colores asignados a cada K representando la pertenecía estimada de cada individuo de cada clúster K (gráfico superior). Asignación media de cada población a los clústeres resultantes del análisis de estructura (gráfico inferior).

VI DISCUSIÓN

Este estudio proporciona los primeros datos completos sobre diez variantes polimórficas de genes que codifican enzimas metabolizadoras de plaguicidas (*BCHE*, *PON1*, *CYP450* y *GSTs*) en individuos con exposición ocupacional a plaguicidas. Pocos estudios han examinado minuciosamente los polimorfismos genéticos comunes de las enzimas de biotransformación de fase I y fase II implicadas en el metabolismo humano de los xenobióticos (Bosch et al., 2006; Gómez-Martín, Hernández, et al., 2015; Satyender Singh et al., 2012). Los datos obtenidos en estos estudios contribuyen al conocimiento de la toxicogenómica actual de importantes enzimas metabolizadoras de plaguicidas en humanos y pueden resultar útiles en estudios de epidemiología genética y ambiental para comprender mejor la relación entre exposición a plaguicidas y las posibles enfermedades o efectos adversos relacionados con la salud ocupacional y ambiental (Howard et al., 2010; Sarmanová et al., 2000).

Un alto porcentaje de los trabajadores de la agricultura intensiva en Andalucía, y en especial en Almería, son de origen marroquí. En este estudio se refleja esta situación, ya que el 75% de los trabajadores del estudio son marroquíes (Figura VI-1). Esta característica hay que tenerla en cuenta a la hora de discutir los resultados puesto que, tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas de controles y trabajadores pueden verse alteradas por las características genéticas de la población. Por este motivo se realizaron los análisis según su origen ancestral de forma previa al estudio según nivel de exposición (Yesupriya et al., 2008).

Figura VI-1. Gráfico de barras agrupadas según sean controles o trabajadores, y divididos en origen poblacional..



VI.A Análisis descriptivo de la muestra

Al comparar los dos grupos de trabajadores entre sí (expuestos frente a controles) se observan diferencias significativas en algunas características que en principio pudieran interferir sobre los resultados obtenidos (Tabla V-1). Durante la fase de diseño del estudio no fue posible controlar dichas diferencias debido a la dificultad de encontrar una Mutua que dejara participar a sus trabajadores y, posteriormente, que ellos aceptaran someterse voluntariamente a dos extracciones de sangre en un periodo de tiempo relativamente corto, de varios meses. No obstante, como los principales objetivos de este estudio son de carácter genético, *a priori* esto no debería producir una distorsión importante que amenace la validez interna de los resultados, pues las diferencias por edad, sexo, hábitos tóxicos y educación no están mediados por la configuración genética de la población estudiada, salvo el origen ancestral. En este último sentido, el grupo de trabajadores expuestos estaba constituido mayoritariamente por marroquíes mientras que el control sólo por españoles, lo

cual entraña importantes diferencias de tipo cultural, dietético, estilos de vida, genéticas, etc., de manera que es posible la existencia de una diferente distribución en las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambas poblaciones y que pudiera ser motivo de una diferente susceptibilidad de carácter genético a la exposición a plaguicidas. Por eso, se realizaron los correspondientes análisis estadísticos y de estructura poblacional para evaluar el alcance de esta diferencia importante.

VI.B Frecuencias alélicas y genotípicas

Al comparar las frecuencias genotípicas y de alelos mutados, considerados como genotipos de riesgo, en ambas poblaciones, se observa que en la población española las frecuencias son significativamente mayores para *PON1 -108T* y *CYP2D6*4*; mientras que la población marroquí presenta una mayor frecuencia de *PON1 192R*, *CYP3A1*1* y alelo nulo de *GSTT1* (Tabla V-3 y Tabla V-4, pág. 167 y 170 respectivamente). Sin embargo, al comparar por grado de exposición (controles frente a trabajadores), se observan diferencias significativas en *BCHE-K*, *PON1 -108T*, *CYP2D6*4* y *CYP3A1*3* (Tabla V-6, pág. 36). En líneas generales, los trabajadores presentan una menor frecuencia de genotipos de riesgo (Figura VI-2, Figura VI-3 y Figura VI-4) lo que podría explicarse por el efecto de trabajador sano por una presunta presión ocupacional frente a individuos genéticamente susceptibles (Au et al., 1999; Christiani et al., 2008). El riesgo de efectos potenciales para la salud relacionados con la exposición ambiental u ocupacional a plaguicidas puede ser modificado por la variabilidad genética en enzimas que codifican genes implicados en el metabolismo de estos compuestos. Cuando los individuos no son eficientes en el proceso de detoxificación, o lo son mucho en el de bioactivación, se acumulan los subproductos metabólicos contribuyendo a la toxicidad.

Figura VI-2. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de *BCHE-K* para los grupos Controles y Trabajadores.

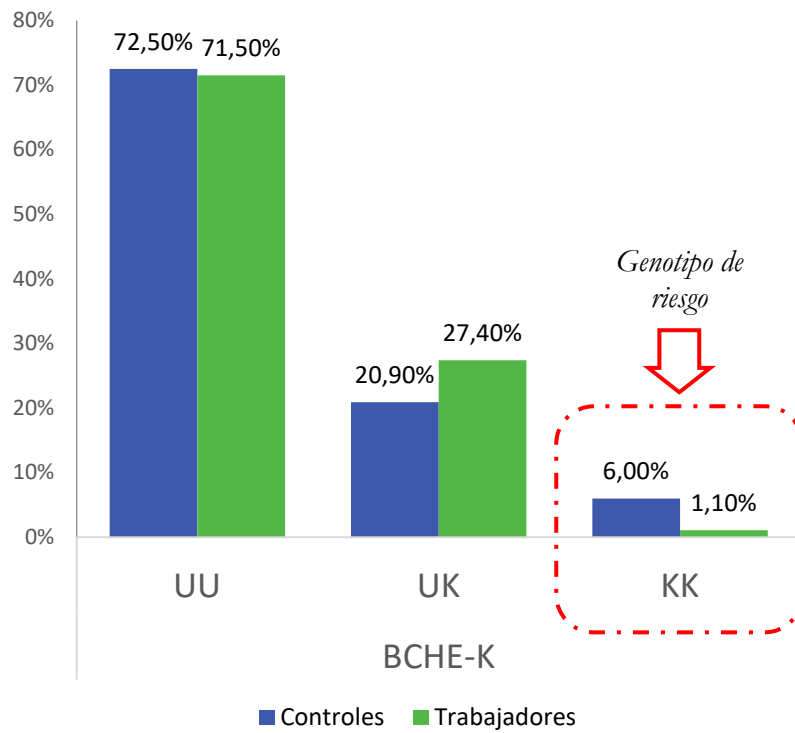


Figura VI-3. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de *PON1* -108C/T para los grupos Controles y Trabajadores.

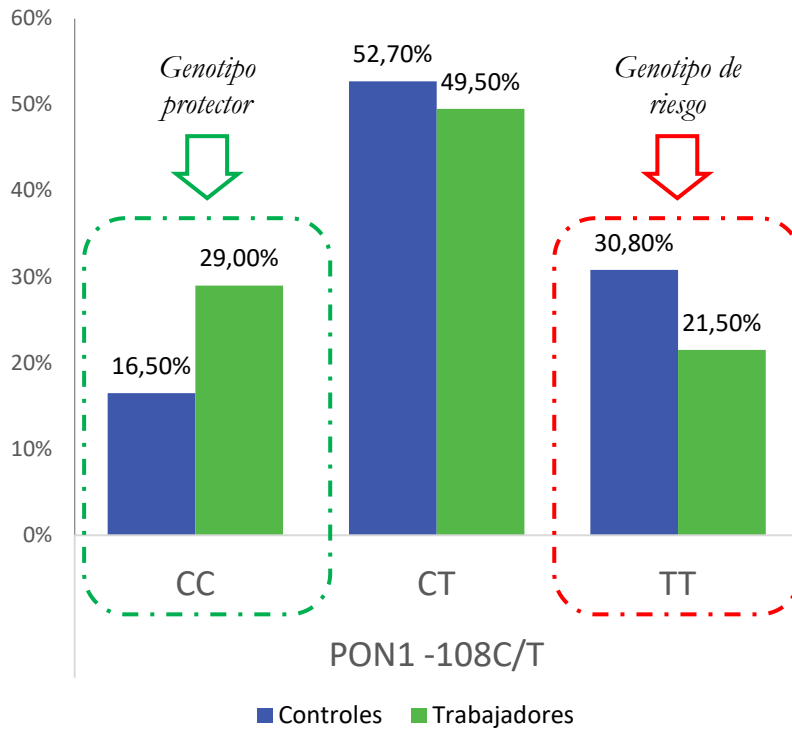
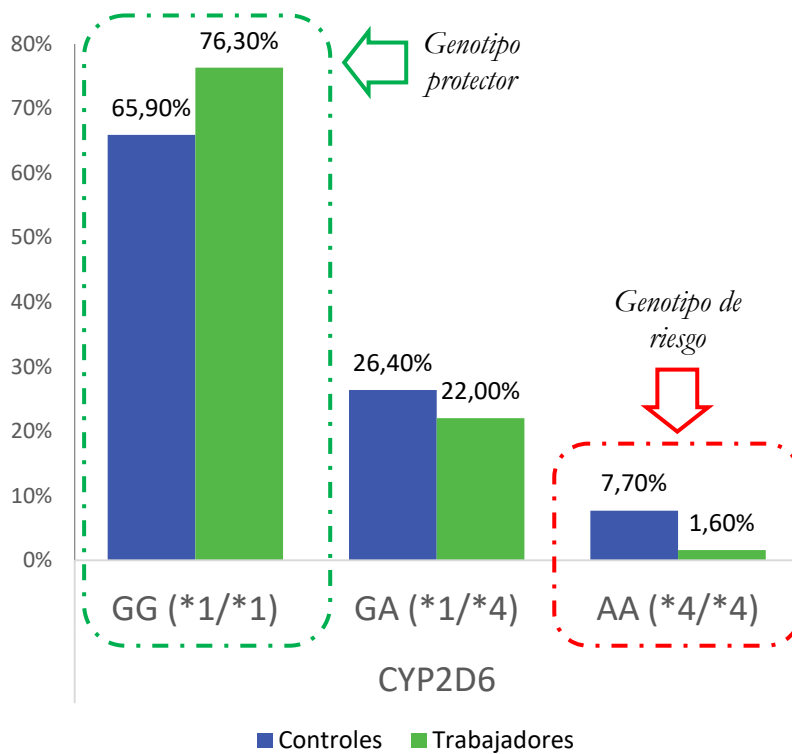


Figura VI-4. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas de *CYP2D6**4 para los grupos Controles y Trabajadores.



La limitada evidencia disponible en animales y humanos sugiere que individuos con variantes genéticas de BChE que muestran una menor actividad enzimática pueden ser más sensibles a la toxicidad de OP (Hernández et al., 1999; Oksana Lockridge y Masson, 2000; Manoharan et al., 2006). El SNP común **BCHE-K** (variante K) se asocia con aproximadamente el 7% de reducción en la actividad enzimática en heterocigotos y de un 14% en homocigotos (Podoly et al., 2009). Entre los pocos estudios que describen las frecuencias alélicas de *BCHE-K* en diferentes poblaciones basadas en el análisis de ADN, Benyamin et al. (2011) encontraron una frecuencia de alelo menor de 0,21 (Benyamin et al., 2011). Frecuencias similares se han observado en poblaciones de diferentes orígenes étnicos y geográficos (R. L. Souza et al., 1998) y los resultados del presente estudio son ligeramente más bajos (0,17 para españoles y 0,14 para marroquíes).

Otras variantes genéticas de *BCHE* son infrecuentes, como la variante atípica resistente a la dibucaína (**BCHE-A**), cuya frecuencia alélica en las poblaciones europeas oscila entre un 0,015 y 0,073 (Acuña et al., 2003; O. Lockridge, 1992). En el presente estudio, la frecuencia alélica en españoles (0,18) está dentro de este rango, mientras que la de marroquíes (0,011) está por debajo. La variante *BCHE-A* se ha asociado con una disminución del 33% en la actividad catalítica en comparación a los homocigóticos para el tipo salvaje (Bartels et al., 1992). Estos autores indicaron que ambos SNPs de *BCHE* están en desequilibrio de ligamiento, como también se observó en el presente estudio.

El gen **PON1** tiene dos polimorfismos principales en la región codificante *PON1 Q192R* (que afecta a la actividad catalítica de PON1 de una manera dependiente del sustrato utilizado) y *PON1 L55M* (asociado con la concentración sérica de la enzima). Sin embargo, el principal factor que contribuye a la variación de los niveles de PON1 en el suero es el polimorfismo de la región reguladora *PON1 -108C/T*, ya que afecta a la expresión de *PON1* (Richter et al., 2009). Como todos estos polimorfismos afectan a la tasa de hidrólisis de los oxones tóxicos de OPs, la caracterización genotípica del gen *PON1* representa un predictor potencial para evaluar la susceptibilidad a los efectos de OPs (Costa et al., 2013).

Otros polimorfismos importantes para el metabolismo de los plaguicidas, en particular para las vías de biotransformación de OPs (que son las más conocidas), son los de los genes que codifican *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4/5* y *CYP2B1*, que pueden dar como resultado metabolitos tóxicos o productos menos tóxicos (Bozina et al., 2009). Estos **CYP450s** muestran polimorfismos genéticos importantes que afectan a la actividad metabolizadora de xenobióticos, así como una variabilidad considerable en la distribución de alelos entre los diferentes grupos poblacionales, dando lugar a porcentajes variables de metabolizadores

lentos, intermedios y rápidos en una población dada (Zhou et al., 2009). Así, los polimorfismos genéticos de CYP450s que originan una menor tasa de eliminación de xenobióticos (incluyendo plaguicidas) como consecuencia de una menor actividad catalítica pueden aumentar la de toxicidad de muchos tóxicos ambientales. Para **CYP2D6**, el polimorfismo de inactivación más frecuente en los caucásicos es el genotipo *CYP2D6*4/*4*. El 5-14% de los caucásicos carecen de actividad CYP2D6, por lo que se consideran metabolizadores lentos (Bozina et al., 2009). Para **CYP2C19**, el fenotipo de metabolizador lento lo presenta el 2-5% de los caucásicos y deriva del genotipo *CYP2C19*2/*2* (Goldstein et al., 1997). **CYP3A5** es la isoforma extrapolar primaria del CYP3A y su expresión polimórfica puede estar implicada en un mayor riesgo de enfermedad debido al metabolismo de los xenobióticos en tejidos distintos del hígado (Lamba et al., 2002). Mientras que el SNP *CYP3A5 A6986G (CYP3A5*3, rs776746)* es ampliamente detectable en poblaciones caucásicas con una frecuencia del alelo *3 del 0,9 (Lamba et al., 2002), la homocigosis para esta variante alélica está fuertemente correlacionada con una menor expresión de la proteína CYP3A5 y, por tanto, de su actividad enzimática en el intestino y el hígado (P. Wang et al., 2010).

El pseudogén **CYP3AP1**, presente en el grupo de genes *CYP3A* humano, muestra un SNP en la posición -44 (rs2177180) que está fuertemente asociado con la expresión de la enzima CYP3A5 (Kuehl et al., 2001). Los individuos homocigotos para el alelo -44A (*3/*3) tienen menor actividad CYP3A5 que los heterocigotos -44GA (*1/*3), mientras que homocigotos para el alelo -44G (*1/*1) muestran la mayor actividad catalítica (Zhu et al., 2002). La estrecha asociación entre los alelos *CYP3AP1*3* y *CYP3A5*3* da lugar a un fuerte desequilibrio de ligamiento y a la concordancia completa entre ellos. Esto permite utilizar el genotipado de *CYP3AP1* como un indicador de la actividad metabólica de CYP3A5 (Zhu et al., 2002). La frecuencia del alelo *CYP3AP1*3* en las poblaciones europeas es 0,933 (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012), cercana a la encontrada en nuestro estudio en españoles (0,844) y ligeramente alejada de la de los marroquíes (0,788). Dado que los alelos mutados *3 de *CYP3A5* y *CYP3AP1* no son funcionales frente a xenobióticos (incluyendo plaguicidas), esto da lugar a una disminución de los niveles de metabolitos activos debido a una baja tasa de bioactivación. Por lo tanto, los portadores de los alelos no funcionales son menos vulnerables a los efectos tóxicos de estos metabolitos activos (como ocurre por ejemplo con el metabolito de oxón de los OP).

Las enzimas **GST**, además de detoxificar intermediarios reactivos, también desempeñan un papel desalquilando grupos metilo o etilo (por ejemplo metil-paratión y paratión,

respectivamente) y desarilación de OPs (por ejemplo, paratión y diazinon), reacción también denominada hidrólisis oxidativa (Fujioka y Casida, 2007). Dado que el genotipo nulo de estos genes puede conferir una mayor susceptibilidad toxicidad por exposiciones químicas (Rossini et al., 2002), la determinación del genotipo *GSTM1* y *GSTT1* puede ser útil como un marcador individual de susceptibilidad en población expuesta a OPs (Satyender Singh, Kumar, Singh, et al., 2011).

