

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL,  
TOXICOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA



**INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A PLAGUICIDAS SOBRE  
DIVERSOS MARCADORES BIOQUÍMICOS (ESTERASAS Y ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES ) EN TRABAJADORES DE INVERNADERO DE LA COSTA  
ORIENTAL DE ANDALUCÍA**

*Memoria presentada por*  
**OLGA LÓPEZ GUARNIDO**  
*Para conseguir el grado de*  
**Doctora en Farmacia**

Granada, Marzo 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Olga López Guarnido  
D.L.: Gr. 483 - 2005  
ISBN: 84-338-3294-8

---

ABREVIATURAS .....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. CONCEPTOS GENERALES .....	3
2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS .....	4
2.1. Efectos tóxicos agudos .....	5
2.2. Efectos tóxicos crónicos .....	5
3. LAS IMPLICACIONES TÓXICAS DEL USO DE PLAGUICIDAS EN LA AGRICULTURA INTENSIVA DE LA COSTA DEL SURESTE DE ESPAÑA (PROVINCIAS DE ALMERIA Y GRANADA).....	9
3.1. Características de la agricultura intensiva en esta zona en relación con el uso de plaguicidas.....	9
3.2. Riesgos e implicaciones de carácter tóxico.....	11
A) Factores de exposición y toxicidad .....	11
B) Plaguicidas más frecuentemente implicados en las intoxicaciones.....	14
C) La incidencia de intoxicaciones.....	15
4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE EXPOSICIÓN, EFECTO Y SUSCEPTIBILIDAD EN LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS .....	18
5. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	25
5.1. Oxidantes, radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	25
5.2. Fuentes de radicales libres en la naturaleza.....	27
5.3. Acción de los oxidantes en los organismos vivos. Daño oxidativo a biomoléculas.9	
5.4. Defensa frente a los radicales libres: papel de los antioxidantes.....	32

---

5.5. Estrés oxidativo y patologías relacionadas.....	34
5.6. Estrés oxidativo y exposición a plaguicidas.....	34
ANTECEDENTES.....	37
1. ESTERASAS PLASMÁTICAS.....	39
1.1. Colinesterasas.....	39
A) Estudios epidemiológicos .....	42
B) Colinesterasas y utilización de EPIs.....	49
C) Fenotipado sérico de colinesterasa.....	51
1.2. Paraoxonasa (PON1).....	53
A) Estudios epidemiológicos de exposición a plaguicidas y genotipos PON1.....	58
2. ENZIMAS DE ESTRÉS OXIDATIVO INTRAERITROCITARIAS.....	61
2.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	61
2.2. Glutation reductasa (GR) .....	62
2.3. Catalasa (CAT).....	63
2.4. Glutation Peroxidasa (GPx) .....	65
2.5. Superóxido Dismutasa (SOD).....	67
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	69
1. JUSTIFICACIÓN.....	71
2. OBJETIVOS.....	73
MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1.1. Sujetos de estudio.....	77

---

1.2. Clasificación de los sujetos .....	77
1.3. Protocolo de reclutamiento.....	78
2. MÉTODOS DE LABORATORIO .....	80
2.1. Preparación de las muestras.....	80
2.2. Ensayos enzimáticos.....	81
2.3. Determinación de actividades enzimáticas eritrocitarias.....	81
A) Acetilcolinesterasa (AChE).[EC 3.1.1.7] .....	81
B) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). [EC 1.1.1. 49] .....	83
C) Glutación reductasa (GR). [EC 1.6.4.2].....	86
D) Catalasa (CAT). [EC 1.11.1.6.].....	88
E) Glutación Peroxidasa (GPx). [EC 1.11.1.9] .....	90
F) Superóxido dismutasa (SOD). [EC 1.15.1.1].....	94
2.4. Determinación de actividades enzimáticas plasmáticas. ....	99
A) Paraoxonasa, (PON1).[EC 3.1.8.1]. Este enzima se determinó utilizando tres sustratos diferentes: paraoxón, fenilacetato y diazoxón. ....	99
B) Benzoilcolinesterasa plasmática (BeChE).[EC 3.1.1.8].....	106
2.5. Fenotipado de la colinesterasa plasmática (BeChE).[EC 3.1.1.8].....	108
2.6. Fenotipado de la paraoxonasa plasmática (Poasa). [E.C. 3.1.8.1].....	112
3. CÁLCULO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS. ....	113
4. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	115
4.2. Análisis bivariante:.....	115
4.3. Análisis multivariante:.....	116

---

RESULTADOS.....	119
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.....	121
1.1. Sujeto de estudio.....	121
1.2. Sexo.....	121
1.3. Edad.....	123
1.4. IMC .....	124
1.5. Años de exposición. ....	126
1.6. Días fumigados el último año.....	128
1.7. Superficie de invernadero cultivada.....	129
1.8. Síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas.....	130
1.9. Intoxicación previa por plaguicidas. ....	131
1.10. Utilización de plaguicidas anticolinesterásicos.....	132
1.11. Medidas de protección personal.....	135
1.12. Protección durante la preparación del caldo. ....	136
1.13. Protección durante la fumigación.....	138
1.14. Consumo de tabaco. ....	139
1.15. Consumo de alcohol.....	140
1.16. Fenotipo plasmático de paraoxonasa.....	142
1.17. Cociente paraoxonasa/arilesterasa (POasa/ArE).....	144
1.18. Fenotipo plasmático BeChE.....	146
2. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ESTUDIADAS .....	147

---

3. ENZIMAS PLASMÁTICAS.....	158
3.1. Benzoilcolinesterasa (BeChE).....	158
3.2. Arilesterasa (ArE).....	163
3.3. Paraoxonasa basal (POasa).....	169
3.4. Paraoxonasa salina (ssPOasa).....	174
3.5. Diazoxonasa (DZOasa) .....	179
4. ENZIMAS ERITROCITARIAS .....	186
4.1. Acetilcolinesterasa (AChE).....	186
4.2. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	193
4.3. Glutation reductasa (GR).....	199
4.4. Catalasa (CAT).....	205
4.5. Glutation peroxidasa (GPx).....	211
4.6. Superóxido dismutasa (SOD).....	215
5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE .....	222
DISCUSIÓN.....	223
1. PERFIL DE LA MUESTRA .....	225
2. ASPECTOS CLÍNICOS.....	225
3. ESTERASAS SANGUÍNEAS Y EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS .....	227
3.1. Paraoxonasa (PON1) .....	227
3.2. Acetilcolinesterasa (AChE).....	230
3.3. Benzoilcolinesterasa (BeChE).....	239

4. ENZIMAS ANTIOXIDANTES INTRAERITROCITARIAS.....	247
4.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) .....	248
4.2. Glutation reductasa (GR) .....	251
4.3. Catalasa (CAT).....	254
4.4. Glutation peroxidasa (GPx).....	257
4.5. Superóxido dismutasa (SOD).....	259
CONCLUSIONES .....	263
BIBLIOGRAFÍA.....	269
ANEXO .....	299



**ABREVIATURAS**

AChE: acetilcolinesterasa.

ADN : ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

ADP: adenosina difosfato.

AGE: glicosilación avanzada.

ArE: arilesterasa.

ARN: ácido ribonucleico.

ATP: adenosina trifosfato

BeChE: benzoilcolinesterasa plasmática.

CAT: catalasa.

DDT: insecticida organoclorado (diclorodifeniltricloroetano).

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.

DZOasa: diazoxonasa.

EDTA: ácido edético (ácido etilendiaminotetraacético)..

ERO: especies reactivas de oxígeno.

FAD: flavina adenina dinucleótido (forma oxidada).

FADH<sub>2</sub>: flavina adenina dinucleótido (forma reducida).

G-6-P: glucosa-6-fosfato.

G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

GPx: glutatión peroxidasa.

GR: glutatión reductasa.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

GST: glutatión-s-transferasa.

HCH: hexaclorociclohexano.

HO-1: hemo-oxigenasa-1.

IMHP: 2-isopropil-4-metil-6-hidroxi pirimidina.

INT: cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LPO: peroxidación lipídica.

MAO: monoaminooxidasa.

MDA: aldehído malónico.

MDMA: 3,4-metilendioxi metanfetamina (extasis).

NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada).

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida).

NC: número de cloruro sódico.

ND: número de dibucaína.

NF: número de fluoruro sódico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

OP: organofosforado.

PON 1: paroxonasa.

PONasa: paraoxón-hidrolasa.

RL: radical libre.

SOD: superóxido dismutasa.

TBARS: ácido tiobarbitúrico.

$\chi^2$ : Chi-cuadrado.

n : tamaño de muestra.

N: tamaño de la población.

IMC: índice de masa corporal.

$R^2$  : El coeficiente de determinación , que mide la proporción de variabilidad del Ingreso que es explicada mediante el Modelo de Regresión.

Hcto: hematocrito.

ssPOasa: paraoxonasa salina

Hb: hemoglobina.

ANOVA: Análisis of Variance.

## INTRODUCCIÓN



## 1. CONCEPTOS GENERALES

Según la FAO (1986), un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar las acciones perjudiciales originadas por animales, vegetales y microorganismos nocivos. Incluye herbicidas, fungicidas, rodenticidas y reguladores del crecimiento vegetal. Actualmente existen más de 100.000 formulaciones en todo el mundo, sobre unos 1.500 principios activos conocidos por casi 6.000 nombres comerciales diferentes.

La fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas está regulada en España por el Real Decreto 3349/83, modificado posteriormente por el Real Decreto 162/1991 y 443/1994. En ellos se establecen los aspectos básicos en todo lo referente al manejo de estos productos, y se define a los plaguicidas como aquellas sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a la destrucción, control o prevención de plagas. Por otra parte, el Real Decreto 1054/2002 regula el procedimiento de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas resultado de la transposición de la directiva 98/8/CE sobre dicha materia.

Los plaguicidas constituyen un importante riesgo sanitario ya que dan lugar a un tipo de intoxicación muy frecuente, sobre todo en el medio rural. Un claro ejemplo de ello es, precisamente, nuestra zona de Granada y Almería, donde se produce el mayor índice de estas intoxicaciones a nivel nacional.

Aunque está claro que el uso de plaguicidas como compuestos fitosanitarios, desinfectantes veterinarios, etc. puede dar lugar a exposición y contaminación (intencional o no) del ambiente, de los animales y del hombre, hay que reconocer, asimismo, que la contribución de los plaguicidas a la mejora de la calidad y cantidad de alimentos, así como a la mejora de la salud en países desarrollados y, muy especialmente, en aquellos otros en vías de desarrollo, compensa sus posibles efectos tóxicos a corto y largo plazo.

## 2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS

Los efectos agudos sistémicos son, como sabemos, los más importantes que pueden producir los plaguicidas, sin embargo no hay que olvidar que muchos de estos compuestos (o sus contaminantes volátiles) también pueden producir reacciones locales tras una exposición tópica sobre los ojos, la piel o el tracto respiratorio (O'Malley, 1997). Estos efectos son dignos de consideración porque muchos individuos expuestos pueden presentar reacciones tóxicas locales en ausencia de sintomatología sistémica. Los plaguicidas constituyen un grupo muy amplio de sustancias con una gran variedad de efectos tóxicos potenciales. Además, existe un gran número de ellos cuya toxicidad humana nunca ha sido adecuadamente evaluada, lo cual es especialmente preocupante a la vista de las informaciones y estudios existentes acerca de los efectos diferidos sobre el Sistema Nervioso (Legaspi y Zenz, 1994). La utilización de gran cantidad de productos en función de la plaga, la distancia a la recolección y el período estacional, hace difícil cuantificar la exposición. Además, hay que considerar la utilización de mezclas por parte de los agricultores y el uso irregular de prendas de protección, sobre todo por la variabilidad de temperaturas. En definitiva, es difícil cuantificar y evaluar los efectos de la exposición, sobre todo la que origina intoxicación crónica (Parrón, 1994).

Los plaguicidas difieren entre sí en el modo de acción, captación por el organismo, metabolismo, eliminación y toxicidad para el hombre. En el caso de plaguicidas de elevada toxicidad aguda pero que son fácilmente metabolizados y eliminados, el principal riesgo radica en las exposiciones agudas, es decir, las que se producen en cortos períodos de tiempo. Otros productos, por el contrario, presentan una menor toxicidad aguda, pero tienen una gran tendencia a acumularse en el organismo, de ahí que sus principales riesgos tóxicos estén en relación con la exposición crónica a bajas concentraciones. Existe también un tercer grupo de plaguicidas que, a pesar de ser rápidamente eliminados, inducen efectos biológicos persistentes, de ahí que presenten un riesgo especial tras la exposición crónica a dosis bajas.

## 2.1. Efectos tóxicos agudos

Puede ser que la exposición a concentraciones habituales de plaguicidas no sea lo suficientemente intensa como para producir efectos agudos en los aplicadores. Los estudios epidemiológicos sobre sus efectos agudos deberían interpretarse con cuidado dada la existencia de sesgos de información por parte de los fumigadores y la relativamente baja concentración de plaguicidas a la que están expuestos. Habría que tener en cuenta, además, que los fumigadores y los agricultores en general no están expuestos sólo a una clase de plaguicidas sino que, con frecuencia, lo están a varios de ellos y, en especial, a mezclas. La toxicidad aguda de los distintos grupos de plaguicidas es bien conocida en la mayoría de los casos, especialmente en los organoclorados, organofosforados y carbamatos. (Para una revisión detallada ver Gómez Vidal, 2000; Hernández, 2005).

## 2.2. Efectos tóxicos crónicos

Desde la perspectiva de este trabajo, la exposición crónica de fumigadores en invernadero, es mucho más interesante la posibilidad de la aparición de efectos crónicos, por lo que vamos a centrarnos en este aspecto.