VI.C Desequilibrio de ligamiento y haplotipos de riesgo

La variación interindividual de los efectos adversos debidos al origen genético ancestral de un individuo no puede explicarse únicamente por polimorfismos genéticos individuales. El desequilibrio de ligamiento y el análisis de haplotipos pueden ser también de ayuda para identificar la significación funcional de los polimorfismos. En el presente estudio, las frecuencias de combinaciones de genotipos con mayor riesgo ante la exposición a plaguicidas se muestran en la Tabla V-11 y Tabla V-12 de la pág. 179. En el caso de la exposición a OPs (el grupo de plaguicidas cuyas vías metabólicas son muy bien conocidas) alrededor del 15% de las dos poblaciones de estudio tiene genotipos distintos de UU/UU para la combinación de los SNPs *BCHE-K/BCHE-A*. Dado que los portadores de variantes genéticas de estos SNPs tienen menor actividad catalítica de BChE, se puede predecir que presentan un mayor riesgo teórico de desarrollar efectos adversos a partir de la exposición a insecticidas anticolinesterásicos. Ambos SNPs están en desequilibrio de ligamiento (sólo 1 individuo con el genotipo UU es también portador del alelo A), lo que indica que ambos SNPs son prácticamente insustituibles y por lo tanto muestran efectos acumulativos sobre la actividad enzimática. Por lo tanto, un 15% de la población de estudio puede presentar un mayor riesgo debido a los polimorfismos genéticos en *BCHE*. Además, el 75% de los sujetos con genotipo UA también son portadores del alelo K, muy probablemente debido al desequilibrio de ligamiento, con un valor D' de 0,552 y r^2 de 0,031. Este último es mucho menor debido a que las frecuencias alélicas de los polimorfismos son muy diferentes, algunas de ellas muy bajas.

En cuanto a los SNPs de *PON1*, el 11% de la población de estudio presentó la combinación de genotipos *RR-MM-TT*, que se asocia con una menor concentración de proteína sérica y de actividad catalítica. Los polimorfismos de *PON1 Q192R*, *L55M* y *-108C/T* mostraron cierto desequilibrio de ligamiento entre sí. A pesar de los valores altos

de D' , que sugieren un fuerte LD, los valores de r^2 son bajos (0,250 y 0,201 respectivamente), lo que indica que ninguno puede ser remplazado por los otros. Dado que el polimorfismo *PON1 Q192T* muestra diferencias en las tasas de hidrólisis y eficacia catalítica en función del sustrato (Costa et al., 2013), no se puede hacer una evaluación individual de la vulnerabilidad a los OPs en general. Cualquier predicción debe hacerse sobre la exposición a cada compuesto de forma independiente.

En relación con el polimorfismo GSTs, el 10% de la población estudiada tiene la combinación de genotipos nulos para *GSTM1* y *GSTT1*. Por tanto, tienen un mayor riesgo de efectos adversos, particularmente tras la exposición a compuestos químicos (incluyendo plaguicidas) que dan lugar a metabolitos reactivos durante su biotransformación.

En el caso de CYP450 es difícil realizar predicciones sobre la mayor susceptibilidad a la exposición a plaguicidas a partir de las combinaciones de genotipos de sus genotipos, ya que estas enzimas están implicadas tanto en la bioactivación como en la detoxificación de los OPs, dependiendo del tipo de compuesto y su concentración. Curiosamente, 11 de los 12 individuos con el genotipo *CYP3A11*/** (que expresa la proteína CYP3A5 y, por tanto pueden activar los OPs a oxones) tenían el genotipo *CYP2D6*/** (metabolizadores rápidos), lo que indica un mayor riesgo de activación del OP, particularmente a dosis ambientales relativamente altas (Tawfik Khattab et al., 2016). De estos 11 individuos, 3 tenían el genotipo *CYP2C19*2* (metabolizadores intermedios), lo que indica una capacidad limitada para detoxificar los OPs primarios antes de ser activados a sus correspondientes oxones. Según la distribución del genotipo CYP450 observada en la población de estudio, estos 3 individuos tendrían el mayor riesgo genético de exposición a OPs. Sólo 1 de estos 11 casos fue portador de un genotipo PON1 de riesgo (*PON1 -108TT*), con genotipo UU para los dos polimorfismos estudiados en *BCHE*, siendo este el único caso de los 11 individuos con genotipo nulo para ambos GSTs. Si el tamaño de muestra aumentara hasta el nivel de la población, se encontrarían individuos portadores de diversos genotipos desfavorables para varias enzimas metabolizadoras.

La posibilidad de una mayor susceptibilidad debido a mutaciones genéticas específicas es un tema muy complejo ya que las “deficiencias” producidas por un genotipo en particular pueden ser compensadas por otros genotipos más “protectores”. La situación es aún más complicada para los CYP450 ya que pueden contribuir tanto a una mayor como menor susceptibilidad, dependiendo de la exposición real. Como la combinación de genotipos favorables y desfavorables de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos podría contribuir a los efectos en salud de las exposiciones a largo plazo, deberían tenerse en

cuenta en futuros estudios a fin de mejorar la predicción de tales efectos. La frecuencia alélica de variantes genéticas de enzimas metabólicas, junto con el desequilibrio de ligamiento y la combinación de haplotipos, son parámetros importantes para seleccionar qué SNPs deben ser analizados en controles rutinarios de salud laboral, así como para determinar las diferencias genéticas en poblaciones expuestas y su riesgo de desarrollar efectos adversos en salud a pesar de presentar el mismo patrón de exposición (Bosch et al., 2006).

Además, la prevención de enfermedades a nivel individual y poblacional debe abordarse también teniendo en cuenta todos los antecedentes de exposiciones a compuestos químicos tóxicos y beneficiosos y su posible interacción con factores genéticos. Dado que los polimorfismos genéticos que alteran la expresión y/o función de las enzimas metabolizadoras pueden modificar la respuesta tóxica a los compuestos químicos (Lampe, 2007), cada vez se utilizan más como biomarcadores de susceptibilidad a compuestos químicos ambientales y para evaluar las interacciones entre genes y medio ambiente.

VI.D Comparativa con otras poblaciones

Al comparar las frecuencias alélicas de las poblaciones española y marroquí con las de otras poblaciones de Europa, América, Oceanía, Asia y África, se puede observar la variabilidad general que existe entre poblaciones. En términos generales, las poblaciones europeas contienen las frecuencias más parecidas a las poblaciones de nuestro estudio. En los polimorfismos donde se aprecian más diferencias con respecto al resto de continentes son en *PON1 Q192R*, *PON1 L55M*, *PON1 -108C/T*, *CYP2D6*4* y *CYP3A1*3*. Es destacable que las frecuencias alélicas para el polimorfismo *PON1 Q192R* en las poblaciones asiáticas y africana son opuestas a las europeas, siendo el alelo de riesgo (R) el de mayor frecuencia. Para *PON1 L55M*, en población asiática predomina el alelo *PON1 55L* de manera más acusada que en el resto de poblaciones, del mismo modo que es en población africana donde el alelo *PON1 -108C* es elevado. Ambos alelos son considerados alelos “protectores” frente a la exposición a plaguicidas, confiriendo a las poblaciones asiáticas y africanas cierta ventaja frente a dichos agentes tóxicos.

En el caso de los polimorfismos para los *CYP450s*, se observa como las poblaciones asiáticas son las que portan frecuencias significativamente diferentes al resto. Tanto para el alelo *CYP2C19*2* como para el alelo *CYP3A1*3* hay un aumento notable de sus

frecuencias alélicas en comparación con el resto de continentes. Sin embargo en el alelo *CYP2D6*4* sucede lo contrario, prácticamente no se encuentra en la población, en menor medida que los demás. En los polimorfismo para *BCHE* no se han encontrado diferencias significativas, esto es debido principalmente a la reducida frecuencia alélica en la que se encuentran los alelos mutantes de forma general en todas las poblaciones. Para los polimorfismos de CNV en *GSTM1* y *GSTT1* tampoco se ha encontrado diferencias significativas, sólo en el caso de poblaciones asiáticas donde la frecuencia del alelo nulo de *GSTT1* es mayor, y por tanto confiriendo a la población menor “defensa” frente a tóxicos. Son destacables grupos poblaciones con frecuencias alélicas que se alejan del resto de manera muy clara, como son los amerindios brasileños, Huilliches chilenos, finlandeses y zimbabuenses.

VI.E Determinación de aductos N7-MedG

Los resultados del presente estudio muestran que la variabilidad genética individual en los genes que codifican enzimas metabolizadoras de los OPs, también pueden contribuir al riesgo genotóxico. Cuando los individuos no son eficientes en el mecanismo de detoxificación, los subproductos metabólicos se acumulan pudiendo dar lugar a problemas de genotoxicidad, tales como lesiones cromosómicas y ADN (Satyender Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011). En este estudio se examinó si la alquilación de ADN (evaluada mediante la determinación de aductos N7-MedG mediante en el ensayo ISB) se asocia a una mayor exposición a plaguicidas. En el análisis de modelos mixtos, se exploró la influencia independiente de varias covariables que podrían estar asociadas con el daño de alquilación del ADN (por ejemplo, edad, sexo, índice de masa corporal, consumo de tabaco, alcohol y café/té y los polimorfismos genéticos *PON1 192*, *GSTM1*, y *GSTT1*). A pesar de que ninguna de las covariables fue estadísticamente significativa (probablemente debido al tamaño de la muestra relativamente pequeño), se observaron niveles significativamente más elevados de N7-MedG en el período de alta exposición con respecto al de baja exposición, indicando un efecto genotóxico de los plaguicidas. Se observaron actividades de BChE y AChE más bajas en el período de alta exposición frente al de baja exposición, debido a la exposición a los plaguicidas. Por lo tanto, el aumento de N7-MedG puede atribuirse a dicha exposición. Estas asociaciones eran independientes del sexo ya que persistían después de estratificar por sexo.

Numerosos estudios indican la posible influencia de los genes *PON1*, *GSTM1* y *GSTT1* en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de trabajadores invernaderos expuestos a plaguicidas, lo que sugiere que estos polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas pueden contribuir a un mayor riesgo de genotoxicidad tras la exposición a plaguicidas (Liu et al., 2006). Los individuos con genotipo *GSTM1* nulo presentaron mayores niveles de N7-MedG en el ADN de las muestras de lavado bronquial (Lewis et al., 2004), pero más bajos en el ADN de vejiga urinaria sana. Los niveles urinarios de N7-MedG no se asociaron con el genotipo *GSTM1* nulo en una población danesa (Loft et al., 2007), pero sí en una población taiwanesa, especialmente en fumadores (Lin et al., 2009).

En el presente estudio, los portadores de genotipo nulo de *GSTM1* y *GSTT1* presentaban mayores niveles de N7-MedG en el período de alta exposición con respecto al de baja exposición y a los otros genotipos GST que contienen alelos funcionales, lo que sugiere que el daño del ADN puede ser modulado a través de interacciones gen-ambiente en trabajadores expuestos a plaguicidas. Además, se observó un efecto de dosis del gen para el polimorfismo *PON1 Q192R*, ya que los niveles de N7-MedG eran mayores en el periodo de alta exposición con respecto al de baja exposición a medida que aumentaba el número de alelos R portados (Tabla V-21, pág. 197). Estos hallazgos sugieren que el efecto de alquilación genotóxico tras la exposición a plaguicidas es mayor en los portadores de genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulos, así como los portadores del genotipo *PON1 192RR*.

El genotipo *PON1 Q192R* se ha asociado con ciertos tipos de daño al ADN, pero no a la alquilación del ADN. Trabajadores expuestos a OPs de la India con genotipo *QQ* tenían niveles más altos de daño en el ADN de linfocitos medido por el ensayo cometa alcalino (Satyender Singh, Kumar, Vashisht, et al., 2011). De forma similar, el genotipo *QQ* se asoció con una mayor fragmentación del ADN espermático y altos niveles de 8-OxodG en una población china (Ji et al., 2012). Sin embargo, en un estudio realizado en trabajadores agrícolas del sur de México expuestos a OPs, el genotipo *RR* se asociaba a una menor integridad del ADN espermático (mediante el ensayo *nick translation*) (Pérez-Herrera et al., 2008). Asimismo, el alelo R se asocia a un mayor riesgo de problemas crónicos de la salud en ganaderos británicos expuestos a OP durante el “baño de la oveja” (Povey, 2010). Sin embargo, la evidencia de estos estudios es limitada, por lo que cualquier efecto sobre el daño del ADN puede ser específica tanto de la exposición como del daño.

Algunos estudios consideran el tabaquismo, la dieta, tipo de trabajo y la contaminación, entre otros, como posibles fuentes exógenas de N7-MedG (Crosbie et al., 2013). Sin embargo, el diseño utilizado en nuestro estudio permitió controlar estos posibles factores

de confusión, ya que los individuos fueron evaluados en dos períodos de tiempo separados entre sí unos pocos meses, lo que permite descartar posibles cambios en los estilos de vida o en otras exposiciones químicas. El diseño prospectivo utilizado en el presente estudio, junto con la biomonitorización de la colinesterasa, permitió comparar los niveles de N7-MedG en el período de baja exposición a los plaguicidas con los de alta exposición y, en general, los resultados sugieren que los niveles de N7-MedG se incrementan después de la exposición a plaguicidas. La relevancia de este hallazgo es altamente significativa ya que este aducto es un indicador del aumento de otros aductos potencialmente mutagénicos, como la O6-metilguanina. Son necesarios más estudios para caracterizar mejor el rango potencial y la abundancia de otros aductos de ADN asociados con la exposición a plaguicidas en áreas de agricultura intensiva donde se usa una amplia variedad de plaguicidas.

VI.F Estructura Poblacional

Se ha descrito que hay marcadores genéticos asociados a predisposición de enfermedades que dependen del origen ancestral de la población (McMaster et al., 2010). Debido a que el grupo muestral de los trabajadores pertenecía a dos poblaciones bien definidas, española y marroquí, y en cambio el grupo control sólo está formado por españoles, se requería de un análisis de la estructura poblacional, para así poder realizar análisis posteriores considerando la variable exposición sin tener en cuenta el origen poblacional.

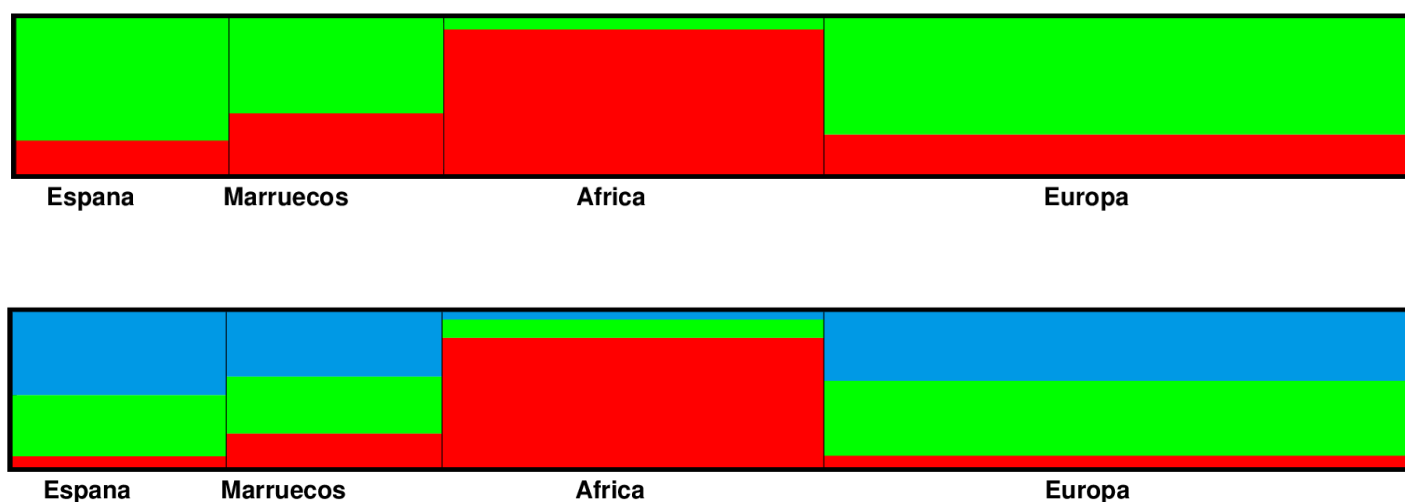
Tras realizar el análisis de la estructura poblacional en españoles y marroquíes, se determina que están formados por dos componentes ancestrales, y la proporción de estos en cada una son muy similares. Este dato nos indica que estas dos poblaciones han tenido orígenes ancestrales muy parecidos, resultado que coincide con lo esperado debido a la historia migratoria tan ligada de ambas poblaciones (Fernandez-Santander et al., 1999). Sin embargo, también se aprecia como la componentes ancestral verde tiene mayor proporción en españoles y la componente ancestral roja tiene mayor proporción en marroquíes (Figura V-14, pág. 201).

Para conocer la procedencia de cada una de las componentes ancestrales es necesario el análisis de la estructura poblacional junto con otras poblaciones que se prevea puedan ejercer influencia sobre nuestras poblaciones de estudio, como es el caso de europeos y africanos. Al realizar dicho análisis para dos componentes ancestrales, se observa como la componente verde, que tiene mayor proporción en españoles, es la mayoritaria en

Europeos; y la componente roja, que tiene mayor proporción en marroquíes es la mayoritaria en africanos (gráfico superior de la Figura VI-5). Estos datos coinciden con la proximidad geográfica de cada población, sin embargo ese factor no debe ser muy influyente en el flujo génico puesto que europeos, españoles y marroquíes coinciden en la misma componente mayoritaria (verde), esta semejanza puede deberse a que la población marroquí a lo largo de su historia ha recibido flujos migratorios principalmente de Europa y en menor medida de África (Fernandez-Santander et al., 2002).

Al añadir una tercera componente (azul) al análisis, se puede apreciar como en los españoles es donde posee mayor proporción, comparado con marroquíes y europeos que tiene niveles muy parecidos (gráfico inferior de la Figura VI-5). La posible explicación a estas diferencias, principalmente entre europeos y españoles, puede ser debido a un origen más complejo de la población española, que se ve reflejada en una mayor diversidad haplotípica que los europeos del norte (Auton et al., 2009). Este es un escenario posible, dado que la Península Ibérica ha estado bajo grandes y duraderas influencias migratorias y meztizaje, con otras poblaciones europeas, mediterráneas y norteafricanas (Gayan et al., 2010; Prieto-Fernández et al., 2016).

Figura VI-5. Análisis estructural de 4 poblaciones asumiendo poblaciones formadas por componentes ancestrales K=2 (gráfico superior) y K=3 (gráfico inferior).



Los colores representan la asignación media de cada población a los clústeres resultantes del análisis de estructura.

VII CONCLUSIONES

1. Para el presente estudio se reclutaron tanto trabajadores de agricultura intensiva expuestos a plaguicidas como controles no expuestos. No obstante, el reclutamiento fue complejo debido a la dificultad de encontrar Mutuas que permitieran realizar una evaluación de salud a sus trabajadores y que estos se prestasen voluntariamente a participar. Esta situación impidió establecer un grupo de estudio totalmente homogéneo en cuanto a su procedencia (origen ancestral), por lo que fue necesario realizar diferentes análisis genéticos para evaluar las similitudes genéticas entre las dos poblaciones finales de estudio (española y marroquí).
2. La frecuencia de los alelos de riesgo que contribuyen a una mayor susceptibilidad genética a plaguicidas fue diferente en el caso de la población española (en la que predominaban los alelos *PON1 -108T* y *CYP2D6*4*) con respecto a la marroquí (donde predominaban los alelos *PON1 192R*, *CYP3AP1*1* y *GSTT1*0*).
3. Las frecuencias de los genotipos de riesgo que contribuyen a una mayor susceptibilidad genética a plaguicidas también fue diferente en el caso de españoles (con una frecuencia significativamente mayor del genotipo *PON1 -108TT*) en comparación a los marroquíes (en los que predominaban los genotipos *PON1 192RR*, *CYP3AP1*1/*1* y *GSTT1*0/*0*).
4. La frecuencia de genotipos de riesgo que contribuyen a una mayor susceptibilidad genética a plaguicidas (*BCHE-KK*, *PON1 -108TT* y *CYP2D6*4/*4*) fue significativamente menor en los trabajadores de invernadero que en los individuos del grupo control, lo cual puede deberse al efecto “trabajador sano”.
5. La frecuencia de haplotipos que no contienen alelos de mayor susceptibilidad genética a plaguicidas es mayor en población marroquí para los SNPs de *BCHE* y en población española para los SNPs de *PON1*.

6. El desequilibrio de ligamiento entre los SNPs rs1803274 (*BCHE-K*) y rs1799807 (*BCHE-A*) es muy alto (tan solo se encontró un individuo KK-UA), mientras que entre los SNPs rs662 (*PON1 Q192R*), rs854560 (*PON1 L55M*) y rs705379 (*PON1 -108C/T*) es bajo.
7. En líneas generales, las frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos seleccionados en la población de estudio (españoles y marroquíes) no son significativamente diferentes a las de europeos y americanos pero sí a las de africanos y asiáticos.
8. Los aductos de ADN N7-MedG y, por tanto, los niveles de alquilación del ADN, en trabajadores de agricultura intensiva fueron significativamente mayores en el período de alta exposición a plaguicidas con respecto al de baja exposición. Eso significa que la exposición a plaguicidas puede producir alquilación del ADN, lo que representa un indicio de genotoxicidad de estos agentes. Además, aquellos trabajadores con genotipos metabólicos de mayor susceptibilidad (genotipo nulo para *GSTM1* y alelo *PON1 192R*) parecen tener un mayor riesgo de daño genotóxico en el ADN.
9. El análisis de estructura poblacional realizado en base a los polimorfismos genéticos estudiados, que no son los marcadores más adecuados para este tipo de estudios, y utilizando el mejor ajuste $K=2$, muestra que los españoles y marroquíes tienen orígenes ancestrales muy parecidos entre sí, comunes a la población europea y muy alejados de la africana.

CONCLUSIONS

1. For the present study, both intensive agricultural workers exposed to pesticides and non-exposed controls were recruited. Recruitment was complex due to two reasons. On the one hand the Mutualls did not allow a health evaluation of their workers. And, on the other hand, that the workers voluntarily agreed to participate. This situation prevented the establishment of a fully homogeneous study group in terms of their ancestral origin. It was necessary to perform different genetic analyzes to evaluate the genetic similarities between the two final study populations (Spanish and Moroccan).
2. The frequency of risk alleles contributing to a greater genetic susceptibility to pesticides was different in the case of the Spanish population (in which PON1 -108T and CYP2D6*4 alleles prevailed) with respect to the Moroccan (where PON1 192R, CYP3A1*1 and GSTT1*0 alleles predominated).
3. The frequency of the risk genotypes that contribute to a greater genetic susceptibility to pesticides were also different in the case of Spaniards (with a significantly higher frequency of the PON1 -108TT genotype) compared to the Moroccans (in which PON1 192RR, CYP3A1*1/*1 and GSTT1*0/*0 genotypes predominated).
4. The frequency of genotypes that contribute to a greater genetic susceptibility to pesticides (BCHE-KK, PON1 -108TT and CYP2D6 *4/*4) was significantly lower in greenhouse workers than in control individuals, which may be due to the "healthy worker" effect.
5. The frequency of haplotypes that do not contain alleles of greater genetic susceptibility to pesticides is higher in the Moroccan population for BCHE SNPs and in Spanish population for PON1 SNPs.

6. The linkage disequilibrium between SNPs rs1803274 (BCHE-K) and rs1799807 (BCHE-A) is very high (only one individual KK-UA was found), but in SNPs rs662 (PON1 Q192R), rs854560 (PON1 L55M) and rs705379 (PON1 -108C/T) is low.
7. Generally speaking, the allelic frequencies of the genetic polymorphisms selected in the study population (Spanish and Moroccan) are not significantly different from those of European and American, but those of Africans and Asians.
8. In intensive agriculture workers, higher pesticide exposure increased N7-MedG DNA adducts and therefore DNA alkylation levels, further demonstrating the genotoxicity of pesticides in man. In addition, pesticide-exposed individuals with inherited susceptible metabolic genotypes (particularly, null genotype for GSTM1 and the PON1 192R allele) appear to have an increased risk of genotoxic DNA damage. In addition, workers carrying susceptible metabolic genotypes (particularly, null genotype for GSTM1 and the PON1 192R allele) appear to have an increased risk of genotoxic DNA damage.
9. The analysis of population structure based on the genetic polymorphisms studied, adjusted to $K=2$, shows that Spaniards and Moroccans have very similar ancestral origins, common to the European population and very far from the African one. The markers used are not the most suitable for this type of studies.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Abass, K. (2010). *Metabolism and interactions of pesticides in human and animal in vitro hepatic models*. Acta Univ. Oul. University of Oulu.
- Abdel-Rahman, S. Z., El-Zein, R. A., Anwar, W. A., y Au, W. W. (1996). A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer letters*, 107(2), 229-33.
- Acladiou, N. N., Harrison, K. L., Sutton, C. J., Povey, A. C., Mandal, D., y Kitchener, H. (2004). Levels of the DNA adduct, N7-methyldeoxyguanosine, are associated with increased risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic oncology*, 93(3), 605-9. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.03.005>
- Acuña, M., Eaton, D. L., Ramírez, N. R., Cifuentes, L., y Llop, E. (2003). Genetic variants of serum butyrylcholinesterase in Chilean Mapuche Indians. *American journal of physical anthropology*, 121(1), 81-5. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10222>
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., y Meyer, R. B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic acids research*, 25(13), 2657-60.
- Agrawal, D., Gupta, S., Agarwal, D., Gupta, O. P., y Agarwal, M. (2010). Role of GSTM1 and GSTT1 polymorphism susceptibility to oral submucous fibrosis in the North Indian population. *Oncology*, 79(3-4), 181-6. <https://doi.org/10.1159/000318533>
- Aldridge, W. (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(1), 110-7.
- Allderdice, P. W., Gardner, H. A. R., Galutira, D., Lockridge, O., Ladu, B. N., y McAlpine, P. J. (1991). The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*, 11(2), 452 <last_page> 454. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90154-7](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90154-7)
- Andre, V., Goff, J. Le, Pottier, D., Lebailly, P., Peluso, M., Munnia, A., y Gauduchon, P. (2007). Evaluation of bulky DNA adduct levels after pesticide use Comparison between open-field farmers and fruit growers. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(1), 125-139. <https://doi.org/10.1080/02772240600952026>
- Angerer, J., Ewers, U., y Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring state of the art. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(3-4), 201-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.024>
- Antikainen, M., Murtomäki, S., Syväne, M., Pahlman, R., Tahvanainen, E., Jauhiainen, M., ... Ehnholm, C. (1996). The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *The Journal of clinical investigation*, 98(4), 883-5. <https://doi.org/10.1172/JCI118869>
- Applied Biosystems. (2010a). *TaqMan® Copy Number Assays Protocol*.
- Applied Biosystems. (2010b). *TaqMan® Genotyping Master Mix*.
- Applied Biosystems. (2011a). *Custom TaqMan® Assay Design Tool*.
- Applied Biosystems. (2011b). *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays for basic and clinical research*.
- Applied Biosystems. (2011c). *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2 X)*.
- Applied Biosystems. (2014). *TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide*. Life Technologies,

MAN0009593, Rev. A.0.

- Araoud, M. (2011). Biological Markers of Human Exposure to Pesticides. En M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment* (pp. 191-212). InTech. <https://doi.org/10.5772/16924>
- Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K. P., Bartels, C. F., La Du, B. N., y Lockridge, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, 29(1), 124-31.
- Arvanitidis, K., Ragia, G., Iordanidou, M., Kyriaki, S., Xanthi, A., Tavridou, A., y Manolopoulos, V. G. (2007). Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundamental & clinical pharmacology*, 21(4), 419-26. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00510.x>
- Au, W. W., Sierra-Torres, C. H., Cajas-Salazar, N., Shipp, B. K., y Legator, M. S. (1999). Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental health perspectives*, 107(6), 501-5.
- Auton, A., Bryc, K., Boyko, A. R., Lohmueller, K. E., Novembre, J., Reynolds, A., ... Bustamante, C. D. (2009). Global distribution of genomic diversity underscores rich complex history of continental human populations. *Genome Research*, 19(5), 795-803. <https://doi.org/10.1101/gr.088898.108>
- Aviram, M., y Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.030>
- Aznar-Sánchez, J. A., Picón, A. S., y Sánchez-Picón, A. (2010). Innovación y distrito en torno a un «milagro» la configuración del sistema productivo local de la agricultura intensiva en Almería. *Revista de historia industrial*, 42(1), 157-193.
- Bajaj, P., Tripathy, R. K., Aggarwal, G., y Pande, A. H. (2014). Human paraoxonase 1 as a pharmacologic agent limitations and perspectives. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 854391. <https://doi.org/10.1155/2014/854391>
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., y Daly, M. J. (2005). Haploview analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2), 263-5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
- Bartels, C. F., Jensen, F. S., Lockridge, O., van der Spek, a F., Rubinstein, H. M., Lubrano, T., y La Du, B. N. (1992). DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American journal of human genetics*, 50(5), 1086-103.
- Bartsch, H. (1996). DNA adducts in human carcinogenesis Etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 340(2-3), 67-79. [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90040-8](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90040-8)
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., Kerr, K. J., y Sanin, L. H. (2007). Cancer health effects of pesticides. *Canadian Family Physician*, 53(10), 1704-1711.
- Beach, A. C., y Gupta, R. C. (1992). Human biomonitoring and the 32 P-postlabeling assay. *Carcinogenesis*, 13(7), 1053-1074. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1053>
- Becerra, A., Bravo, X., Alfredo Tolón, B., Xavier Lastra, B., Tolón, B. A., y Lastra, B. X. (2010). La agricultura intensiva del poniente almeriense. Diagnóstico e instrumentos de gestión ambiental. *M+A. Revista Electrónica de Medioambiente*, 8, 1-22.
- Bedford, C. T., y Robinson, J. (1972). The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 2(4), 307-37.
- Benyamin, B., Middelberg, R. P., Lind, P. A., Valle, A. M., Gordon, S., Nyholt, D. R., ... Whitfield,

- J. B. (2011). GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet*, 20(22), 4504-4514. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr375>
- Bianchini, F., y Wild, C. P. (1994). 7-Methyldeoxyguanosine as a marker of exposure to environmental methylating agents. *Toxicology letters*, 72(1-3), 175-84.
- Billson, H. A., Harrison, K. L., Lees, N. P., Hall, C. N., Margison, G. P., y Povey, A. C. (2009). Dietary variables associated with DNA N7-methylguanine levels and O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity in human colorectal mucosa. *Carcinogenesis*, 30(4), 615-20. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp020>
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Bolt, H. M., y Thier, R. (2006). Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism*, 7(6), 613-628. <https://doi.org/10.2174/138920006778017786>
- Bosch, T. M., Doodeman, V. D., Smits, P. H. M., Meijerman, I., Schellens, J. H. M., y Beijnen, J. H. (2006). Pharmacogenetic screening for polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and drug transporters in a Dutch population. *Molecular diagnosis & therapy*, 10(3), 175-85.
- Boysen, G., Pachkowski, B. F., Nakamura, J., y Swenberg, J. A. (2009). The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutation research*, 678(2), 76-94. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.006>
- Bozina, N., Bradamante, V., y Lovrić, M. (2009). Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60(2), 217-42. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1885>
- Braun, R., Schöneich, J., Weissflog, L., y Dedek, W. (1982). Activity of organophosphorus insecticides in bacterial tests for mutagenicity and DNA repair — Direct alkylation vs. metabolic activation and breakdown. I. Butonate, vinylbutonate, trichlorfon, dichlorvos, demethyl dichlorvos and demethyl vinylbutonate. *Chemico-Biological Interactions*, 39(3), 339-350. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(82\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(82)90050-3)
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., y Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators a review. *Mutagenesis*, 21(2), 93-103. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel011>
- Cataño, H. C., Carranza, E., Huamaní, C., y Hernández, A. F. (2008). Plasma cholinesterase levels and health symptoms in peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(1), 153-159. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9095-0>
- Cataño, H. C., Cueva, J. L., Cardenas, A. M., Izaguirre, V., Zavaleta, A. I., Carranza, E., y Hernández, A. F. (2006). Distribution of paraoxonase-1 gene polymorphisms and enzyme activity in a Peruvian population. *Environmental and molecular mutagenesis*, 47(9), 699-706. <https://doi.org/10.1002/em.20259>
- Chen, C. L., Liu, Q., y Relling, M. V. (1996). Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, 6(2), 187-191.
- Chiurillo, M. A., Griman, P., Santiago, L., Torres, K., Moran, Y., y Borjas, L. (2013). Distribution of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 disease-associated gene variants in native and urban Venezuelan populations. *Gene*, 531(1), 106-11. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.055>
- Cho, H.-J., Lee, S.-Y., Ki, C.-S., y Kim, J.-W. (2005). GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in the Korean population. *Journal of Korean medical science*, 20(6), 1089-92.