La *toxicidad crónica* de los plaguicidas en humanos incluye diferentes efectos (Hodgson y Levi, 1996; Maroni y Fait, 1993; Delgado Rodríguez, 2003): carcinogénesis, neurotoxicidad, efectos reproductivos, sobre el desarrollo y efectos inmunológicos. Analizaremos a continuación los principales efectos que, sobre la salud humana, pueden producir:

1. *Carcinogénesis*. Los estudios toxicológicos de carcinogenicidad de ciertos grupos de plaguicidas en animales y el hombre, así como la importante exposición a los mismos por

parte del hombre han dado lugar a una especial preocupación desde el punto de vista epidemiológico. La toxicidad de los plaguicidas, a nivel metabólico y genético, no se conoce todavía con precisión. Estudios preliminares sobre una amplia serie de plaguicidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas) parecen indicar que se trata de sustancias tóxicas, pero no buenos iniciadores tumorales a la vista de los resultados negativos o débilmente positivos en estudios genéticos. Sin embargo, estudios bioquímicos e inmunoquímicos parecen indicar que estos agentes tienen un potencial efecto cocarcinogénico y promotor, pudiendo actuar en cualquiera de los múltiples niveles que existen en el proceso de carcinogénesis. Las investigaciones más recientes señalan que entre los procesos neoplásicos que pueden producir los plaguicidas sobre el hombre destacan: cáncer de vejiga, de cerebro, mama, digestivo, hepático, pulmón, tejidos blandos, etc.

2. *Neurotoxicidad.* E la actualidad, se conocen muy bien los efectos neurotóxicos agudos y subagudos de la intoxicación por insecticidas organofosforados: síndrome colinérgico, síndrome intermedio y polineuropatía retardada. Por el contrario, aún no se conocen del todo las posibles secuelas neuropsicológicas secundarias a la exposición a insecticidas. Así, se han descrito alteraciones transitorias en determinadas pruebas neuropsicológicas (esfera afectiva, destreza psicomotriz) que aparecían sólo durante la temporada de aplicación o manipulación de plaguicidas. El significado de estos síntomas inespecíficos no está del todo claro, ya que estudios de seguimiento de estos trabajadores semanas después de haber cesado la exposición a plaguicidas revelaban ausencia de aquellos síntomas.

Aún hoy, y desde la década de los sesenta, persiste la controversia sobre si los efectos neuropsicológicos de los organofosforados permanecen incluso después de recuperarse de una intoxicación por estos productos. Estudios más recientes encuentran *déficit* en la memoria y en la capacidad de abstracción, baja puntuación en baterías de test y descensos subclínicos en la sensibilidad vibrotáctil durante la convalecencia de trabajadores que han sufrido una intoxicación aguda por insecticidas organofosforados, incluso a pesar de que la exploración

---

clínica y neurológica de estos pacientes era normal. Con respecto a los trabajadores que manipulan organofosforados pero que no han sufrido episodios tóxicos, algunos estudios han señalado déficits subclínicos similares en la esfera neurocomportamental y anomalías subclínicas del EEG (O'Malley, 1997).

Existen estudios sobre los efectos crónicos de la intoxicación por organofosforados que han puesto de manifiesto algunos efectos a largo plazo, especialmente en la ejecución de funciones en las que están implicados tanto el sistema nervioso central como el periférico, confirmando así anteriores hallazgos. Y, al mismo tiempo, hay que señalar que existen también estudios que indican que la exposición continua a bajas dosis de plaguicidas (especialmente compuestos organofosforados) no produce efectos significativos sobre la salud (Alavanja et al, 2004).

Como sabemos, los ganaderos están expuestos a organofosforados, durante la práctica del denominado "*baño de la oveja*" (sheep dipping) para controlar determinadas infecciones por ectoparásitos que pueden mermar la producción ganadera, tanto de leche como de carne o lana. El *baño de la oveja* es una operación sucia y complicada, que hace a los ganaderos reacios a usar las prendas de protección adecuadas y evitar así la contaminación de la piel (principal vía de absorción en esta práctica). Pues bien, estudios recientes señalan que algunos ganaderos pueden presentar efectos crónicos por la exposición a largo plazo de organofosforados, especialmente síntomas sensitivos y, en menor medida, signos sensitivos (Pilkington et al, 2001).

3. *Efectos reproductivos*. Muchos productos usados como plaguicidas tienen un efecto "disruptor" sobre la actividad endocrina (Choi et al, 2004). Xenobióticos estructuralmente similares a hormonas pueden actuar como agonistas o antagonistas de los receptores de hormonas endógenas. Los plaguicidas pueden presentar estos efectos, pero no a través de una exposición única durante el embarazo, sino por medio de pequeñas dosis continuas, capaces de acumularse en el tejido adiposo durante la vida de la mujer. En el embarazo, cuando la demanda nutricional aumenta, los depósitos de grasa se movilizan y las moléculas acumuladas

en este tejido, incluyendo aquéllas con actividad disruptora endocrina, se vierten al torrente sanguíneo desde donde difunden a los tejidos diana.

4. *Efectos sobre el desarrollo.* Se pueden presentar efectos adversos sobre el organismo en desarrollo, que pueden resultar de la exposición a plaguicidas de cualquier progenitor antes de la concepción, de la exposición de la madre durante el periodo gestacional o de exposiciones posteriores al nacimiento, durante la maduración sexual (Choi et al, 2004).

Si bien el riesgo de *toxicidad crónica* se presenta con frecuencia en los que desempeñan actividades agrarias, especialmente *agricultura intensiva*, resulta mucho más difícil de demostrar en la población general, expuesta a residuos de plaguicidas principalmente a través de la dieta (comida y agua de beber). Por otra parte, y dada la baja incidencia de efectos tóxicos, no hay pruebas concluyentes de los mecanismos tóxicos correspondientes, o, al menos, se desconoce el mecanismo patogénico concreto, a nivel biológico-molecular, que se produce en estos casos (Hodgson y Levi, 1996).

Aunque la información disponible es abundante, las limitaciones y dificultades para la identificación de los efectos crónicos de los plaguicidas son muchas, entre ellas: problemas en la valoración de la exposición, problemas en la determinación del efecto y, por último, problemas de diseño (Delgado Rodríguez, 2003).