- Christiani, D. C., Mehta, A. J., y Yu, C.-L. (2008). Genetic susceptibility to occupational exposures. *Occupational and environmental medicine*, 65(6), 430-6, 397. <https://doi.org/10.1136/oem.2007.033977>
- Chronopoulou, E. G., y Labrou, N. E. (2009). Glutathione transferases emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Recent patents on biotechnology*, 3(3), 211-23. <https://doi.org/10.2174/187220809789389135>
- Clarke, S. E. (1998). In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 28(12), 1167-202. <https://doi.org/10.1080/004982598238877>
- Clendenning, J. B., Humbert, R., Green, E. D., Wood, C., Traver, D., y Furlong, C. E. (1996). Structural organization of the human PON1 gene. *Genomics*, 35(3), 586-9. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0401>
- Costa, L. G., y Eaton, D. L. (2006). *Gene-environment interactions Fundamentals of ecogenetics*. (L. G. Costa y D. L. Eaton, Eds.). Hoboken, N.J. John Wiley.
- Costa, L. G., Giordano, G., Cole, T. B., Marsillach, J., y Furlong, C. E. (2013). Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*, 307, 115-22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.011>
- Crosbie, P. A. J., Harrison, K., Shah, R., Watson, A. J., Agius, R. M., Barber, P. V., ... Povey, A. C. (2013). Topographical study of O(6)-alkylguanine DNA alkyltransferase repair activity and N7-methylguanine levels in resected lung tissue. *Chemico-biological interactions*, 204(2), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.04.013>
- Crosbie, P. A. J., Watson, A. J., Agius, R. M., Barber, P. V., Margison, G. P., y Povey, A. C. (2012). Elevated N3-methylpurine-DNA glycosylase DNA repair activity is associated with lung cancer. *Mutation research*, 732(1-2), 43-6. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.01.001>
- da Silva, J., Moraes, C. R., Heuser, V. D., Andrade, V. M., Silva, F. R., Kvitko, K., ... Erdtmann, B. (2008). Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis*, 23(5), 415-22. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen031>
- Damalas, C. A., y Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-19. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- Dardiotis, E., Xiromerisiou, G., Hadjichristodoulou, C., Tsatsakis, A. M., Wilks, M. F., y Hadjigeorgiou, G. M. (2013). The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility the evidence for pesticides. *Toxicology*, 307, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.016>
- Deakin, S., Leviev, I., Gomaschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., y James, R. W. (2002). Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4301-4308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107440200>
- Dedek, W., Grahl, R., y Schmidt, R. (1984). A comparative study of guanine N7-alkylation in mice in vivo by the organophosphorus insecticides trichlorphos, dimethoate, phosmet and bromophos. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 55(2), 104-9.
- Denzoin, L., Soraci, A. L., y Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. En *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* (Vol. 47, pp. 529-39). La Plata.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., ... Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*, 3(11), 1389-407. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.004>
- Draganov, D. I., y La Du, B. N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases A brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1>

- Du, L., Wang, H., Xu, W., Zeng, Y., Hou, Y., Zhang, Y., ... Sun, C. (2013). Application of ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry-based metabonomic techniques to analyze the joint toxic action of long-term low-level exposure to a mixture of organophosphate pesticides on rat urine profile. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, 134(1), 195-206. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft091>
- DURVIZ SL. (2013). REALPURE «SSS» Kit. Valencia, Spain.
- Duysen, E. G., Li, B., Darvesh, S., y Lockridge, O. (2007). Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology*, 233(1-3), 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.069>
- Eaton, D. L., y Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49(2), 156-164. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.156>
- Eckerson, H. W., Wyte, C. M., y La Du, B. N. (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American journal of human genetics*, 35, 1126-1138.
- Elbaz, A., Levecque, C., Clavel, J., Vidal, J.-S., Richard, F., Amouyel, P., ... Tzourio, C. (2004). CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 55(3), 430-4. <https://doi.org/10.1002/ana.20051>
- Esteller, M., García, A., Martínez-Palones, J. M., Xercavins, J., y Reventós, J. (1997). Susceptibility to endometrial cancer influence of allelism at p53, glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and cytochrome P-450 (CYP1A1) loci. *British journal of cancer*, 75(9), 1385-8.
- Estivill, X., y Armengol, L. (2007). Copy number variants and common disorders filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS genetics*, 3(10), 1787-99. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030190>
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Fernandez-Santander, A., Kandil, M., Luna, F., Esteban, E., Gimenez, F., Zaoui, D., y Moral, P. (1999). Genetic relationships between southeastern Spain and Morocco New data on ABO, RH, MNSS, and DUFFY polymorphisms. *Am J Hum Biol*, 11(6), 745-752. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6300\(199911/12\)116<745AID-AJHB4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(199911/12)116<745AID-AJHB4>3.0.CO;2-W)
- Fernandez-Santander, A., Kandil, M., Luna, F., y Moral, P. (2002). Twenty Nuclear DNA Polymorphisms in a Moroccan Population A Comparison with Seven Other Human Populations. *Human Biology*, 74(5), 695-706. <https://doi.org/10.1353/hub.2002.0056>
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2), 55-75.
- Foxenberg, R. J., McGarrigle, B. P., Knaak, J. B., Kostyniak, P. J., y Olson, J. R. (2007). Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(2), 189-193. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012427>
- Fridman, O., Fuchs, A. G., Porcile, R., Morales, A. V., y Gariglio, L. O. (2011). Paraoxonasa Sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Archivos de Cardiología de Mexico*.
- Fujihara, J., Yasuda, T., Kawai, Y., Morikawa, N., Arakawa, K., Koda, Y., ... Takeshita, H. (2011). First survey of the three gene polymorphisms (PON1 Q192R, eNOS E298D and eNOS C-786T) potentially associated with coronary artery spasm in African populations and comparison with worldwide data. *Cell biochemistry and function*, 29(2), 156-63. <https://doi.org/10.1002/cbf.1721>
- Fujioka, K., y Casida, J. E. (2007). Glutathione S -Transferase Conjugation of Organophosphorus

- Pesticides Yields S -Phospho- , S -Aryl- , and S -Alkylglutathione Derivatives, 1211-1217.
- Furlong, C. E. (2007). Genetic variability in the cytochrome P450-paraoxonase 1 (PON1) pathway for detoxication of organophosphorus compounds. *J Biochem Mol Toxicol*, 21(4), 197-205.
- Furlong, C. E., Marsillach, J., Jarvik, G. P., y Costa, L. G. (2016). Paraoxonases-1, -2 and -3 What are their functions? *Chemico-Biological Interactions*, 259, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.036>
- Furlong, M. A., Engel, S. M., Barr, D. B., y Wolff, M. S. (2014). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and reciprocal social behavior in childhood. *Environment international*, 70, 125-31. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.011>
- Furtado, L., Souza, R. L. R., Tsuneto, L. T., Petzl-Erler, M. L., y Chautard-Freire-Maia, E. A. (2006). Butyrylcholinesterase genetic variability in Guarani Amerindians from the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 8-13. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100002>
- Gaffney, D., y Campbell, R. A. (1994). A PCR based method to determine the Kalow allele of the cholinesterase gene the E1k allele frequency and its significance in the normal population. *Journal of medical genetics*, 31(3), 248-250.
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W., y La Du, B. N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 19(1), 100-106.
- Garaj-Vrhovac, V., y Zeljezic, D. (2000). Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(2), 279-285. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00092-9)
- Gayán, J., Galán, J. J., Gonzalez-Perez, A., Saez, M. E., Martínez-Larrad, M. T., Zabena, C., ... Serrano-Rios, M. (2010). Genetic structure of the Spanish population. *BMC Genomics*, 11, 326. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-326>
- Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J. C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., ... de Waziers, I. (1999). Human CYP2B6 expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*, 9(3), 295-306. <https://doi.org/10.1097/00008571-199906000-00004>
- Ginsberg, G., Smolenski, S., Hattis, D., Guyton, K. Z., Johns, D. O., y Sonawane, B. (2009). Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST) Population Distribution of GSTM1, T1, and P1 Conjugating Activity . *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 12(5), 389-439. <https://doi.org/10.1080/10937400903158375>
- Goldstein, J. A., Ishizaki, T., Chiba, K., de Morais, S. M., Bell, D., Krahn, P. M., y Evans, D. A. (1997). Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics*, 7(1), 59-64.
- Gómez-Martín, A., Altakroni, B., Lozano-Paniagua, D., Margison, G. P., de Vocht, F., Povey, A. C., y 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56, 437-445. <https://doi.org/10.1002/em.21929>
- Gómez-Martín, A., Hernández, A. F., Martínez-González, L. J., González-Alzaga, B., Rodríguez-Barranco, M., López-Flores, I., ... Lacasana, M. (2015). Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere*, 139, 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.079>
- González-Alzaga, B., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Rodríguez-Barranco, M., Ballester, F., Rebagliato, M., y Hernández, A. F. (2014). A systematic review of neurodevelopmental effects

- of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicology Letters*, 230(2), 104-121. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.019>
- González, M. V., Alvarez, V., Pello, M. F., Menéndez, M. J., Suárez, C., y Coto, E. (1998). Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *Journal of clinical pathology*, 51(4), 294-8.
- Goodall, R. (2004). Cholinesterase phenotyping and genotyping. *Ann Clin Biochem*, 41, 98-9110.
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., y Wu, L. (2011). *Pesticides Industry Sales and Usage 2006 and 2007 Market Estimates*. Washington D.C.
- Hanioka, N., Kimura, S., Meyer, U. A., y Gonzalez, F. J. (1990). The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet.*, 47(6), 994-1001.
- Hanke, W., y Jurewicz, J. (2004). The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure an overview of current epidemiological evidence. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 17(2), 223-43.
- Haque, K. a, Pfeiffer, R. M., Beerman, M. B., Struewing, J. P., Chanock, S. J., y Bergen, A. W. (2003). Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC biotechnology*, 3, 20. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-20>
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., ... Tawfik, D. S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature structural & molecular biology*, 11(5), 412-419. <https://doi.org/10.1038/nsmb767>
- Harel, M., Brumshtein, B., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B. G., McCarthy, A., ... Sussman, J. L. (2007). 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 58(3), 347-353. <https://doi.org/10.2478/v10004-007-0028-0>
- Harris, H., y Whittaker, M. (1961). Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride recognition of two new phenotypes. *Nature*, 191, 496-498.
- Harrison, K. L., Wood, M., Lees, N. P., Hall, C. N., Margison, G. P., y Povey, A. C. (2001). Development and application of a sensitive and rapid immunoassay for the quantitation of N7-methyldeoxyguanosine in DNA samples. *Chemical research in toxicology*, 14(3), 295-301.
- Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinski, C. J., y Furlong, C. E. (1991). Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 30(42), 10141-10149. <https://doi.org/10.1021/bi00106a010>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., y Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45, 51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Heagerty, A., Smith, A., English, J., Lear, J., Perkins, W., Bowers, B., ... Strange, R. C. (1996). Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *British journal of cancer*, 73(1), 44-8.
- Hernández, A. F., Casado, I., Pena, G., Gil, F., Villanueva, E., y Pla, A. (2008). Low level of exposure to pesticides leads to lung dysfunction in occupationally exposed subjects. *Inhalation toxicology*, 20(9), 839-849. <https://doi.org/10.1080/08958370801905524>
- Hernández, A. F., Gil, F., Lacasaña, M., Rodríguez-Barranco, M., Gómez-Martín, A., Lozano, D., y Pla, A. (2013). Modulation of the endogenous antioxidants paraoxonase-1 and urate by

- pesticide exposure and genetic variants of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 164-70. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.039>
- Hernández, A. F., Gómez, A. M., Perez, V., Garcia-Lario, J. V, Pena, G., Gil, F., ... López, O. (2006). Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environmental research*, 102(1), 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.03.002>
- Hernández, A. F., Gómez, M. A., Pena, G., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., y Pla, A. (2004). Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 67(14), 1095-1108. <https://doi.org/10.1080/15287390490452371>
- Hernández, A. F., Gonzalvo, M. C., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., y Pla, A. (1999). Distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in a Spanish population. *Chemico-biological interactions*, 119-120(0), 201-209. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00029-0)
- Hernández, A. F., López, O., Gil, F., Rodrigo, L., Pla, A., y Lopez, O. (2006). Biomonitorización de trabajadores con exposición crónica a plaguicidas. Importancia de las esterases sanguíneas. *La Mutua*, 16, 35-50.
- Hernández, A. F., Lopez, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., ... López, O. (2005). Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology letters*, 159(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.04.008>
- Hernández, A. F., Mackness, B., Rodrigo, L., López, O., Pla, A., Gil, F., ... Lopez, O. (2003). Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Human & Experimental Toxicology*, 22(11), 565-574. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht400oa>
- Hernández, A. F., Parrón, T., y Alarcón, R. (2011). Pesticides and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(2), 90-6. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3283445939>
- Hernández, A. F., Parrón, T., Serrano, J. L., y Marin, P. (2010). Epidemiological studies Spain. En T. Satoh y R. C. Gupta (Eds.), *Anticholinesterase pesticides metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (Vol. Satoh,T.;G, pp. 495-508). John Wiley & Sons, Hoboken.
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., y López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136-45. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>
- Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., y Vainio, H. (1993). The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*, 14(7), 1479-81.
- Hodgson, E. (2003). In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I pesticides and related compounds used in agriculture and public health, May 2003. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(4), 201-6. <https://doi.org/10.1002/jbt.10080>
- Hodgson, E. (2010). *A Textbook of Modern Toxicology*. (E. Hodgson, Ed.) (4th Editio). New Jersey John Wiley & Sons.
- Holmes, C., Ballard, C., Lehmann, D., David Smith, A., Beaumont, H., Day, I. N., ... Warden, D. (2005). Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease effect of butyrylcholinesterase K gene variation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 76(5), 640-643. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.039321>
- Howard, T. D., Hsu, F.-C., Grzywacz, J. G., Chen, H., Quandt, S. a, Vallejos, Q. M., ... Arcury, T. A. (2010). Evaluation of candidate genes for cholinesterase activity in farmworkers exposed to

- organophosphorus pesticides association of single nucleotide polymorphisms in BCHE. *Environmental health perspectives*, 118(10), 1395-9. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901764>
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., y Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 496-526. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
- Jahnke, V., Matthias, C., Fryer, A., y Strange, R. (1996). Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *American journal of surgery*, 172(6), 671-3.
- Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., y Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG - A widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3), 689-692. <https://doi.org/10.1110/ps.8.3.689>
- Jensen, F. S., Nielsen, L. R., y Schwartz, M. (1996). Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. *Human heredity*, 46(1), 26-31.
- Jensen, F. S., Skovgaard, L. T., y Viby-Mogensen, J. (1995). Identification of human plasma cholinesterase variants in 6,688 individuals using biochemical analysis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 39(2), 157-162.
- Ji, G., Gu, A., Wang, Y., Huang, C., Hu, F., Zhou, Y., ... Wang, X. (2012). Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free radical biology & medicine*, 52(4), 775-80. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.032>
- Jiménez Díaz, J. F. (2008). Estudio de caso del Poniente almeriense. Glocalización de la horticultura. *Papers revista de sociologia*, (90), 83-104.
- Jiménez Guerrero, J. F., y Guerrero, J. F. J. (2010). Informe Económico Provincial ALMERÍA EN CIFRAS 2009.
- Jintana, S., Sming, K., Krongtong, Y., y Thanyachai, S. (2009). Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 82(7), 833-842. <https://doi.org/10.1007/s00420-009-0422-9>
- Jourenkova, N., Reinikanen, M., Bouchardy, C., Husgafvel-Pursiainen, K., Dayer, P., Benhamou, S., y Hirvonen, A. (1997). Effects of glutathione S-transferases GSTM1 and GSTT1 genotypes on lung cancer risk in smokers. *Pharmacogenetics*, 7(6), 515-8.
- Kalow, W., y Lindsay, H. A. (1955). A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 33(4), 568-574.
- Kalow, W., y Staron, N. (1957). On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 35(12), 1305-1320.
- Kanavouras, K., Tzatzarakis, M. N., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., y Tsatsakis, A. M. (2011). A case report of motor neuron disease in a patient showing significant level of DDTs, HCHs and organophosphate metabolites in hair as well as levels of hexane and toluene in blood. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 399-404. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.07.022>
- Kapka-Skrzypczak, L., Cyranka, M., Skrzypczak, M., y Kruszewski, M. (2011). Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. *Annals of agricultural and environmental medicine AAEM*, 18(2), 294-303.
- Kelsey, K. T., Spitz, M. R., Zuo, Z. F., y Wiencke, J. K. (1997). Polymorphisms in the glutathione

- S-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer causes & control CCC*, 8(4), 554-9.
- Khan, O. A., Gore, M., Lorigan, P., Stone, J., Greystoke, A., Burke, W., ... Middleton, M. R. (2011). A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, 104(5), 750-5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.8>
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., y Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of nucleic acids*, 2010, 543531. <https://doi.org/10.4061/2010/543531>
- Kuang, X. Y., Zhou, Z. J., Ma, X. X., Yao, F., Wu, Q. E., y Chen, B. (2006). Activity of esterases and effect of genetic polymorphism in workers exposed to organophosphorus pesticides. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*, 24(6), 333-336.
- Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., ... Schuetz, E. G. (2001). Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature genetics*, 27(4), 383-391. <https://doi.org/10.1038/86882>
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. a, Mills, a, Gorn, V. V, Lukhtanov, E. a, Belousov, E. S., ... Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research*, 28(2), 655-61.
- Kutyavin, I. V, Lukhtanov, E. a, Gamper, H. B., y Meyer, R. B. (1997). Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic acids research*, 25(18), 3718-23.
- La Du, B. N., Bartels, C. F., Nogueira, C. P., Arpagaus, M., Lockridge, O., y Du, B. N. La. (1991). Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cellular and molecular neurobiology*, 11(1), 79-89.
- Laborde, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death and differentiation*, 17(9), 1373-1380. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.80>
- Lakowicz, J. R. (1983). Energy Transfer. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Third Edit, pp. 303-339). New York Plenum Press.
- Lamba, J. K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G., y Thummel, K. E. (2002). Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism . *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(10), 1271-1294.
- Lampe, J. W. (2007). Diet, genetic polymorphisms, detoxification, and health risks. *Alternative therapies in health and medicine*, 13(2), S108-11.
- Le Goff, J., André, V., Lebailly, P., Pottier, D., Périn, F., Périn, O., y Gauduchon, P. (2005). Seasonal variations of DNA-adduct patterns in open field farmers handling pesticides. *Mutation research*, 587(1-2), 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.05.013>
- Lees, N. P., Harrison, K. L., Hall, C. N., Margison, G. P., y Povey, A. C. (2007). Human colorectal mucosal O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity and DNA-N7-methylguanine levels in colorectal adenoma cases and matched referents. *Gut*, 56(3), 380-4. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.097899>
- Leviev, I., y James, R. W. (2000). Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(2), 516-521. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.2.516>
- Leviev, I., Negro, F., y James, R. W. (1997). Two Alleles of the Human Paraoxonase Gene Produce Different Amounts of mRNA An Explanation for Differences in Serum Concentrations of Paraoxonase Associated With the (Leu-Met54) Polymorphism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(11), 2935-2939. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.11.2935>

- Lewalter, J., y Leng, G. (1999). Consideration of individual susceptibility in adverse pesticide effects. *Toxicol Lett*, 107(1-3), 131-144.
- Lewis, S. J., Cherry, N. M., Niven, R. M., Barber, P. V, y Povey, A. C. (2004). Associations between smoking, GST genotypes and N7-methylguanine levels in DNA extracted from bronchial lavage cells. *Mutation research*, 559(1-2), 11-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.11.011>
- Li, B., Duysen, E. G., y Lockridge, O. (2008). The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 88-91. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.03.009>
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P., y Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, 70(11), 1673-1684. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.002>
- Li, J. Z., Absher, D. M., Tang, H., Southwick, A. M., Casto, A. M., Ramachandran, S., ... Myers, R. M. (2008). Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), 1100-4. <https://doi.org/10.1126/science.1153717>
- Lie, Y. S., y Petropoulos, C. J. (1998). Advances in quantitative PCR technology 5' nuclease assays. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(1), 43-48. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80082-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80082-7)
- Lima, J. K., Leite, N., Turek, L. V., Souza, R. L. R., da Silva Timossi, L., Osiecki, A. C. V., ... Furtado-Alle, L. (2013). 1914G variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglyceride levels. *Gene*, 532(1), 24-6. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.068>
- Lin, I.-H., Chao, M.-R., Hu, C.-W., Ho, M.-L., Huang, J.-Y., Lee, H.-S., ... Wong, R.-H. (2009). Modification of urinary N7-methylguanine excretion in smokers by glutathione-S-transferase M1 polymorphism. *Toxicology*, 260(1-3), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.02.015>
- Liska, D., Lyon, M., y Jones, D. S. (2006). Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore The Journal of Science and Healing*, 2(2), 122-140. <https://doi.org/10.1016/j.explore.2005.12.009>
- Liu, Y.-J., Huang, P.-L., Chang, Y. F., Chen, Y. H., Chiou, Y. H., Xu, Z. L., y Wong, R. H. (2006). GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(4), 659-666. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0617>
- Lockridge, O. (1992). Genetic variants of human butyrylcholinesterase influence the metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. En W. Kalow (Ed.), *Pharmacogenetics of Drug Metabolism. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. (pp. 15-50). New York Pergamon Press.
- Lockridge, O., y Masson, P. (2000). Pesticides and susceptible populations people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 113-126.
- Loft, S., Svoboda, P., Kasai, H., Tjønneland, A., Møller, P., Sørensen, M., ... Raaschou-Nielsen, O. (2007). Prospective study of urinary excretion of 7-methylguanine and the risk of lung cancer Effect modification by mu class glutathione-S-transferases. *International journal of cancer*, 121(7), 1579-84. <https://doi.org/10.1002/ijc.22863>
- Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., ... Marcos, R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation research*, 464(2), 255-62.
- Mackness, B., Durrington, P. N., y Mackness, M. I. (1998). Human serum paraoxonase. *General pharmacology*, 31(3), 329-336. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00028-7)
- Mackness, M. I., Arrol, S., y Durrington, P. N. (1991). Paraoxonase prevents accumulation of

- lipoperoxides in low-density lipoprotein, *286*(1), 152-154.
- Mackness, M. I., y Mackness, B. (2015). Human paraoxonase-1 (PON1) Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*, *567*(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.088>
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., y Jörnvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(21), 7202-7206. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7202>
- Mannervik, B., Awasthi, Y. C., Broad, P. G., Hayes, J. D., Di Ilio, C., Ketterer, B., ... Pearson, W. R. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*, *282*, 305-306. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01760.x>
- Manoharan, I., Wieseler, S., Layer, P. G., Lockridge, O., y Boopathy, R. (2006). Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Pharmacogenetics and genomics*, *16*(7), 461-8. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000197464.37211.77>
- Manzano-Aglugliaro, F. (2007). Gasification of greenhouse residues for obtaining electrical energy in the south of Spain localization by GIS. *INCI*, *32*(2), 131-136.
- Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltrán, R., Joven, J., y Camps, J. (2008). Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(2), 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.023>
- Masimirembwa, C. M., Dandara, C., Sommers, D. K., Snyman, J. R., y Hasler, J. A. (1998). Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1, microsomal epoxide hydrolase, and glutathione S-transferases M1 and T1 in Zimbabweans and Venda of southern Africa. *Pharmacogenetics*, *8*(1), 83-5.
- Mazur, A. (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J. Biol. Chem.*, *164*(1), 271-289.
- McGlynn, K. A., Rosvold, E. A., Lustbader, E. D., Hu, Y., Clapper, M. L., Zhou, T., ... Ofori-Adjei, D. (1995). Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(6), 2384-7.
- McGuire, M. C., Nogueira, C. P., Bartels, C. F., Lightstone, H., Hajra, A., der Spek, A. F. Van, ... La Du, B. N. (1989). Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(3), 953-957.
- McMaster, M. L., Kristinsson, S. Y., Turesson, I., Bjorkholm, M., y Landgren, O. (2010). Genotype-Based Matching to Correct for Population Stratification in Large-Scale Case-Control Genetic Association Studies. *Clinical Lymphoma*, *9*(1), 19-22. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>
- Mehl, a, Schanke, T. M., Johnsen, B. a, y Fønnum, F. (1994). The effect of trichlorfon and other organophosphates on prenatal brain development in the guinea pig. *Neurochemical research*, *19*(5), 569-74.
- Mikelsaar, A. V., Tasa, G., Pärlist, P., y Uusküla, M. (1994). Human glutathione S-transferase GSTM1 genetic polymorphism in Estonia. *Human heredity*, *44*(5), 248-51.
- Mollerup, H. M., Gatke, M. R., y Gätke, M. R. (2011). Butyrylcholinesterase gene mutations in patients with prolonged apnea after succinylcholine for electroconvulsive therapy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *55*(1), 82-86. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2010.02316.x>

- Moorthy, B., Chu, C., y Carlin, D. J. (2015, mayo). Polycyclic aromatic hydrocarbons From metabolism to lung cancer. *Toxicological Sciences*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>
- Moreira, A., Martins, G., Monteiro, M. J., Alves, M., Dias, J., da Costa, J. D., ... Monteiro, C. (1996). Glutathione S-transferase mu polymorphism and susceptibility to lung cancer in the Portuguese population. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 16(5), 269-74. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(1996\)165<269AID-TCM3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(1996)165<269AID-TCM3>3.0.CO;2-G)
- Mostafalou, S., y Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), 157-77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Mostafalou, S., y Abdollahi, M. (2016). Pesticides an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 1-51. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R., y Motulsky, A. G. (1983). Plasma paraoxonase polymorphism a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. *Am J Hum Genet*, 35(3), 393-408.
- Mutch, E., y Williams, F. M. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology*, 224(1-2), 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.024>
- Naoe, T., Takeyama, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Seto, M., Uike, N., ... Ohno, R. (2000). Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/ myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(10), 4091-5.
- Nassar, A. F., Hollenberg, P. F., y Scatina, J. (2008). *Drug Metabolism Handbook Concepts and Applications*. *Drug Metabolism Handbook Concepts and Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780470439265>
- Nebert, D. W. (2005). Role of host susceptibility to toxicity and cancer caused by pesticides Cytochromes P450. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(3), 184-186. <https://doi.org/10.1002/jbt.20080>
- Negrão, A. B., Pereira, A. C., Guindalini, C., Santos, H. C., Messas, G. P., Laranjeira, R., y Vallada, H. (2013). Butyrylcholinesterase Genetic Variants Association with Cocaine Dependence and Related Phenotypes. *PLoS ONE*, 8(11), e80505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080505>
- Nelis, M., Esko, T., Mägi, R., Zimprich, F., Zimprich, A., Toncheva, D., ... Metspalu, A. (2009). Genetic structure of Europeans a view from the North-East. *PloS one*, 4(5), e5472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005472>
- Nelson, D. R. (2009). The cytochrome p450 homepage. *Human genomics*, 4(1), 59-65. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-1-59>
- Ng, M. C. Y., Wang, Y., So, W.-Y., Cheng, S., Visvikis, S., Zee, R. Y. L., ... Chan, J. C. N. (2004). Ethnic differences in the linkage disequilibrium and distribution of single-nucleotide polymorphisms in 35 candidate genes for cardiovascular diseases. *Genomics*, 83(4), 559-65. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.008>
- Nus, M., Sánchez-Muniz, F. J., y Sánchez-Montero, J. M. (2008). Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74(1), 5-27.
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138-151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Oakley, A. J. (2005). Glutathione transferases New functions. *Current Opinion in Structural Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.005>

- Okkels, H., Sigsgaard, T., Wolf, H., y Autrup, H. (1996). Glutathione S-transferase mu as a risk factor in bladder tumours. *Pharmacogenetics*, 6(3), 251-6.
- Omura, Tsuneco; Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370-2378.
- Oude Ophuis, M. B., van Lieshout, E. M., Roelofs, H. M., Peters, W. H., y Manni, J. J. (1998). Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*, 82(5), 936-43.
- Parrón, T., Hernández, A. F., y Villanueva, E. (1996). Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic science international*, 79(1), 53-63.
- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F., y Alarcón, R. (2011). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.006>
- Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F., y Alarcón, R. (2013). Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicology letters*. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.009>
- Paulussen, A., Lavrijsen, K., Bohets, H., Hendrickx, J., Verhasselt, P., Luyten, W., ... Armstrong, J. M. (2000). Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans. *Pharmacogenetics*, 10(5), 415-424.
- Paz-y-Miño, C., Arévalo, M., Sanchez, M. E., y Leone, P. . (2004). Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 562(1), 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.05.005>
- Peck, E. C., y Eaton, D. L. (2010). *Genetic Polymorphism and Susceptibility to Pesticides*. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edit, Vol. Volume 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00017-3>
- Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M. J., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., ... Quintanilla-Vega, B. (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and applied pharmacology*, 230(2), 261-8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.021>
- Phuntuwate, W., Suthisisang, C., Koanantakul, B., Mackness, M. I., y Mackness, B. (2005). Paraoxonase 1 status in the Thai population. *Journal of human genetics*, 50(6), 293-300. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0255-7>
- Pimenoff, V. N., Laval, G., Comas, D., Palo, J. U., Gut, I., Cann, H. M., ... Sajantila, A. (2012). Similarity in recombination rate and linkage disequilibrium at CYP2C and CYP2D cytochrome P450 gene regions among Europeans indicates signs of selection and no advantage of using tagSNPs in population isolates. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(12), 846-57. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835a3a6d>
- Playfer, J. R., Eze, L. C., Bullen, M. F., y Evans, D. a. (1976). Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paroxonase activity. *Journal of medical genetics*, 13(5), 337-342. <https://doi.org/10.1136/jmg.13.5.337>
- Podoly, E., Shalev, D. E., Shenhar-Tsarfaty, S., Bennett, E. R., Assayag, E. B., Wilgus, H., ... Soreq, H. (2009). The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17170-17179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004952>

- Poirier, M. C., y Weston, a. (1996). Human DNA adduct measurements state of the art. *Environmental health perspectives*, 104 Suppl(October), 883-93.
- Povey, A. C. (2010). Gene-environmental interactions and organophosphate toxicity. *Toxicology*, 278(3), 294-304. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.007>
- Prieto-Fernández, E., Díaz-De Usera, A., Baeta, M., Núñez, C., Chbel, F., Nadifi, S., ... De Pancorbo, M. M. (2016). A genetic overview of Atlantic coastal populations from Europe and North-West Africa based on a 17 X-STR panel. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.011>
- Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J., y La Du, B. N. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33(3), 498-507.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-59.
- Ray, D. E., y Richards, P. G. (2001). The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*, 120(1-3), 343-351. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00266-1)
- Reddy, S. T., Devarajan, A., Bourquard, N., Shih, D., y Fogelman, A. M. (2008). Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Current opinion in lipidology*, 19(4), 405-8. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328304b64e>
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., ... Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444-54. <https://doi.org/10.1038/nature05329>
- Richter, R. J., Jarvik, G. P., y Furlong, C. E. (2009). Paraoxonase 1 (PON1) Status and Substrate Hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 235(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.11.001>.Paraoxonase
- Rojas-García, A. E., Solís-Heredia, M. J., Piña-Guzmán, B., Vega, L., López-Carrillo, L., y Quintanilla-Vega, B. (2005). Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicology and applied pharmacology*, 205(3), 282-9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.015>
- Rosenberg, N. A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M. W., Freidlin, P. J., Groenen, M. A., ... Weigend, S. (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 159(2), 699-713.
- Rossini, A., Rapozo, D. C. M., Amorim, L. M. F., M B Macedo, J., Medina, R., F N Neto, J., ... F R Pinto, L. (2002). Polymorphisms in a Brazilian population, 1(3), 233-240.
- Rubinstein, H. M., Dietz, A. A., y Lubrano, T. (1978). E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *Journal of medical genetics*, 15(1), 27-29.
- Saffhill, R., Margison, G. P., y O'Connor, P. J. (1985). Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochimica et biophysica acta*, 823(2), 111-45.
- Santella, R. M. (2006). Approaches to DNA/RNA Extraction and whole genome amplification. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(9), 1585-7. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0631>
- Santos, P. C. J. L., Soares, R. A. G., Santos, D. B. G., Nascimento, R. M., Coelho, G. L. L. M., Nicolau, J. C., ... Pereira, A. C. (2011). CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC medical genetics*, 12, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-13>
- Sarmanová, J., Tynková, L., Süsová, S., Gut, I., y Soucek, P. (2000). Genetic polymorphisms of

- biotransformation enzymes allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics*, 10(9), 781-8.
- Schroeder, J. C. (2005). Metabolic susceptibility to agricultural pesticides and non-Hodgkin's lymphoma. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*.
- Sen-Banerjee, S., Siles, X., y Campos, H. (2000). Tobacco Smoking Modifies Association Between Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene and Risk of Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(9), 2120-2126. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.9.2120>
- Seow, A., Yuan, J.-M., Sun, C.-L., Van Den Berg, D., Lee, H.-P., y Yu, M. C. (2002). Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*, 23(12), 2055-61.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., y Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 1-16. <https://doi.org/10.1042/0264-60213600001>
- Shen, J., Lin, G., Yuan, W., Tan, J., Bolt, H. M., y Thier, R. (1998). Glutathione transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai. *Archives of toxicology*, 72(7), 456-8.
- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., y Sirotkin, K. (2001). dbSNP the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1), 308-11. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>
- Shi, Y., Xiang, P., Li, L., y Shen, M. (2011). Analysis of 50 SNPs in CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 and CYP1A2 by MALDI-TOF mass spectrometry in Chinese Han population. *Forensic science international*, 207(1-3), 183-7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.004>
- Shibuta, K., Abe, M., y Suzuki, T. (1994). A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *Journal of medical genetics*, 31(7), 576-579.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., y Guengerich, F. P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 270(1), 414-23.
- Shin, B.-S. (2009). Paraoxonase gene polymorphism in south-western Korean population. *Journal of Korean medical science*, 24(4), 561-6. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.4.561>
- Sigma-Aldrich. (2012). Primers and Fluorescent Probes. Recuperado 24 de junio de 2014, a partir de http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.pdf
- Silbergeld, E. K. (2001). TOXICOLOGIA. En *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (3.ª ed., Vol. 3, p. 32.1-33.83). Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Sim, S. C., y Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human genomics*, 4(4), 278-81. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-4-278>
- Sim, S. C., y Ingelman-Sundberg, M. (2013). Update on Allele Nomenclature for Human Cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-Allele) Nomenclature Database (pp. 251-259). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-321-3_21
- Singh, S. (2015). Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2566-x>

- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., Grover, S. S., ... Rai, A. (2012). Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutation research*, 741(1-2), 101-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.001>
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., ... Rai, A. (2011). Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutation research*, 725(1-2), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.06.006>
- Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., Grover, S. S., ... Rai, A. (2011). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology and applied pharmacology*, 252(2), 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.014>
- Singh, S., Kumar, V., Vashisht, K., Singh, P., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., ... Rai, A. (2011). Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6 and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology and applied pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.021>
- Sistonen, J., Sajantila, A., Lao, O., Corander, J., Barbujani, G., y Fuselli, S. (2007). CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenetics and genomics*, 17(2), 93-101. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000239974.69464.f2>
- Smith, D. A., Abel, S. M., Hyland, R., y Jones, B. C. (1998). Human cytochrome P450s selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 28(12), 1095-128. <https://doi.org/10.1080/004982598238859>
- Souza, R. L., Castro, R. M., Pereira, L., Freund, A. A., Culp, L., y Chautard-Freire-Maia, E. A. (1998). Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Human biology*, 70(5), 965-70.
- Souza, R. L. R., Mikami, L. R., Maegawa, R. O. B., y Chautard-Freire-Maia, E. a. (2005). Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Molecular genetics and metabolism*, 84(4), 349-53. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.12.005>
- Stocks, S. J., Agius, R. M., Cooley, N., Harrison, K. L., Brison, D. R., Horne, G., ... Povey, A. C. (2010). Alkylation of sperm DNA is associated with male factor infertility and a reduction in the proportion of oocytes fertilised during assisted reproduction. *Mutation research*, 698(1-2), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.02.019>
- Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., y Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1-2), 21-26. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00206-8)
- Tatewaki N, Maekawa K, Katori N, Kurose K, Kaniwa N, Yamamoto N, K. H., y Ohe Y, Nokihara H, Sekine I, Tamura T, Yoshida T, Saijo N, Saito Y, S. J. (2009). Genetic Variations and Haplotype Structures of the Glutathione S-transferase Genes, GSTT1 and GSTM1, in a Japanese Patient Population. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24(1), 118-126.
- Tawfik Khattab, A. M., Zayed, A. A., Ahmed, A. I., AbdelAal, A. G., y Mekdad, A. A. (2016). The role of PON1 and CYP2D6 genes in susceptibility to organophosphorus chronic intoxication in Egyptian patients. *NeuroToxicology*, 53, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.015>
- The 1000 Genomes Project Consortium. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), 56-65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>
- Thomas, M., y Job, C. K. (1972). Serum atypical pseudocholinesterase and genetic factors in leprosy. *British medical journal*, 3(5823), 390-391. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5823.390>