---

### **3. LAS IMPLICACIONES TÓXICAS DEL USO DE PLAGUICIDAS EN LA AGRICULTURA INTENSIVA DE LA COSTA DEL SURESTE DE ESPAÑA (PROVINCIAS DE ALMERIA Y GRANADA)**

#### **3.1. Características de la agricultura intensiva en esta zona en relación con el uso de plaguicidas**

Andalucía ocupa la primera posición en España en cuanto a consumo de plaguicidas, con una gran variedad de formas de cultivo y amplias zonas en donde se utilizan, sobre todo en la costa oriental que ha experimentado un importante aumento de la “agricultura intensiva” en forma de invernaderos (tipo de agricultura caracterizado por una fuerte explotación de la tierra y un incremento notable en la utilización de plaguicidas). Con el agravante añadido de que las condiciones en las que se realizan esas actividades agrícolas (bajo plástico, con altas temperaturas y escasa circulación de aire, etc.), dificultan la adopción de las medidas preventivas recomendadas como, por ejemplo, no usar la ropa adecuada por las altas temperaturas que se sufren, lo que unido al alto porcentaje de población laboral inmigrante extranjera que se emplea en estas tareas hace que estas recomendaciones de salud e higiene laboral prácticamente no lleguen, o no se apliquen, en el caso de este sector de trabajadores. En relación con este sector productivo, numerosas investigaciones apuntan, como ya hemos señalado anteriormente, a que el uso incorrecto de los plaguicidas puede plantear problemas graves para el hombre a medio y largo plazo (neurotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, efectos en el hígado, alteraciones hormonales, alteraciones del sistema inmunológico, efectos transplacentarios, etc.). Además hay que recordar que la población potencialmente expuesta no comprende sólo los aplicadores de estas sustancias (aunque, evidentemente, el grupo de alto riesgo lo constituyen los trabajadores agrícolas que usan estos productos para la protección de sus cultivos), ya que un uso incorrecto de estas

sustancias también puede producir un problema de contaminación medioambiental y extenderse la intoxicación a aquellas personas que se expongan a ella, bien por vía respiratoria (al sobrepasarse los niveles máximos permitidos en el aire), o bien, por vía digestiva, al consumir alimentos con niveles de sustancias tóxicas superiores a los admitidos (Guillén Enríquez et al, 2003).

La mejora sustancial, en el plano económico, que se ha producido en los últimos años en las zonas costeras del sureste de España (provincias de Almería y Granada) se basa fundamentalmente en la transformación que ha experimentado en estas zonas la agricultura, que ha pasado de usar métodos de labranza tradicionales a la utilización de métodos de alta tecnología. De esta manera, unas zonas que, en su gran mayoría, se caracterizaban por unos suelos de mala calidad, con escasez e irregularidad de lluvias, además de poseer pocos recursos hidráulicos de superficie y sufrir fuertes vientos (lo que hacía que la producción agraria fuera escasa y con poco valor), han pasado a ser zonas de gran riqueza, con una gran productividad agrícola y un notable incremento en su valor económico (Fernández, 1995).

Las tierras costeras del Poniente Almeriense son las de mayor densidad de cultivos bajo plástico del mundo. Es una zona que tiene una longitud aproximada de 30 Km y una anchura máxima de unos 13 Km (desde la playa hasta la base de la Sierra de Gádor), con una superficie de cultivo de unas 25.000 Ha, lo que supone el 80% del total nacional (Parrón, 1994).

En cuanto a la provincia de Granada, los cultivos de invernadero se concentran sobre todo en la franja costera situada al este de Motril. No hay datos exactos de la superficie dedicada a este tipo de cultivo, aunque se puede tomar como referencia la estimación que hace el Centro de Seguridad e Higiene en el Trabajo que cifra en 1500 Ha la extensión ocupada por los invernaderos (Marín, 1994). De todos modos, lo que sí está claro es que en el litoral granadino se está llevando a cabo un proceso de desplazamiento y sustitución de los cultivos

tradicionales subtropicales por cultivos intensivos bajo plástico, lo que está produciendo un aumento muy considerable de Has de invernadero en muy poco tiempo.

Evidentemente, este espectacular desarrollo ha ido acompañado de una gran inversión económica. Lógicamente, las campañas anuales entre mano de obra, reposición de plásticos, mantenimiento de instalaciones, abonos, semillas, etc. suponen un gran riesgo económico que no se puede dejar a expensas de las posibles plagas que puedan afectar a los cultivos. En consecuencia con este planteamiento, se utilizan de forma masiva plaguicidas buscando la mayor protección de los productos hortofrutícolas. La agricultura intensiva acapara un 20 % del gasto nacional total de plaguicidas, siendo Andalucía (alrededor de un 30 % del total) la región española que realiza un mayor consumo de dichos productos (Parrón, 1994).

### **3.2. Riesgos e implicaciones de carácter tóxico**

#### **A) Factores de exposición y toxicidad**

---

La aparición de un gran número de plagas, que pueden poner en riesgo las cosechas, se ve favorecida por las especiales características de los invernaderos (recinto cerrado, elevada temperatura y alta humedad). Por ello se emplea una gran cantidad de plaguicidas, en muchos casos excesiva, y mediante unas aplicaciones en las que por lo general no se utilizan los medios de protección adecuados, lo que hace que las intoxicaciones agudas por estos productos sean muy frecuentes en las zonas de agricultura intensiva. Además, hay que considerar los posibles efectos a largo plazo en la población laboral que los maneja, por estar expuestos de forma crónica a los mismos por diferentes vías (cutánea, respiratoria e incluso digestiva).

Desde hace más de 20 años los insecticidas organofosforados han sustituido a los

organoclorados; pues se valoró especialmente que, como grupo, presentaban una escasa toxicidad crónica debido a la rápida hidrólisis y a un desfavorable coeficiente de partición en relación a los lípidos. Pero, precisamente por estas razones y dado la mayor producción y uso de los organofosforados que ello conllevó, nos encontramos con que se ha producido un incremento paralelo en el número de personas expuestas a estos compuestos. Por lo dicho anteriormente, los plaguicidas más usados en las zonas de agricultura intensiva fueron en un principio los organofosforados, aunque en la actualidad están siendo desplazados por los piretroides y el organoclorado endosulfán. Igualmente, ha aumentado el uso de fungicidas y diversas mezclas de productos, algunas de ellas preparadas comercialmente, aunque la mayoría de las mezclas que se emplean las elaboran los propios agricultores a partir de los productos comerciales. En el Poniente Almeriense, el número medio de plaguicidas utilizados por campaña era, a mitad de la década de los noventa, de 20 (Parrón, 1994).

Por otra parte, el número medio de aplicaciones por campaña ha variado, aunque la tendencia es a crecer. Haciendo un recorrido temporal, nos encontramos con que en 1986 era de 9, en 1987 de 14, en 1988 de 19 y a mitad de la década de los noventa de 24. Aunque el número de veces que se fumiga vemos que va en aumento, el número de horas dedicadas al tratamiento está más estabilizado, quizás debido a la mejora tecnológica de los medios empleados para fumigar. El tiempo necesario para tratar una Ha es muy variable, pudiendo oscilar desde 6 hasta 12-14 horas (Parrón, 1994). Esta variación en el tiempo de tratamiento, y por tanto en el tiempo de exposición, está también, lógicamente, en función de que los trabajadores encargados de estas tareas sean fumigadores habituales o esporádicos (estos últimos son generalmente agricultores que se dedican a todas las faenas necesarias en el invernadero, incluidos los procesos de fumigación).

En resumen, los agricultores, debido a las diferentes propiedades de los productos que manejan y en función asimismo de los distintos cultivos y trabajos que realizan, presentan un patrón muy heterogéneo de exposición a plaguicidas. Los fumigadores habituales y los manipuladores de estos compuestos son los que presentan mayor riesgo, ya que manejan

fórmulas concentradas a partir de las cuales preparan las soluciones diluidas que posteriormente sirven para las aplicaciones. Por todo ello, estos trabajadores constituyen el grupo de mayor riesgo de cara a sufrir la toxicidad de los plaguicidas. Los fumigadores y manipuladores presentan un patrón complejo de exposición, que incluye plaguicidas, disolventes, ingredientes inertes, emulsionantes, y demás constituyentes de la formulación del producto, así como los residuos y compuestos intermediarios que se producen durante la fabricación de las mezclas.