- Timchalk, C., Nolan, R. J., Mendrala, a. L., Dittenber, D. a., Brzak, K. a., y Mattsson, J. L. (2002). A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicological Sciences*, 66(1), 34-53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.34>
- Usmani, K. A., Hodgson, E., y Rose, R. L. (2004). In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. *Chemico-biological interactions*, 150(3), 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.015>
- Valiyaveetil, M., Alamneh, Y., Biggemann, L., Soojhawon, I., Farag, H. A., Agrawal, P., ... Nambiar, M. P. (2011). In vitro efficacy of paraoxonase 1 from multiple sources against various organophosphates. *Toxicology in Vitro*, 25(4), 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.012>
- Van Delft, J. H. M., Steenwinkel, M.-J. S. T., De Groot, A. J. L., Van Zeeland, A. A., Eberle-Adamkiewicz, G., Rajewsky, M. F., ... Baan, R. A. (1997). Determination of N7- and O 6 -methylguanine in Rat Liver DNA after Oral Exposure to Hydrazine by Use of Immunochemical and Electrochemical Detection Methods. *Toxicological Sciences*, 35(1), 131-137. <https://doi.org/10.1093/toxsci/35.1.131>
- Verschaeve, L., Koppen, G., Gorp, U. Van, Schoeters, G., Jacobs, G., y Zwijzen, C. (2007). Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals. *Journal of applied toxicology JAT*, 27(6), 612-20. <https://doi.org/10.1002/jat.1244>
- Viby-Mogensen, J. (1983). Cholinesterase and succinylcholine. *Danish medical bulletin*, 30(3), 129-150.
- Wang, P., Mao, Y., Razo, J., Zhou, X., Wong, S. T., Patel, S., ... Gaber, A. O. (2010). Using genetic and clinical factors to predict tacrolimus dose in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics*, 11(10), 1389-1402. <https://doi.org/10.2217/pgs.10.105>
- Wang, X. (2002). Extensive Association Analysis Between Polymorphisms of PON Gene Cluster With Coronary Heart Disease in Chinese Han Population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 328-334. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000051702.38086.C1>
- Warholm, M., Alexandrie, A. K., Högberg, J., Sigvardsson, K., y Rannug, A. (1994). Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood. *Pharmacogenetics*, 4(6), 307-11.
- Warholm, M., Rane, A., Alexandrie, A. K., Monaghan, G., y Rannug, A. (1995). Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics*, 5(4), 252-4.
- Webb, G., Vaska, V., Coggan, M., y Board, P. (1996). Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*, 33(1), 121-3. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0167>
- Whittaker, M. (1984). Cholinesterases. En H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, y M. Grafi (Eds.), *Methods of enzymatic analysis* (Vol. 4, Vol. IV, pp. 52-74). Verlag-Chemie, Weinheim.
- Whittaker, M. (1986). Cholinesterase. En L. Beckman (Ed.), *Monographs in Human Genetics* (11.^a ed., Vol. 11). Basel Karger.
- Whittaker, M., y Britten, J. J. (1985). Plasma cholinesterase variants. Family studies of the E1k gene. *Human heredity*, 35(6), 364-368.
- WHO. (1990). Working Group on the Health Impact of Human Exposure to Recreational. *WHO Library*.
- Wiaderkiewicz, R., Walter, Z., y Reimschuessel, W. (1986). Sites of methylation of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides in vitro. *Acta biochimica Polonica*, 33(2), 73-85.

- Wijnen, P. a H. M., Op den Buijsch, R. a M., Drent, M., Kuijpers, P. M. J. C., Kuipers, P. M. J. C., Neef, C., ... Koek, G. H. (2007). Review article The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26 Suppl 2(August), 211-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03490.x>
- Wild, D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 32(2), 133-149. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(75\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0165-1110(75)90003-2)
- Wooder, M. F., y Wright, A. S. (1981). Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 49 Suppl 5, 51-5.
- Wrighton, S. A., y Stevens, J. C. (1992). The Human Hepatic Cytochromes P450 Involved in Drug Metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 22(1), 1-21. <https://doi.org/10.3109/10408449209145319>
- Xu, S. J., Wang, Y. P., Roe, B., y Pearson, W. R. (1998). Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3517-3527. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3517>
- Yaduvanshi, S. K., Srivastava, N., Marotta, F., Jain, S., y Yadav, H. (2012). Evaluation of micronuclei induction capacity and mutagenicity of organochlorine and organophosphate pesticides. *Drug metabolism letters*, 6(3), 187-97.
- Yesupriya, A., Evangelou, E., Kavvoura, F. K., Patsopoulos, N. A., Clyne, M., Walsh, M. C., ... Khoury, M. J. (2008). Reporting of human genome epidemiology (HuGE) association studies an empirical assessment. *BMC Medical Research Methodology*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-8-31>
- You, C., y Wang, Y. (2016). Mass Spectrometry-Based Quantitative Strategies for Assessing the Biological Consequences and Repair of DNA Adducts. *Accounts of Chemical Research*, 49(2), 205-213. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00437>
- Zanger, U. M., y Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103-141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zayed, S. M., y Mahdi, F. M. (1987). Methylation of guanine in vivo by the organophosphorus insecticide methamidophos. *Zeitschrift Fur Naturforschung. Section C, Biosciences*, 42(1-2), 17-20.
- Zhou, S.-F. F., Liu, J.-P. P., y Chowbay, B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*, 41(2), 89-295. <https://doi.org/10.1080/03602530902843483>
- Zhu, B., Chen, G. L., Chen, X. P., He, N., Liu, Z. Q., Jiang, C. H., ... Xiaoping, C. (2002). Genotype of CYP3AP1 associated with CYP3A activity in Chinese Han population. *Acta pharmacologica ...*, 23(6), 567-572.

Research Article

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

Antonio Gómez-Martín,¹ Bashar Altakroni,² David Lozano-Paniagua,¹ Geoffrey P. Margison,² Frank de Vocht,³ Andrew C. Povey,^{2*} and Antonio F. Hernández^{1*}

¹Department of Legal Medicine and Toxicology, University of Granada School of Medicine, Granada, Spain

²Centre for Occupational and Environmental Health (COEH), Centre for Epidemiology, Institute of Population Health, University of Manchester, Manchester M13 9PL, United Kingdom

³School of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, BS8 2PS, United Kingdom

There are concerns about genetic risks associated with long-term exposure to pesticides as these compounds may damage DNA, resulting in mutations that eventually lead to cancer, neurological, and reproductive adverse health effects. This study assessed DNA damage in intensive agricultural workers exposed to pesticides by determining the levels of N7-methyldeoxyguanosine (N7-MedG), an adduct known to be a robust biomarker of recent exposure to chemical methylating agents. A cohort of 39 plastic greenhouse workers was assessed for changes in lymphocyte DNA N7-MedG levels between low level and high level exposures during the course of a spraying season. The contributions of genetic polymorphisms of the pesticide-metabolizing enzymes paraoxonase-1 (PON1) and the glutathione S-transferases, GSTM1 and GSTT1, on N7-MedG levels and other potential confounders were also assessed. N7-MedG increased in the period of high pesti-

cide exposure as compared to the low exposure period (0.23 and 0.18 μmol N7-MedG/mol dG for the unadjusted and adjusted linear mixed models, $P=0.02$ and 0.08 , respectively). Significant decreased levels of erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase were observed in the high versus low exposure period in both the unadjusted (2.85 U/g hemoglobin and 213.13 U/L, respectively) and adjusted linear mixed models (2.99 U/g hemoglobin and 230.77 U/L, respectively), indicating pesticide intake. In intensive agriculture workers, higher pesticide exposure increased DNA alkylation levels, further demonstrating the genotoxicity of pesticides in man. In addition, pesticide-exposed individuals with inherited susceptible metabolic genotypes (particularly, null genotype for *GSTM1* and the *PON1* 192R allele) appear to have an increased risk of genotoxic DNA damage. Environ. Mol. Mutagen. 56:437–445, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: DNA adducts; biomarkers; genotoxicity; GST; PON1; occupational health

Grant sponsor: Council of Innovation of the Andalusian Government; Grant number: P09-CVI-5062.

*Correspondence to: Dr. A.F. Hernández, Department of Legal Medicine and Toxicology, University of Granada School of Medicine, Avda. Madrid, 11, 18071-Granada, Spain. E-mail: ajerez@ugr.es or Dr. A.C. Povey, COEH, Centre for Epidemiology, Institute of Population Health, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK. E-mail: andy.povey@manchester.ac.uk

Received 12 June 2014; provisionally accepted 17 October 2014; and in final form 7 November 2014

DOI 10.1002/em.21929

Published online 26 November 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

INTRODUCTION

Pesticides are frequently used chemicals in agriculture to increase and improve the yield and quality of crop production and are also used in non-agricultural settings, such as public health programs or residential use. However, the agricultural sector represents the majority of the total amount used and world pesticide expenditures totalled more than \$39.4 billion in 2007 [Grube et al., 2011]. As these compounds are inherently toxic and deliberately applied to the environment, the possible occupational exposures, environmental, and foodstuffs contamination raise concerns about potential health hazards [Damalas and Eleftherohorinos, 2011]. On account of this, pesticides are subject to testing for genotoxicity prior to regulatory approval as genotoxic potential is a primary risk factor for certain chronic and long-term health effects [Bolognesi, 2003]. Indeed, there have been a number of studies that have reported associations between pesticide exposure in general and human chronic disease [Mostafalou and Abdollahi, 2013], including various types of cancer [Bassil et al., 2007; Parrón et al., 2014], neurodegenerative diseases [Kanavouras et al., 2011; Parrón et al., 2011], reproductive [Hanke and Jurewicz, 2004] and developmental toxicity, and respiratory effects [Hernández et al., 2011].

DNA damage is considered as an important genotoxicity biomarker and is clearly one of the underlying causes of mutations leading to cancer [Singh et al., 2012]. Guanine bases are predominant DNA targets for attack by chemical carcinogens [Beach and Gupta, 1992] and N7-methyldeoxyguanosine (N7-MedG) has been shown to be a robust biomarker of exposure to methylating agents because of its reported inefficient elimination from DNA, allowing accumulation during chronic exposures and its higher frequency compared to other DNA alkylation products [Bianchini and Wild, 1994; Harrison et al., 2001; Boysen et al., 2009; Crosbie et al., 2013]. Thus, N7-MedG levels provide an indication of the initial formation of *O*⁶-methyldeoxyguanosine (*O*⁶-MedG), a promutagenic, carcinogenic, and toxic adduct which is formed at levels 10- to 100-fold lower than N7-MedG [Van Delft et al., 1997; Stocks et al., 2010] depending on the chemistry of the methylating agent. For these reasons, many epidemiological studies have used N7-MedG as a biomarker of exposure, particularly in cancer treatment studies [Acladios et al., 2004; Lees et al., 2007; Billson et al., 2009; Khan et al., 2011; Crosbie et al., 2012, 2013], infertility studies [Stocks et al., 2010], and occupational exposures [Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2000; Le Goff et al., 2005; Andre et al., 2007; Verschaeve et al., 2007].

A variety of biomarkers in peripheral nucleated cells (such as white blood cells, WBC) have been increasingly used to estimate genetic risks associated to long-term exposure to pesticides [Angerer et al., 2007; Kapka-

Skrzypczak et al., 2011]. Previous studies have evaluated the potential genotoxicity (DNA damage) of pesticides in occupationally exposed populations by using cytogenetic damage biomarkers (chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, micronuclei, and the comet assay). Although most of them have found suggestive evidence of genotoxic effects in these populations [Da Silva et al., 2008; Yaduvanshi et al., 2012], there are also controversial results [Lucero et al., 2000; Pastor et al., 2002] particularly because variability in genotoxicity indices complicate the characterization of positive responses [Bull et al., 2006].

In recent decades, a number of studies have focused on DNA adducts arising from exposures to alkylating agents [Saffhill et al., 1985; Bartsch, 1996; Drabløs et al., 2004; Kondo et al., 2010] and DNA alkylation by pesticides, mainly the organophosphate (OP) methyl esters, has been investigated by several groups [Bedford and Robinson, 1972; Wild, 1975; Wooder and Wright, 1981; Braun et al., 1982; Dedek et al., 1984; Wiaderkiewicz et al., 1986; Zayed and Mahdi, 1987; Mehl et al., 1994; Ray and Richards, 2001; Du et al., 2013] indicating that the individual, as well as mixes of, pesticides can induce DNA damage through alkylation. Hence the aim of this study was to determine N7-MedG levels in a cohort of greenhouse workers at two periods of a crop season with different levels of pesticide exposure. Decreases in erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and plasma cholinesterase (BChE) levels between these periods were used as a quantitative estimation of exposure. AChE has been acknowledged as a biomarker for chronic exposure to pesticides in humans resulting not only from OPs and *N*-methylcarbamates insecticide inhibition but also from pesticide-induced lipid peroxidation, a process that affects membrane-bound enzymes such as AChE. By contrast, plasma BChE is considered a useful biomarker for assessing short-term exposure owing to its rapid recovery after inhibition by anticholinesterase compounds [Hernández et al., 2013]. The present study was also aimed to assess the contribution of genetic polymorphisms of the pesticide-metabolizing enzymes paraoxonase-1 (PON1) and glutathione *S*-transferase (GST) on N7-MedG levels.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

A longitudinal study was conducted on a cohort of 39 unrelated individuals (38.9 ± 8.3 years old) with at least 5 years of experience carrying out farmer activities in greenhouses on a regular basis; 8 hr daily. All were contacted through occupational physicians involved in their health surveillance. The study participants were residents of the municipality of El Ejido (Almería, Southeastern Spain), which is an area known for its intensive agriculture activity and numerous plastic greenhouses (about 18,000 hectares) where vegetables and fruits are grown. Pesticides are regularly used to control pests and weeds and thus to

improve the crop yield. The total amount of insecticides–acaricides–nematocides used in the study area (Almería province) represents 66.8% of the total pesticide consumption in such a province, with this figure being greater than the 32.5% used in the rest of Andalusia (South Spain) because of the type of crops grown in this intensive agriculture. According to the nationwide survey of the pesticide market from 2011 and 2012, based on European Regulation 1185/2009, OPs account for about 30% of the total amount (tons) of insecticides–acaricides–nematocides sold. Among them, the active substances more frequently used are chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, dimethoate, malathion, pirimiphos-methyl, fosmet, and fenamifos. Other insecticides also used in the intensive agriculture in the study area are *N*-methylcarbamates (methomyl, oxamyl, formetanate), pyrethroids (tralomethrin, cypermethrin, acrynathrin), neonicotinoids (imidacloprid), abamectine, and dithiocarbamates fungicides (macozeb, zineb) [Hernández et al., 2003, 2010].

Individuals completed a detailed questionnaire covering standard demographic characteristics (age, gender, height, and weight), lifestyle (smoking habits, alcohol, and coffee/tea consumption), and occupational features (use of personal protective equipment (PPE), such as gloves, masks, boots, and overalls). The administration of questionnaires and collection of blood samples were carried by nursing personnel specially trained and standardized for this purpose. The study was approved by the University of Granada Research Ethics Committee (reference 29/2009). All study participants gave written informed consent.

Two agricultural periods of a crop season were surveyed: low exposure, when pesticides were used occasionally, with a single monthly application (May–June 2011) and high exposure (October–November 2011), in which pesticides were used regularly on a weekly basis. All workers provided a blood sample for each crop season period at the time of the interview. Blood samples were collected by venopuncture in fasting conditions by nursing personnel using EDTA tubes. An aliquot was taken separately and the remainder was immediately centrifuged at 400g for 20 min to separate plasma and the erythrocyte package. All samples were stored frozen at -40°C until analysis.

DNA Extraction

DNA from peripheral blood leukocytes was isolated from 3 mL of EDTA-blood using the REALPURE “SSS” Kit following the manufacturer’s recommendations (Durviz S.L., Spain), except that, to minimize the hydrolytic loss of N7-MedG, the proteinase K deproteinization step was carried out in a saline buffer at room temperature instead of at 56°C . DNA purity was assessed by UV absorbance at 260 and 280 nm using Infinite® 200 NanoQuant (Tecan, Switzerland), and samples were considered to be sufficiently pure if the ratio of absorbance at 260 and 280 nm was 1.78 ± 0.21 [Santella, 2006].