Un estudio realizado en los años noventa por Cabello (1996), acerca de la utilización de plaguicidas en los invernaderos del sur de España y referido a las campañas de los años 1991/92 y 1992/93, considera que el consumo de plaguicidas es elevado (su coste representa un valor que oscila desde 69.700 a 388.500 de las antiguas pesetas por Ha, según el cultivo) debido no sólo a la alta incidencia de las plagas y enfermedades que deben ser controladas en los cultivos sino también a la alta rentabilidad de los productos y al especial comportamiento en este aspecto de los agricultores. Los dos grupos de plaguicidas más utilizados fueron: a) *insecticidas/ acaricidas* (destacan 8 productos: endosulfán, metomilo, abamectina, metiocarb, cipermetrina, *Bacillus thuringiensis*, imidacloprid y ciromazina); y b) *funguicidas* (destacan 7 productos: azufre, zineb, cobre, maneb, mancozeb, cimoxanilo y procimidona). Con respecto a la frecuencia de utilización de los distintos plaguicidas, los funguicidas representan el mayor porcentaje, concretamente un 51% del total de los tratamientos fitosanitarios, seguidos por los insecticidas/acaricidas, que representaron un 40%. En este trabajo se hace una evaluación toxicológica y medioambiental en base a la toxicidad de los productos utilizados y al número medio de tratamientos realizados según la naturaleza del cultivo; estimándose en él que los productos insecticidas-acaricidas, de uso frecuente, representan un “riesgo medio” para la salud humana (porque sólo el 25% de las aplicaciones se realizan con materias activas de baja peligrosidad), mientras que en el caso de los funguicidas, los peligros para la salud humana, utilizando el mismo criterio, son considerados como de “riesgo bajo” (ya que más del 65% de los productos utilizados son de baja peligrosidad). Por otra parte, en las campañas estudiadas

el número medio de tratamientos varió entre 7 y 16, según el cultivo, empleándose para cada uno de ellos un tiempo por persona que osciló entre 24 y 95 horas durante todo el ciclo de cultivo, lo cual es bastante elevado, y más aún, si tenemos en cuenta que en algunos casos existen dos cultivos por campaña (Cabello, 1996).

Por otro lado, las elevadas temperaturas que se alcanzan dentro del invernadero (superiores en algunos momentos a los 50°C), hacen que las medidas de protección sean inadecuadas cuando no nulas en la mayoría de los fumigadores. Igualmente, la edad tan precoz a la que se comienzan a fumigar así como el elevado número de años que se dedican a esta actividad, es también un factor importante en cuanto a la toxicidad, especialmente a largo plazo. Hay que considerar también, dentro de los peligros y gravedad de la exposición a los plaguicidas, los hábitos y comportamientos inadecuados, como el fumar, comer, etc. durante la fumigación. Por último, vistos los datos, estudios e informes a los que hemos venido aludiendo, se puede concluir que los agricultores de invernadero presentan una alta exposición a los productos fitosanitarios, tanto por los tiempos empleados como por la forma poco correcta de realizar las aplicaciones (lo cual se agrava por efectuarse en recintos cerrados y, en ocasiones, utilizando varias materias activas a la vez).

## **B) Plaguicidas más frecuentemente implicados en las intoxicaciones**

---

Marín (1994) en su trabajo sobre “intoxicaciones agudas por el uso de plaguicidas en los cultivos de la costa granadina”, en el que recoge el análisis de 41 casos de estas intoxicaciones, al hacer referencia a los grupos de plaguicidas que fueron responsables de ellas, consigna los siguientes: carbamatos (el 35%), derivados del bupiridilo (el 23%) y organofosforados (el 15%). Los productos responsables de la intoxicación se aplicaban tanto solos (el 41% de las veces), como en mezclas de varios de ellos (el 38% de los casos), y había veces en que el producto responsable de la intoxicación no aparecía registrado en la “historia

clínica hospitalaria” correspondiente (hecho que se presentaba en el 21 % de los casos).

Por otra parte, en un trabajo sobre “la toxicidad de los plaguicidas”, publicado recientemente por Hernández y Pla (2003), se señala que, en nuestro medio y a lo largo de los años 2000 y 2001, se han contabilizado un total de 266 “intoxicaciones agudas” en las que ha sido posible identificar el plaguicida o plaguicidas responsables, pues no es raro observar casos de intoxicaciones con dos o tres, e incluso cuatro, productos comercializados (en ocasiones, algunos de esos productos está constituido por mezclas de dos ingredientes activos, es decir de dos plaguicidas). Los principales plaguicidas implicados, en orden descendente, son los siguientes: carbamatos (suponen el 48% de todas las intoxicaciones), organofosforados (13%), endosulfán (un insecticida organoclorado, un 8%), piretroides (8%), insecticidas neonicotinoides (imidacloprid y acetamiprid, un 6,4%), insecticidas inhibidores de la síntesis de quitina (fenilbenzoilureas, un 5,6%), piridaben (4,5%), abamectina (3,8%), paraquat (3,8%), piriproxifén (3,8%), *Bacillus thuringiensis* (3,0%), fungicidas ditiocarbamatos (3,0%), derivados de la formamidina (1,9%), y tebufenozida (1,5%); también se han identificado algunos otros compuestos, pero no se señalan por haberse presentado sólo una o dos veces.

### **C) La incidencia de intoxicaciones.**

---

En la zona del Poniente Almeriense se han registrado un elevado número de intoxicaciones agudas por plaguicidas y una patología inespecífica de difícil filiación, estrechamente relacionada con las características laborales de la zona y, en particular, con la elevada exposición a productos agroquímicos.

En concreto, si estudiamos lo sucedido en la década de los ochenta nos encontramos con un incremento continuo en el número de intoxicaciones registradas en los “*Servicios de Urgencias No Hospitalarios*” de la zona de El Ejido (Poniente Almeriense), donde se pasa de

42 intoxicaciones agudas en 1981 a 177 en 1990, lo cual nos está indicando la importancia de este problema y la necesidad de realizar estudios de seguimiento del mismo (Parrón, 1994). Pero, evidentemente, debemos diferenciar entre los intoxicados que han sido simplemente asistidos en los “Servicios de Urgencias de la Zona”, y que no han requerido ingreso hospitalario por ser consideradas intoxicaciones leves, y aquellos otros casos que han debido ser derivados y asistidos finalmente en el Hospital de Referencia (Torrecárdenas), por ser intoxicaciones consideradas graves. Un estudio epidemiológico previo ha puesto de manifiesto que sólo uno de cada cuatro casos atendidos en los “Servicios de Urgencia Extrahospitalarios” es enviado al Hospital de Referencia (Hernández et al, 1990). Asimismo, haciendo el seguimiento del tema, en un estudio que comprende un período de 12 años (desde 1981 hasta 1992) se registraron un total de 506 casos de “intoxicaciones agudas” por insecticidas organofosforados que necesitaron ingreso en “Unidades de Cuidados Intensivos”, con un promedio de 42 intoxicaciones graves al año (Martín-Rubí *et al*, 1996), cifra que ha ido en aumento aunque con tendencia a estabilizarse en los últimos años; las *intoxicaciones accidentales* constituyeron el 80% de los casos (generalmente por vía cutánea y respiratoria), tratándose la mayoría de las veces de hombres que trabajaban en invernaderos. Con respecto a la mortalidad causada por intoxicación por insecticidas organofosforados, vemos que se sitúa en el 3-4% de los casos, llegando hasta un 14% en las intoxicaciones por vía digestiva (Martín-Rubí *et al*, 1996). Esta última cifra es algo mayor que el 9% observado sólo unos años antes por el mismo grupo de investigación (Yélamos *et al*, 1992).

El número de casos de intoxicaciones detectados en los últimos años en Almería por el “Programa de Vigilancia Epidemiológica de los efectos agudos en la salud originados por el uso de Plaguicidas” (de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía) han sido 129 casos en el año 2000, y 157 casos en el año 2001, lo que representa un porcentaje superior al 90 %, en ambos años, sobre el total de casos detectados por el citado Programa en toda Andalucía. La mayoría de las intoxicaciones se presentan en personas que realizan trabajos relacionados con la agricultura bajo plástico, y como consecuencia precisamente de la exposición profesional a

los plaguicidas que se utilizan para el control de las plagas en dichos cultivos bajo plástico. Efectivamente, de los 129 casos del 2000, 101 lo fueron por causa ocupacional (el 78 %); y con respecto al año 2001, de sus 157 casos, 132 lo fueron también por el mismo motivo ocupacional (es decir, el 84 %). Y si relacionamos el total de casos producidos con la población total de Almería (teniendo en cuenta los correspondientes Padrones de los años 2000 y 2001) obtenemos una “tasa de incidencia” de 25 casos por 100.000 habitantes en el año 2000, y de 29 casos por 100.000 habitantes en el año 2001 (Guillén Enríquez *et al*, 2003).

En relación con las intoxicaciones que se producen en la costa granadina existen pocos datos al respecto, el trabajo ya citado de Marín (1994) recoge 41 casos de intoxicaciones agudas producidos en 1990, de los cuales 34 se atendieron en el “*Hospital Comarcal*” de Motril. Casi todas las intoxicaciones atendidas en el medio hospitalario se produjeron en varones (97%). La época del año donde se concentraron la mayor parte de los casos fue de agosto a noviembre (71% de los casos). En cuanto a la vía de absorción, destacan la cutánea y respiratoria (apareciendo la digestiva sólo en el 12% de los casos).

Por otra parte, un índice relativo que nos podría ilustrar sobre lo que está sucediendo, en cuanto a las intoxicaciones sufridas, en las distintas zonas dedicadas a la agricultura intensiva mediante invernaderos es el que nos relaciona el número de casos, el número de intoxicaciones atendidas, con la superficie, en Has, dedicada a invernaderos en la zona de que se trate. Pues bien, si relacionamos el número de casos con la superficie en Has de invernadero, encontramos 0.220 casos/Ha en la costa de Granada que, comparados con los 0.014 casos/Ha en la zona del Poniente Almeriense para la misma época, indicaría una proporción bastante mayor en la costa granadina que en la citada zona almeriense (Marín, 1994).

Igualmente, obtenemos una idea de lo que está ocurriendo en este tema a través del estudio del “perfil del intoxicado” que, de acuerdo con los datos ofrecidos por el citado “Programa de Vigilancia Epidemiológica de los efectos agudos en la salud originados por el

uso de Plaguicidas” (de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía), estudiando los casos presentados en el año 2002 (Guillén Enríquez *et al*, 2003), es el siguiente: varón (86%); autónomo (52%); trabajador de Poniente Almeriense (88%); intoxicado al realizar tareas en invernadero (80%); intoxicado al realizar trabajos de fumigación (76%); intoxicado al trabajar en cultivos de pimientos/tomates (49%); intoxicado al trabajar sin protección individual (52%); intoxicado por vía cutánea y respiratoria (37%); sin haber necesitado hospitalización (91%); con síntomas neurológicos y digestivos (70%); atendido en “Servicios de Urgencias”(57%).

#### **4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE EXPOSICIÓN, EFECTO Y SUSCEPTIBILIDAD EN LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

La utilización laboral de plaguicidas conlleva inevitablemente la exposición a pequeñas cantidades de los mismos que pueden oscilar desde niveles indetectables hasta otros fácilmente medibles utilizando determinaciones analíticas sensibles de fácil disponibilidad. La relevancia biológica de este tipo de exposiciones depende de la duración de la exposición, dosis y reactividad biológica (Krieger *et al*, 1992). En este sentido, diferentes estudios han planteado la necesidad de practicar y desarrollar técnicas de monitorización biológica para evaluar la exposición a plaguicidas y predecir los riesgos sanitarios de los trabajadores ocupacionalmente expuestos a los mismos.

La exposición potencial a través del medio ambiente puede estimarse por medio de técnicas de monitorización ambiental, mientras que la exposición o absorción individual se estima mediante monitorización biológica de fluidos y tejidos corporales. Los plaguicidas y sus metabolitos pueden analizarse en muestras biológicas, suero, grasa, orina, sangre o leche materna por medio de las técnicas analíticas convencionales. Esto constituiría biomarcadores

de exposición.

Sin embargo, la utilidad de los biomarcadores de efecto radica en su capacidad potencial para detectar los efectos de los plaguicidas antes de que produzcan efectos adversos sobre la salud. Se basan en que las respuestas bioquímicas a los contaminantes químicos ambientales proporcionan una medida del efecto tóxico. Sería el caso de uno de los marcadores bioquímicos más ampliamente utilizados, la inhibición de la colinesterasa, que mide exposición a insecticidas organofosforados. Por el contrario, las técnicas que determinan el daño al material genético (p.ej., determinación de aductos de ADN) constituyen una potente herramienta para medir los efectos ambientales. Algunos plaguicidas pueden producir también aductos de hemoglobina. La determinación de las tasas de aberración cromosómica en cultivos de linfocitos es un método establecido para monitorizar poblaciones con exposición ocupacional o ambiental a sustancias mutagénicas o carcinogénicas. Hay diversos estudios acerca de los efectos citogenéticos de los plaguicidas en trabajadores empleados en la formulación de los mismos. Algunos de ellos encuentran incrementos de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y/o intercambios entre cromátides hermanas en la población expuesta. Sin embargo, los resultados en la costa del Poniente almeriense no han encontrado resultados relevantes (Lucero et al, 2000).

Los biomarcadores van a tener un mayor impacto en el estudio de los factores de riesgo ambientales. El objetivo básico de los estudios que exploran estos aspectos es determinar la naturaleza y consecuencias de los cambios o variación genética, con el propósito último de predecir o prevenir las enfermedades (Anwar, 1997).