DNA concentrations were determined by using a Picogreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen, Paisley, U.K.) and the resulting fluorescence was quantified on a GENios microplate reader (Tecan, Austria) and extrapolated from a standard curve made using ultrapure calf thymus DNA (Sigma, Dorset, U.K.). The mean DNA concentration was $310 \pm 172 \mu\text{g/mL}$. Extracted DNA was stored at -20°C until further analysis.

N7-Methyldeoxyguanosine Quantification

N7-MedG levels were determined from DNA extracted from blood using a previously published immunoslot blot (ISB) method [Harrison et al., 2001] with some modifications. In brief, DNA from samples and methyl-*N*-nitrosourea-methylated calf thymus DNA standards were alkali treated (70 mM NaOH, at 37°C for 30 min), neutralized, heat denatured (5 min at 100°C), and cooled on ice (10 min). Using a vacuum slot-blot apparatus, DNA samples in triplicate and standard curve samples in duplicate were immobilized on nitrocellulose transfer membrane (Protran® BA79, pore size 0.1 μm ; Whatman®, Germany) and rinsed. Filters were heated

(80°C , 90 min) and blocked for 1 h at room temperature in phosphate buffered saline (PBS) containing Tween-20 (0.1% vol/vol (PBST) and 5% (wt/vol) fat free milk powder). The rabbit polyclonal primary antibody (1:10,000 in 20 mL PBST containing 0.5% (wt/vol) fat-free milk powder) [Harrison et al., 2001], which binds to imidazole ring-opened N7-MedG, was incubated with the filter overnight (4°C). The filter was then washed in PBST (three times with 10 mL) and incubated with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Dako, Denmark: 1:75,000 in 20 mL PBST containing 0.5% fat free milk powder) for 1 hr. HRP was visualized by chemiluminescence reaction with an ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U.K.) by exposure to X-ray film (Hyperfilm™ ECL, Amersham, Buckinghamshire, U.K.). All films were developed using KODAK GBX chemicals. The band intensities were quantified by scanning the films with an optical scanner and analyzed using ImageJ software. The mean coefficient of variation of the triplicate ISB was 9.8%. The limit of detection was 0.1 μmol N7-MedG/mol dG. Sample adduct levels were converted to micromoles per mole of dG assuming 1 μg of DNA contained 3,124 pmol of nucleotides [Van Delft et al., 1991]. Sufficient DNA for analysis was extracted from paired samples from 39 workers assessed at two different periods of the same crop season.

Enzyme Activities in Blood

AChE activity was determined following the method by Ellman et al. [1961] with some modifications [Worek et al., 1999]. Briefly, acetylthiocholine (0.48 μM final concentration) was used as a substrate in a reaction mixture containing phosphate buffer pH 8 (90 mM final concentration), dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB, 0.32 mM final concentration), and ethopropazine (0.02 mM final concentration) to inhibit BChE. The reaction mixture was incubated at 25°C for 5 min and then the reaction was started by adding 0.17 mL of thawed whole blood diluted with distilled water (1:100). The thiocholine produced was coupled with DTNB and quantified spectrophotometrically at 410 nm and 25°C . Activity was expressed as $\mu\text{mol/min/g}$ hemoglobin. Plasma cholinesterase (BChE) was determined by measuring the rate of hydrolysis of benzoylcholine (0.05 mM final concentration) in Sorensen phosphate buffer (67 mM, pH 7.4) at 240 nm and 25°C according to the method by Whittaker [1984]. The reaction was started by adding 2 mL of 1:100 plasma diluted with the same buffer. All enzyme assays were performed in a Perkin–Elmer Lambda-2 spectrophotometer. Non-enzymatic hydrolysis for each substrate was measured by using buffer instead of serum and was subtracted from the total rate of hydrolysis. Samples were assayed in duplicate and the average value was used for the analysis.

Genotyping

Specific TaqMan® SNP Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) were used for *PON1 Q192R* polymorphism (C___2548962_20; rs662). *GSTM1* and *GSTT1* copy number was determined using TaqMan® Gene Copy Number Assays designed by Applied Biosystems (Foster City, CA), Hs03947236_cn and Hs00010004_cn (Life Technologies, Grand Island, NY), respectively. The assay was performed as a quantitative duplex PCR assay using gene-specific primers and a gene-specific FAM™-MGB probe along with primers for the RNase P gene and VIC® dye-labeled TAMRA™ probe as the reference gene (TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P, Life Technologies, USA).

Samples were run on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR system. Results were analyzed using Sequence Detection Software (SDS, v. 2.4). The real-time PCR data were exported into the CopyCaller® Software (Life Technologies, v. 2.0) to determine the copy number for *GSTM1* and *GSTT1* in each sample.

As quality control, each series of amplifications included three negative controls without DNA template (no template controls, NTCs) to test

for DNA contamination. Each run also included three positive controls with samples of the known genotypes at the copy number variants (CNVs) and single nucleotide polymorphism (SNPs) of interest, the latter being previously confirmed by DNA sequencing. In the case of CNVs, all samples were amplified by triplicate and for TaqMan® SNPs Genotyping Assays, 10% of randomly selected samples were sequenced. The procedures recommended by the manufacturer were followed. Genetic polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium and no linkage disequilibrium can be expected among them as their corresponding genes are localized in different chromosomes.

Statistical Analyses

Mean values with standards deviations or 95% confidence intervals are presented. Levels of N7-MedG were log-transformed to normalize the distribution. As blood samples from the same individual were taken in two seasons and data for N7-MedG and cholinesterase activities were available for the same subject at two different time points, data for log N7-MedG values and cholinesterases were adjusted for repeated measurements on individuals and analyzed using linear mixed effects models. Subject was included as a random-intercept and all other factors were added as fixed effects. All analyses were conducted in R version 3.01 using the lme4 package (<http://cran.r-project.org/web/packages/lme4/lme4.pdf>) and parameter-specific *P* values calculated based on Satterthwaite's approximations using the lmerTest package (<http://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/lmerTest.pdf>). Pearson correlation test was used to analyze the correlation between continuous variables (N7-MedG levels, cholinesterase activities, age, BMI, and the number of cups of coffee/tea consumed per day). The Students' *t*-test was used to test for significance of the differences in the mean values of log N7MedG, AChE, and BChE in each study period when these variables were compared by gender, tobacco and alcohol consumption, and wearing PPEs. These analyses were performed with the SPSS/PC statistical software package (SPSS 20.0 for Windows).

TABLE I. Description (mean ± SD) of the Personal Characteristics of the Study Participants

	All participants (<i>n</i> = 39)	Male (<i>n</i> = 28)	Female (<i>n</i> = 11)	<i>P</i>
Age	38.9 ± 8.3	38.6 ± 8.2	39.80 ± 9.11	0.71
BMI	25.47 ± 4.28	25.14 ± 4.65	26.94 ± 2.73	0.31
Tobacco ^a	0.13 ± 0.34	0.18 ± 0.39	0.00 ± 0.00	0.14
Alcohol ^a	0.23 ± 0.43	0.32 ± 0.48	0.00 ± 0.00	0.05
Coffee/tea ^b	1.74 ± 0.97	1.79 ± 0.88	1.64 ± 1.21	0.68

^aPercentage of current users (expressed in decimal form).

^bNumber of cups of coffee/tea daily.

TABLE II. Mixed Models Analysis to Assess the Association Between N7-MedG Levels and Pesticide Exposure (Assessed by AChE and BChE Activities) at Two Periods of a Crop Season With Different Level of Exposure (High Versus Low Exposure)

	High vs. low exposure (95% CI) ^a	<i>P</i>	High vs. low exposure (95% CI) ^b	<i>P</i>
Log N7-MedG	0.45 (0.07:0.82)	0.02	0.42 (−0.004:0.839)	0.06
N7-MedG	0.23 (0.04:0.43)	0.02	0.18 (−0.020:0.374)	0.08
AChE	−2.85 (−0.70:−1.03)	<0.01	−2.90 (−4.74:−1.02)	<0.01
BChE	−213.23 (−276.05:−148.41)	<0.001	−230.76 (−292.71:−162.26)	<0.001

Units: μmol N7-MedG/mol dG (N7-MedG), U/g Hb (AChE), U/L (BChE).

^aUnivariate linear mixed effects model with participant as random intercept.

^bLinear mixed model adjusted for genetic polymorphisms (*PONI 192*, *GSTMI*, *GSTTI*), sex, age, BMI, tobacco, alcohol, coffee or tea.

RESULTS

Personal characteristics of the study population are shown in Table I. The mean age of the participants was 38.9 years (range 22–57) and most of them (74%) were male. No differences were found when socio-demographic and lifestyle habits were compared by gender, with the only exception of alcohol consumption as no female reported to intake alcohol (Table I).

Mixed models analysis of the biochemical parameters studied (N7-MedG, AChE and BChE) between the two crop seasons with different pesticide exposure is shown in Table II. Levels of N7-MedG in the high pesticide exposure season were significantly higher than those found in the low exposure period. By contrast, AChE and BChE (used as biomarkers of pesticide exposure) showed the opposite behavior as they were significantly reduced in the high pesticide exposure period. Results of the univariate linear mixed model were comparable to those obtained by adjusting the model for age, sex, body mass index, consumption of smoking, alcohol, and coffee/tea, and *PONI 192*, *GSTMI*, and *GSTTI* genetic polymorphisms, which may be potentially associated with DNA alkylation damage. After stratification by sex (Table III), both male and female workers showed significantly higher N7-MedG levels and lower BChE activity in the period of high vs. low pesticide exposure. While male workers also had significantly lower AChE activity in the higher vs. low exposure period, female workers failed to show significant differences. No significant correlation was found in N7-MedG, AChE and BChE levels in each study period (data not shown).

In each period studied, N7-MedG, AChE, and BChE were compared by age, gender, BMI, tobacco, alcohol and coffee/tea consumption, and PPE used for pesticide application in order to control for factors affecting pesticide exposure or potential endogenous/exogenous sources of DNA-alkylation damage (data not shown). The only significant differences observed were (i) when BChE was compared by gender, as females had significantly lower enzyme activity than males in the period of high exposure to pesticides (859 ± 151U/L vs. 1010 ± 177U/L, *P* = 0.020) and

TABLE III. Mixed Model Analysis of N7-MedG, AChE, and BChE Levels in Male and Female Participants in the High vs. Low Exposure Periods

	Males		Females	
	High vs. low exposure ^a (95% CI)	<i>P</i>	High vs. low exposure ^a (95% CI)	<i>P</i>
N7-MedG ^b	1.72 (1.06:2.79)	0.03	1.22 (0.71:2.08)	0.00
AChE	-3.35 (-5.70:-1.00)	0.01	-0.98 (-3.95:1.55)	0.48
BChE	-188.12 (-266.91:-104.05)	<0.001	-267.08 (-375.16:-159.00)	<0.001

Units: μmol N7-MedG/mol dG (N7-MedG), U/g Hb (AChE), U/L (BChE).

^aUnivariate linear mixed effects model with participant as random intercept.

^bOriginal values are shown in the table instead of logarithmic transformation for a better understanding. Nevertheless, the statistical analysis has been performed using log-transformed data.

TABLE IV. Mixed Model Analysis^a of N7-MedG, AChE, and BChE Levels in the High vs. Low Exposure Period Stratified by Genetic Polymorphisms of the Pesticide-Metabolizing Enzymes Studied

	N7MedG ^b (95% CI)	<i>P</i>	AChE (95% CI)	<i>P</i>	BChE (95% CI)	<i>P</i>
<i>GSTM1</i>						
0/0	1.93 (0.97:3.85)	0.07	-1.17 (-3.31:0.75)	0.25	-196.49 (-286.90:-100.93)	0.00
0/1	1.57 (0.97:2.54)	0.08	-3.22 (-6.09:0.05)	0.05	-282.47 (-386.44:-178.49)	0.00
1/1	0.82 (0.50:1.34)	0.43	-7.41 (-12.53:-2.29)	0.03	-90.39 (-216.76:53.51)	0.22
<i>GSTT1</i>						
0/0	1.69 (0.98:2.90)	0.08	-0.67 (-4.01:2.66)	0.70	-181.10 (-295.47:-66.74)	0.01
0/1	1.53 (0.67:3.52)	0.32	-2.49 (-5.17:0.28)	0.09	-248.60 (-363.81:-133.40)	0.00
1/1	1.51 (0.86:2.64)	0.16	-5.09 (-9.26:-1.38)	0.02	-213.45 (-315.82:-100.73)	0.00
<i>PON1 Q192R</i>						
QQ	1.06 (0.61:1.83)	0.85	-2.32 (-6.03:1.15)	0.21	-198.85 (-301.10:-82.83)	0.00
QR	1.51 (1.06:2.14)	0.03	-4.59 (-7.31:-2.10)	0.00	-197.53 (-296.37:-95.19)	0.00
RR	3.31 (1.07:10.26)	0.06	-1.32 (-4.31:2.31)	0.42	-260.86 (-415.88:-105.83)	0.01

Units: μmol N7-MedG/mol dG (N7-MedG), U/g Hb (AChE), U/L (BChE).

^aUnivariate linear mixed effects model with participant as random intercept; confidence intervals calculated based on profile likelihood.

^bOriginal values are shown in the table instead of logarithmic transformation for a better understanding. Nevertheless, the statistical analysis has been performed using log-transformed data.

(ii) AChE activity was significantly correlated with BMI in both periods ($r = 0.452$; $P = 0.007$ for the low exposure period and $r = 0.389$; $P = 0.045$ for the high exposure period).

Table IV shows the change in levels of N7-MedG in the periods of high vs. low pesticide exposure according to genetic polymorphisms of pesticide-metabolizing enzymes. Near-statistically significant differences were observed across *GSTM1* genotype, with a gene-dose response as N7-MedG levels increased with the number of null alleles. However, a similar pattern was not observed for *GSTT1* polymorphism, although the null genotype showed near-statistically significant increased N7MedG levels. A gene-dose response was also observed for *PON1 Q192R* polymorphism, with N7-MedG levels increasing with the number of R alleles. When AChE and BChE were compared across *GSTM1*, *GSTT1*, and *PON1 Q192R* genotypes, a trend toward lower AChE activity was observed in the high vs. low exposure period as the number of functional alleles for both GSTs increases (Table IV); however, this trend was less clear for BChE. With respect to *PON1 Q192R* polymorphism, every geno-

type showed a significantly lower BChE activity in the high vs. low exposure period, with the RR genotype showing the lowest enzyme activity. This effect was not observed for AChE activity, where, despite a trend toward lower activity in the high vs. low exposure period, significant differences were only found for the QR genotype.

DISCUSSION

The present study was undertaken to examine whether increased DNA alkylation damage (evaluated as N7-MedG adducts in the ISB assay) was associated with increased pesticide exposure levels in a cohort of subjects working inside plastic greenhouses. Taking into account that pesticide exposure can be season-related, two blood samples were taken from each individual at different times: one in a period of low exposure and the other in a period of higher exposure. In the adjusted mixed-model analysis, the independent influence of several potential covariates that might be associated with DNA alkylation damage was explored (e.g., age, sex, body mass index,

consumption of smoking, alcohol, and coffee/tea, and *PON1 192*, *GSTM1*, and *GSTT1* genetic polymorphisms). Despite none of the covariates being statistically significant (likely because of the relatively small sample size), significantly increased N7-MedG levels were observed in the period of high exposure with respect to that of low exposure, indicating a genotoxic alkylating effect of pesticide exposure. Lower BChE and AChE activities were observed in the high vs. low exposure period, indicating pesticide exposure; therefore, the change observed in N7-MedG can be attributed to exposure. These associations still persisted after stratification by sex.

The potential impact of the massive use of pesticides on human health has become a subject of major concern in countries with extensive agricultural activity, particularly with regard to chronic diseases [Gallois et al., 2011]. Although epidemiology studies are not fully consistent, there is a growing body of evidence linking long-term low-dose pesticide exposure to a variety of clinical conditions where genotoxic potential of pesticides has been considered a primary risk factor, such as different types of cancer, reproductive health issues, and a range of neurological disorders [Fritschi et al., 2005; Weichenthal et al., 2010; Parrón et al., 2011, 2014].

DNA-damaging pesticides include insecticides (monocrotophos, parathion methyl, methomyl), fungicides (captan, carbendazime, folpet, zineb), and herbicides (glyphosate, paraquat) [Peluso et al., 1996]. In our study area, the pesticides most often used were OPs, *N*-methylcarbamates, pyrethroids, dithiocarbamates, and neonicotinoids, all of which have been reported to be positive for genotoxic effects in experimental studies in bacterial and in mammalian systems [Bolognesi, 2003]. A significant exposure to certain OP methyl esters (e.g., dichlorvos and malaoxon) can produce DNA alkylation leading to promutagenic damage [FAO/WHO, 1994; Ray and Richards, 2001] supporting the hypothesis that alkylation of DNA is the essential step for mutation induction by these compounds [Braun et al., 1982]. OP insecticides act as electrophiles capable of reacting with nucleophilic targets in DNA, especially with the nitrogen and oxygen atoms of nitrogenous bases and with phosphate groups present in the nucleotide structures [Verly and Brakier, 1970]. Thus, the OP-induced alkylation of DNA could lead to difficulty in DNA replication [Garbellini et al., 2013].