Uno de los aspectos más importantes relacionados con la exposición laboral crónica a compuestos organofosforados es la evaluación de la toxicidad por medio de marcadores bioquímicos que constituyen una señal de alarma previa a la aparición de manifestaciones clínicas. Según los protocolos de la OMS (Maroni et al, 1986), la monitorización biológica de trabajadores expuestos a tales productos debe basarse, al menos, en dos tipos de determinaciones: la actividad colinesterasa (plasmática –BchE- y eritrocitaria –AChE-) y la

determinación de alquilfosfatos en orina. Una evaluación complementaria consistiría en determinar, además, paraoxonasa sérica (PON1), esterasa neurotóxica (NTE) en linfocitos o plaquetas y las oxidasas de función mixta.

No obstante, la variación interindividual existente en la población no expuesta de alguna de estas actividades hace necesaria la realización de estudios poblacionales para detectar aquellos individuos más susceptibles a la intoxicación por organofosfatos. En este sentido, Mutch et al (1992), proponen la determinación previa de 5 enzimas (AChE, BChE, NTE en linfocitos, PON1 y arilesterasa plasmáticas) como indicadores predictivos de susceptibilidad.

En la evaluación de la exposición a plaguicidas se han utilizado, por tanto, dos tipos de determinaciones: actividades enzimáticas en sangre y niveles de plaguicidas y/o sus metabolitos en fluidos biológicos (orina o sangre). Existen procedimientos analíticos para la determinación de alquilfosfatos, carbamatos, piretroides, organoclorados y algunos herbicidas y fungicidas en muestras de sangre y orina. Sin embargo, las relaciones dosis-respuesta o dosis-efecto no son en absoluto significativas, por lo que este tipo de determinaciones sólo son útiles como indicadores biológicos de exposición para confirmar la exposición o estimar la dosis interna. En cualquier caso, para evaluar el grado de exposición y absorción es necesario obtener valores de referencia y/o previos a la exposición (He, 1993).

A pesar de todo los plaguicidas, junto a otros grupos de sustancias, están aún lejos de las posibilidades de monitorización biológica, debido al gran desconocimiento científico existente todavía, de ahí que aún sea necesario realizar un gran esfuerzo investigador. Una importante limitación al diagnóstico de intoxicación leve por organofosforados y al *screening* preventivo de trabajadores expuestos a organofosforados ha sido la gran variabilidad interindividual de la actividad colinesterasa. Es más, se han observado síntomas clínicos y niveles elevados de alquilfosfatos en individuos que presentan una disminución de la actividad colinesterasa, pero dentro del rango de normalidad. Esto hace necesario obtener los valores basales previos a la exposición de esta actividad enzimática como base para evaluar

---

posteriores descensos de la misma.

También se ha estudiado la influencia de la exposición a plaguicidas sobre el perfil hematológico y bioquímico de los individuos expuestos. En el estudio de Parrón et al (1996) no se observaron importantes diferencias significativas en el perfil hematológico y bioquímico de su grupo de fumigadores de alta exposición con respecto al de baja. Sin embargo, considerando todo el grupo de 105 fumigadores en conjunto observaron una elevación de los triglicéridos en el 17% de los casos, de la GGT en el 8%, y del fósforo inorgánico en el 7% de los casos. Estas alteraciones las relacionaron, respectivamente, con posibles implicaciones de la dieta, disfunción hepática y un mayor aporte exógeno de fósforo (probablemente procedente de compuestos organofosforados). Respecto a los parámetros del hemograma, el hallazgo más significativo fue un descenso en la concentración corpuscular media de hemoglobina en el 38% de los casos. Asimismo, el 37% de los fumigadores estudiados mostró algún tipo de síntoma o signo de toxicidad, como por ejemplo abortos espontáneos, depresión, cefalea, temblor o parestesias.

Otro estudio de nuestro grupo (Gómez Vidal, 2000) observó que el comportamiento de esterasas diferentes a las colinesterasas ( $\beta$ -glucuronidasa y fosfatasa ácida), era opuesto al de aquellas, pues sus niveles aumentan con la exposición a plaguicidas. También encontró un aumento de la MAO sérica en los fumigadores con respecto a los controles. Por el contrario, ni la determinación de paraoxonasa ni su fenotipado sérico mostró relación alguna con la exposición a plaguicidas. Sin embargo, se observó que los individuos portadores del alelo Q de paraoxonasa tenían 5 veces más probabilidad de inhibir la BChE más de 25% con respecto a niveles basales (Hernández et al, 2004). Finalmente, se observó un aumento de los niveles de enzimas de citolisis, especialmente AST, ALT, LDH y, en menor medida, CK. Ello, junto a la alteración del perfil lipídico, planteó la hipótesis de que la exposición continuada a plaguicidas en agricultura intensiva da lugar a ciertas disfunciones bioquímicas.

En el estudio de Misra *et al* (1985) sobre 22 trabajadores de una Unidad de Salud Pública crónicamente expuestos a fentiión, no se observaron diferencias significativas en la

fosfatasa alcalina sérica, AST y ALT con respecto al grupo control.

Para evaluar la toxicidad hepática del clorfenvinfos, Kossmann et al (1997b) estudiaron un grupo de trabajadores empleados en la producción de este compuesto en dos momentos separados 9 años entre sí (41 individuos en el primer estudio y 35 en el segundo). En el primero, los trabajadores presentaron una disminución de proteínas séricas, del porcentaje de alfa-1 y  $\beta$ -globulina, fosfatasa alcalina, GGT y AChE, así como una elevación de gamma-globulina, bilirrubina, ALT, AST y MDH (malato deshidrogenasa) con respecto a los controles. Los resultados del segundo estudio, efectuado 9 años después, fueron similares (descenso de la actividad BChE y fosfatasa alcalina y un incremento de ALT). Estos resultados sugerían una muy ligera afectación funcional del hígado.

Teniendo en cuenta que los plaguicidas y sus metabolitos se eliminan por vía renal, es posible evaluar el efecto de estos compuestos sobre el funcionalismo renal de los trabajadores mediante la determinación de diferentes enzimas en orina, tales como fosfatasa alcalina, N-acetilglucosaminidasa, LDH, ALT, AST y arginasa. En un estudio efectuado sobre trabajadores de una industria de producción de insecticidas organofosforados, especialmente clorfenvinfos, Kossmann et al (1997a) observaron un incremento significativo de la mayoría de estos parámetros en los trabajadores expuestos con respecto al grupo control.

Resultados similares se obtuvieron en anteriores estudios. Así, se observó un aumento de GGT con independencia de la edad, sexo y consumo de alcohol en personas expuestas a insecticidas organoclorados (Guzelian et al, 1980; Kreiss et al, 1981) así como una elevación de la fosfatasa alcalina sérica paralela a la inhibición de la pseudocolinesterasa (Srivastava et al, 1991). Estos hallazgos fueron posteriormente confirmados con otro tipo de plaguicidas, tales como fenoxiácidos, clorofenoles (Dossing, 1984), observando que existía una correlación significativa entre estas alteraciones y las patologías más frecuentes de hígado.