However, pesticides may cause cancer and other adverse effects via non-genotoxic mechanisms. Thus, changes in promoter methylation, in the form of 5-methylcytosine, have been found after exposure to several environmental chemicals, including pesticides such as vinclozolin, methoxychlor, and the OP insecticides dichlorvos, chlorpyrifos, methamidophos, and monocrotophos, which are widely used in agriculture [Zhang et al., 2012; Garbellini et al., 2013].

The effect of inherited polymorphism of metabolic genes on genotoxicity was also evaluated in this study as

some pesticides, particularly OP compounds, once bioactivated to the highly toxic oxon form, can be either hydrolyzed by PON1 or conjugated to glutathione, a reaction catalyzed by GSTs, yielding metabolites that are excreted in the urine [Liu et al., 2006]. *PON1*, *GSTM1*, and *GSTT1* genes may influence the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of pesticide-exposed greenhouse workers, suggesting that these metabolic genetic polymorphisms may result in a greater risk of genotoxicity elicited by pesticide exposure [Liu et al., 2006]. Previously, the *GSTM1* null genotype has been associated with increased genotoxicity of the methylating agent 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone [Salama et al., 1999] but it has not been consistently associated with DNA alkylation. In *GSTM1* null individuals, N7-MedG levels were higher, but not significantly so, in DNA from bronchial lavage samples [Lewis et al., 2004] but lower in normal bladder DNA [Saad et al., 2006]. Urinary 7-methylguanine levels were not associated with the *GSTM1* null genotype in a Danish population [Loft et al., 2007] but were in a Taiwanese population, especially in smokers [Lin et al., 2009]. In our study, the null genotype for *GSTM1* and *GSTT1* was associated with higher N7-MedG levels in the high vs. low exposure period than the other genotypes containing functional alleles, suggesting that DNA damage can be modulated through gene-environmental interactions in workers occupationally exposed to pesticides. Moreover, a gene-dose effect was observed for *PON1 Q192R* polymorphism, as N7-MedG levels increased in the high vs. low exposure period with the number of R alleles (Table IV). These findings suggest that carriers of null genotypes for *GSTM1* and *GSTT1*, as well as carriers of *PON1 192RR* genotype, might be at increased genotoxic alkylating effect after exposure to pesticides.

The *PON1 Q192R* genotype has been associated with certain types of DNA damage, but not DNA alkylation. Workers in India, occupationally exposed to OPs, had higher levels of lymphocyte DNA damage (as quantified by the tail moment) as measured by the alkaline comet assay if they had the QQ genotype [Singh et al., 2011]. Similarly, the QQ genotype was associated with increased sperm DNA fragmentation and 8-oxodG levels in a Chinese population [Ji et al., 2012], though in a separate study the RR genotype was more associated with decreased sperm DNA integrity (as assessed by a nick translation assay) in agricultural workers from southern Mexico exposed to OPs [Pérez-Herrera et al., 2008]. The limited evidence from these studies suggests that any effects on DNA damage may well be both damage and exposure specific.

One of the major drawbacks of environmental and occupational epidemiology studies is the characterization of exposures to chemical agents being investigated, which may result in misclassification of exposures [Bolognesi

et al., 2009]. As we were unable to characterize an individual's exposure it is not possible to link the observed increase in N7-MedG levels to a particular pesticide. Moreover, pesticide exposure may potentially have changed endogenous mechanisms leading to increased alkylation. Exogenous sources of N7-MedG have also been reported, including smoking, diet, occupation, and pollution, among others [Crosbie et al., 2013]; however, the study design used enabled to control for these potential confounders as individuals were assessed twice over a short period of time and neither changes in lifestyle habits nor other chemical exposures occurred. The prospective cohort used in our study, together with cholinesterase biomonitoring, allowed the comparison of N7-MedG levels at the period of low exposure to pesticides with those detected in the high exposure period. Overall, our results suggest N7-MedG levels are increased following pesticide exposure. The relevance of this finding is highly significant as this particular adduct is an indicator that more biologically potent adducts such as O⁶-methylguanine must also be increased. Further studies are needed to better characterize the potential range and abundance of other DNA adducts associated with pesticides exposure in intensive agriculture areas where a wide variety of pesticides are used.

The repeated-measures design used in this study indicated a significant variability in the blood levels of N7-MedG in a cohort of intensive agriculture workers, with this variation being dependent on pesticide exposure. In conclusion, pesticide exposure may modify DNA alkylation levels in individuals at high pesticide exposure periods, thus supporting a potential genotoxicity risk. In addition, pesticide-exposed individuals with particular genetic polymorphisms in metabolic enzymes (e.g., those null for *GSTM1* and homozygous for the *PON1 192R* allele) appear to have an increased risk of genotoxicity, indicating that DNA damage can be modulated through gene–environmental interactions. This inherited susceptible metabolic genotype could be useful as a biomarker of susceptibility in individuals exposed to pesticides.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Hernández, Povey and Margison conceived and designed the study. Dr. Gómez-Martín and Lozano-Paniagua collected the data and performed the laboratory analysis. Drs. Margison and Altakroni supervised the laboratory analysis. Dr. de Vocht performed the statistical analysis. Drs. Hernández and Gómez-Martín prepared the manuscript draft with important intellectual input from Drs. Povey, Margison, Altakroni, de Vocht and Lozano-Paniagua. All authors approved the final manuscript and had complete access to the study data.

ACKNOWLEDGMENTS

The determination of N7-MedG was carried out by Antonio Gómez-Martín in the Centre for Occupational and Environmental Health of the University of Manchester. The content of this article is part of his Ph.D. thesis which was conducted within the doctoral programme “Clinical Medicine and Public Health” of the University of Granada.

REFERENCES

- Acladiou NN, Harrison KL, Sutton CJ, Povey AC, Mandal D, Kitchener H. 2004. Levels of the DNA adduct, N7-methyldeoxyguanosine, are associated with increased risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 93:605–609.
- Andre V, Goff J Le , Pottier D, Lebailly P, Peluso M, Munia A, Gauduchon P. 2007. Evaluation of bulky DNA adduct levels after pesticide use: Comparison between open-field farmers and fruit growers. *Toxicol Environ Chem* 89:125–139.
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. 2007. Human biomonitoring: State of the art. *Int J Hyg Environ Health* 210:201–228.
- Bartsch H. 1996. DNA adducts in human carcinogenesis: Etiological relevance and structure–activity relationship. *Mutat Res Genet Toxicol* 340:67–79.
- Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ, Sanin LH. 2007. Cancer health effects of pesticides. *Can Fam Physician* 53:1704–1711.
- Beach AC, Gupta RC. 1992. Human biomonitoring and the 32 P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053–1074.
- Bedford CT, Robinson J. 1972. The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica* 2:307–337.
- Bianchini F, Wild CP. 1994. 7-Methyldeoxyguanosine as a marker of exposure to environmental methylating agents. *Toxicol Lett* 72:175–184.
- Billson HA, Harrison KL, Lees NP, Hall CN, Margison GP, Povey AC. 2009. Dietary variables associated with DNA N7-methylguanine levels and O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity in human colorectal mucosa. *Carcinogenesis* 30:615–620.
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutat Res Mutat Res* 543:251–272.
- Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJP. 2009. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: Association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A* 72:986–997.
- Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA. 2009. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res* 678:76–94.
- Braun R, Schöneich J, Weissflog L, Dedek W. 1982. Activity of organophosphorus insecticides in bacterial tests for mutagenicity and DNA repair—Direct alkylation vs. metabolic activation and breakdown. I. Butonate, vinylbutonate, trichlorfon, dichlorvos, demethyl dichlorvos and demethyl vinylbutonate. *Chem Biol Interact* 39:339–350.
- Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. *Mutagenesis* 21:93–103.
- Crosbie PAJ, Watson AJ, Agius RM, Barber P V, Margison GP, Povey AC. 2012. Elevated N3-methylpurine-DNA glycosylase DNA repair activity is associated with lung cancer. *Mutat Res* 732:43–46.
- Crosbie PAJ, Harrison K, Shah R, Watson AJ, Agius RM, Barber P V, Margison GP, Povey AC. 2013. Topographical study of O(6)-alkylguanine DNA alkyltransferase repair activity and N7-

- methylguanine levels in resected lung tissue. *Chem Biol Interact* 204:98–104.
- Damalas CA, Eleftherohorinos IG. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 8:1402–1419.
- Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andrezza AC, et al. 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23:415–422.
- Dedek W, Grahl R, Schmidt R. 1984. A comparative study of guanine N7-alkylation in mice in vivo by the organophosphorus insecticides trichlorphon, dimethoate, phosmet and bromophos. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 55:104–109.
- Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3:1389–1407.
- Du L, Wang H, Xu W, Zeng Y, Hou Y, Zhang Y, Zhao X, Sun C. 2013. Application of ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomic techniques to analyze the joint toxic action of long-term low-level exposure to a mixture of organophosphate pesticides on rat urine profile. *Toxicol Sci* 134:195–206.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.
- FAO/WHO. 1994. Pesticide Residues in Food: 1993 Evaluations. II. Toxicology. FAO Plant Production and Protection. DiChlorvos. Rome: FAO.
- Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Krickler A, Turner J, Vajdic CM, Grulich A, Milliken S, Kaldor J, Armstrong BK. 2005. Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol* 162:849–857.
- Gallois J, Pottier D, Houssin M, Le Goff J, André V. 2011. DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides? *Environ Toxicol Pharmacol* 32:1–9.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 469:279–285.
- Garbellini GS, Uliana CV, Yamanaka H. 2013. Interaction of organophosphorus pesticides with DNA nucleotides on a boron-doped diamond electrode. *J Braz Chem Soc* 24:1942–1949.
- Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. 2011. Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. US-EPA (Environmental Protection Agency), Washington, USA (http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf)
- Hanke W, Jurewicz J. 2004. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: An overview of current epidemiological evidence. *Int J Occup Med Environ Health* 17:223–243.
- Harrison KL, Wood M, Lees NP, Hall CN, Margison GP, Povey AC. 2001. Development and application of a sensitive and rapid immunoassay for the quantitation of N7-methyldeoxyguanosine in DNA samples. *Chem Res Toxicol* 14:295–301.
- Hernández AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parrón T, Serrano JL, et al. 2003. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol* 22:565–574.
- Hernández AF, Parrón T, Serrano JL, Marín P. 2010. Epidemiological studies—Spain. In: Satoh T, Gupta RC, editors. *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology*. Hoboken (New Jersey, USA): Wiley. pp 495–508.
- Hernández AF, Parrón T, Alarcón R. 2011. Pesticides and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11:90–96.
- Hernández AF, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Gómez-Martín A, Lozano D, Pla A. 2013. Modulation of the endogenous antioxidants paraoxonase-1 and urate by pesticide exposure and genetic variants of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Food Chem Toxicol* 61:164–170.
- Ji G, Gu A, Wang Y, Huang C, Hu F, Zhou Y, Song L, Wang X. 2012. Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radic Biol Med* 52:775–780.
- Kanavouras K, Tzatzarakis MN, Mastorodemos V, Plaitakis A, Tsatsakis AM. 2011. A case report of motor neuron disease in a patient showing significant level of DDTs, HCHs and organophosphate metabolites in hair as well as levels of hexane and toluene in blood. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:399–404.
- 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.
- Khan OA, Gore M, Lorigan P, Stone J, Greystoke A, Burke W, Carmichael J, Watson AJ, McGown G, Thorncroft M, et al. 2011. A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 104:750–755.
- Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. 2010. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids* 2010:543531.
- Lees NP, Harrison KL, Hall CN, Margison GP, Povey AC. 2007. Human colorectal mucosal O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase activity and DNA-N7-methylguanine levels in colorectal adenoma cases and matched referents. *Gut* 56:380–384.
- Le Goff J, André V, Lebaillly P, Pottier D, Périn F, Périn O, Gauduchon P. 2005. Seasonal variations of DNA-adduct patterns in open field farmers handling pesticides. *Mutat Res* 587:90–102.
- Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. 2004. Associations between smoking, GST genotypes and N7-methylguanine levels in DNA extracted from bronchial lavage cells. *Mutat Res* 559:11–18.
- Lin IH, Chao MR, Hu CW, Ho ML, Huang JY, Lee HS, Chen CC, Wong RH. 2009. Modification of urinary N7-methylguanine excretion in smokers by glutathione-S-transferase M1 polymorphism. *Toxicology* 260:1–6.
- Liu Y-J, Huang P-L, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, Wong RH. 2006. GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:659–666.
- Loft S, Svoboda P, Kasai H, Tjønneland A, Møller P, Sørensen M, Overvad K, Autrup H, Raaschou-Nielsen O. 2007. Prospective study of urinary excretion of 7-methylguanine and the risk of lung cancer: Effect modification by mu class glutathione-S-transferases. *Int J Cancer* 121:1579–1584.
- Lucero L, Pastor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus a, Marcos R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: Micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 464:255–262.
- Mehl A, Schanke TM, Johnsen B a, Fonnum F. 1994. The effect of trichlorfon and other organophosphates on prenatal brain development in the guinea pig. *Neurochem Res* 19:569–574.
- Mostafalou S, Abdollahi M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol* 268:157–177.
- Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:379–385.

- Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. 2014. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett* 230:157–165.
- Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C, Marcos R. 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: Results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ Mol Mutagen* 40:101–109.
- Peluso M, Merlo F, Munnia A, Bolognesi C, Puntoni R, Parodi S. 1996. (32)P-postlabeling detection of DNA adducts in peripheral white blood cells of greenhouse floriculturists from western Liguria, Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:361–369.
- Pérez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, Solís-Heredia MJ, Hernández-Ochoa I, Rojas-García E, Alvarado-Mejía J, Borja-Aburto VH, Quintanilla-Vega B. 2008. PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* 230:261–268.
- Ray DE, Richards PG. 2001. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol Lett* 120:343–351.
- Saad AA, O'Connor PJ, Mostafa MH, Metwalli NE, Cooper DP, Margison GP, Povey AC. 2006. Bladder tumor contains higher N7-methylguanine levels in DNA than adjacent normal bladder epithelium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:740–743.
- Saffhill R, Margison GP, O'Connor PJ. 1985. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim Biophys Acta* 823:111–145.
- Salama SA, Abdel-Rahman SZ, Sierra-Torres CH, Hamada FA, Au WW. 1999. Role of polymorphic GSTM1 and GSTT1 genotypes on NNK-induced genotoxicity. *Pharmacogenetics* 9:735–743.
- Santella RM. 2006. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1585–1587.
- Singh S, Kumar V, Vashisht K, Singh P, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A. 2011. Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6, and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides *Toxicol Appl Pharmacol* 257:84–92.
- Singh S, Kumar V, Singh P, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A. 2012. Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat Res* 741:101–108.
- Stocks SJ, Agius RM, Cooley N, Harrison KL, Brison DR, Horne G, Gibbs A, Povey AC. 2010. Alkylation of sperm DNA is associated with male factor infertility and a reduction in the proportion of oocytes fertilised during assisted reproduction. *Mutat Res* 698:18–23.
- Van Delft JHM, van Weert EJM, Schellekens MM, Claassen E, Baan RA. 1991. The isolation of monoclonal antibodies selected for the detection of imidazole ring-opened N7-ethylguanine in purified DNA and in cells in situ. Crossreaction with methyl, 2-hydroxyethyl and sulphur mustard adducts. *Carcinogenesis* 12:1041–1050.
- Van Delft JHM, Steenwinkel M-JST, De Groot AJL, Van Zeeland AA, Eberle-Adamkiewicz G, Rajewsky MF, Thomale J, Baan RA. 1997. Determination of N7- and O6-methylguanine in rat liver DNA after oral exposure to hydrazine by use of immunochemical and electrochemical detection methods. *Toxicol Sci* 35:131–137.
- Verly WG, Brakier L. 1970. Molecular mechanism of the toxic action of alkylating agents. *Rev Eur Etud Clin Biol* 15:483–488.
- Verschaeve L, Koppen G, Gorp U Van, Schoeters G, Jacobs G, Zwijnen C. 2007. Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals. *J Appl Toxicol* 27:612–620.
- Weichenthal S, Moase C, Chan P. 2010. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environ Health Perspect* 118:1117–1125.
- Whittaker M. 1984. Cholinesterases. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grafi M, editors. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 4: *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag-Chemie. pp 52–74.
- Wiaderekiewicz R, Walter Z, Reimschuessel W. 1986. Sites of methylation of DNA bases by the action of organophosphorus insecticides in vitro. *Acta Biochim Pol* 33:73–85.
- Wild D. 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat Res Genet Toxicol* 32:133–149.
- Wooder MF, Wright AS. 1981. Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 49 (Suppl 5):51–55.
- 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.
- Yaduvanshi SK, Srivastava N, Marotta F, Jain S, Yadav H. 2012. Evaluation of micronuclei induction capacity and mutagenicity of organochlorine and organophosphate pesticides. *Drug Metab Lett* 6:187–197.
- Zayed SM, Mahdi FM. 1987. Methylation of guanine in vivo by the organophosphorus insecticide methamidophos. *Zeitschrift für Naturforschung Sect C Biosci* 42:17–20.
- Zhang X, Wallace AD, Du P, Kibbe WA, Jafari N, Xie H, Lin S, Baccarelli AA, Soares MB, Hou L. 2012. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environ Mol Mutagen* 53:542–549.

Accepted by—
V. Arlt