También se ha encontrado una relación positiva entre la exposición laboral a plaguicidas y un aumento del perfil lipídico (p.ej., incrementos reversibles de colesterol),

---

especialmente tras la exposición a determinados organofosforados (Nakagawa et al, 1982). También se observó una asociación positiva entre la dosis interna de plaguicidas (DDT) y los niveles de triglicéridos, colesterol y GGT (Kreiss et al, 1981).

Otros autores observaron una elevación de lípidos y de ASAT, descenso de glucosa y urea y disminución de la actividad colinesterasa (Bhatnagar, 1982). Por el contrario, otros estudios encontraron hiperglucemia tras la intoxicación por organofosforados (Rivera y Rivera, 1990).

Más recientemente, Ruiz (1997) encontró una elevación de la glucemia basal, del colesterol, transaminasas hepáticas y fosfatasa alcalina relacionados con la exposición a plaguicidas en agricultores de invernadero que los manejaban de forma regular.

A los marcadores bioquímicos anteriormente citados habría que añadir los *marcadores de estrés oxidativo*. Un considerable número de estudios indican que el estrés oxidativo juega un papel destacado en la toxicidad de diversos compuestos químicos, entre los que se incluyen los plaguicidas ya que algunos de ellos son capaces de generar estrés oxidativo, lo que puede contribuir a las manifestaciones tóxicas de estos compuestos. Hay pruebas de que el daño tisular producido por los radicales libres contribuye etiopatogénicamente a la aparición de numerosos procesos patológicos de tipo crónico. El daño tisular puede estar desencadenado por radicales libres de procedencia endógena, así como de fuentes exógenas (humo de tabaco, alta presión de oxígeno, radiaciones ionizantes, disolventes, fármacos y plaguicidas). Esto plantea la cuestión del estado antioxidante de cada individuo (para detectar posibles diferencias interindividuales) y su papel en la protección frente al desarrollo de determinados procesos patológicos.

El efecto inhibitorio que los agentes químicos de uso agrario ejercen sobre los enzimas de eritrocitos humanos merece mayor atención, ya que pueden constituir la base para la identificación de marcadores biológicos de exposición así como para la evaluación de los

riesgos sobre la salud humana. Estudios recientes han puesto de manifiesto la inhibición de la superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos por algunos plaguicidas, lo que daría lugar a la acumulación de especies reactivas de oxígeno que, incapaces de ser neutralizadas por acción de la catalasa eritrocitaria, darían lugar a interacción con macromoléculas y peroxidación lipídica. También se ha comprobado que algunos plaguicidas inducen estrés oxidativo en el hígado mediante acumulación de radicales libres en animales de experimentación. Esto indica que los diferentes plaguicidas empleados en agricultura favorecen la acumulación de radicales libres por inhibición de los enzimas encargados de su depuración. Por tanto, la especial inhibición de la SOD nos hace pensar que este enzima pueda ser de utilidad como biomarcador de exposición a plaguicidas y, en base a lo anteriormente mencionado, también frente a otros tóxicos. Sin embargo, los estudios “in vitro” necesitan ser validados por estudios “in vivo” en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas, como pueden ser los fumigadores de invernadero.

Desde un punto de vista preventivo, puede ser importante determinar la susceptibilidad genética individual de las personas que van a manejar plaguicidas, a fin de detectar aquellas que puedan presentar potencialmente más riesgo tras la exposición a dichos agentes. Esto encuentra su justificación en la existencia de variaciones interindividuales en la mayoría de parámetros farmacogenéticos de la población no expuesta. De ahí que su determinación analítica previa sea de especial utilidad como indicador de susceptibilidad.

Aunque muchos de los marcadores bioquímicos anteriormente citados han sido estudiados por nuestro grupo en trabajadores de invernadero (Gómez Vidal, 2000), en este trabajo abordamos por primera vez, junto a otros biomarcadores clásicos, el estudio de los marcadores de estrés oxidativo, por lo que a continuación pasamos a analizar con cierto detalle el fundamento, problemática y utilidad de dichos marcadores en el caso que nos ocupa.

## 5. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

### 5.1. Oxidantes, radicales libres y especies reactivas de oxígeno

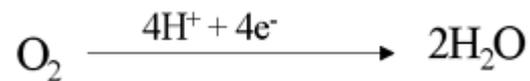
Desde un punto de vista fisicoquímico, la oxidación consiste en la pérdida de electrones por parte de un átomo o una molécula, de manera que disminuye su carga negativa y aumenta la positiva. Lo contrario, es decir, en la reducción tiene lugar la adquisición de electrones con el consiguiente aumento de la carga negativa. Por tanto, son oxidantes aquellas especies que aceptan electrones y reductoras las que los ceden. Toda oxidación implica una reducción; si un átomo cede electrones, otro los capta.

En las reacciones de oxidación y reducción tiene lugar una transferencia de electrones. Sin embargo, en ocasiones puede ocurrir una “fuga” de electrones de alta energía generando radicales libres (RL). Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Un compuesto químico puede convertirse en un radical libre tanto por ganancia o por pérdida de electrones, así como por fisión de enlaces homolíticos. Como consecuencia de tener un electrón desapareado estas especies químicas son altamente reactivas (Webster y Jun, 1998).

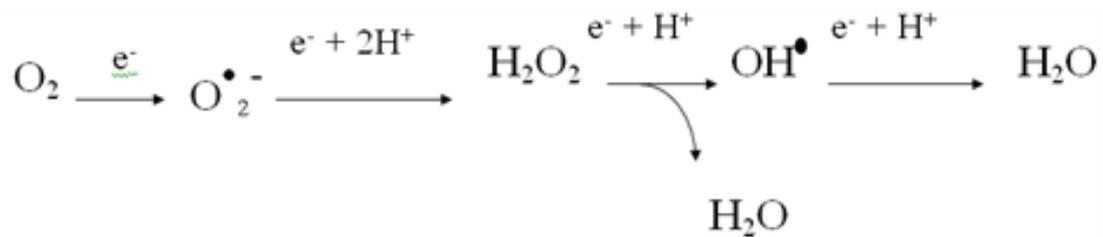
Al ser altamente reactivas tienden a interactuar con otros compuestos químicos con los que entran en contacto (Ramón, 1993), interacción que puede hacerse de tres maneras: el radical puede ceder su electrón desapareado (radical reductor), puede tomar uno de una molécula estable para aparear así su electrón (radical oxidante), o bien puede unirse a una molécula estable. En cualquiera de estos casos la situación resultante es la formación de otro radical químicamente agresivo.

La mayoría de los organismos vivos necesitan de oxígeno para poder sobrevivir, ya que este elemento es utilizado por las células para oxidar compuestos orgánicos. El oxígeno

molecular ( $O_2$ ) actúa como elemento oxidante al aceptar hasta cuatro electrones en su orbital más externo (reducción tetravalente) para dar lugar a dos moléculas de agua:



Pero el oxígeno también puede sufrir una reducción univalente, divalente o trivalente (al aceptar uno, dos o tres electrones) dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los productos respectivos son: el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el intermediario peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ):

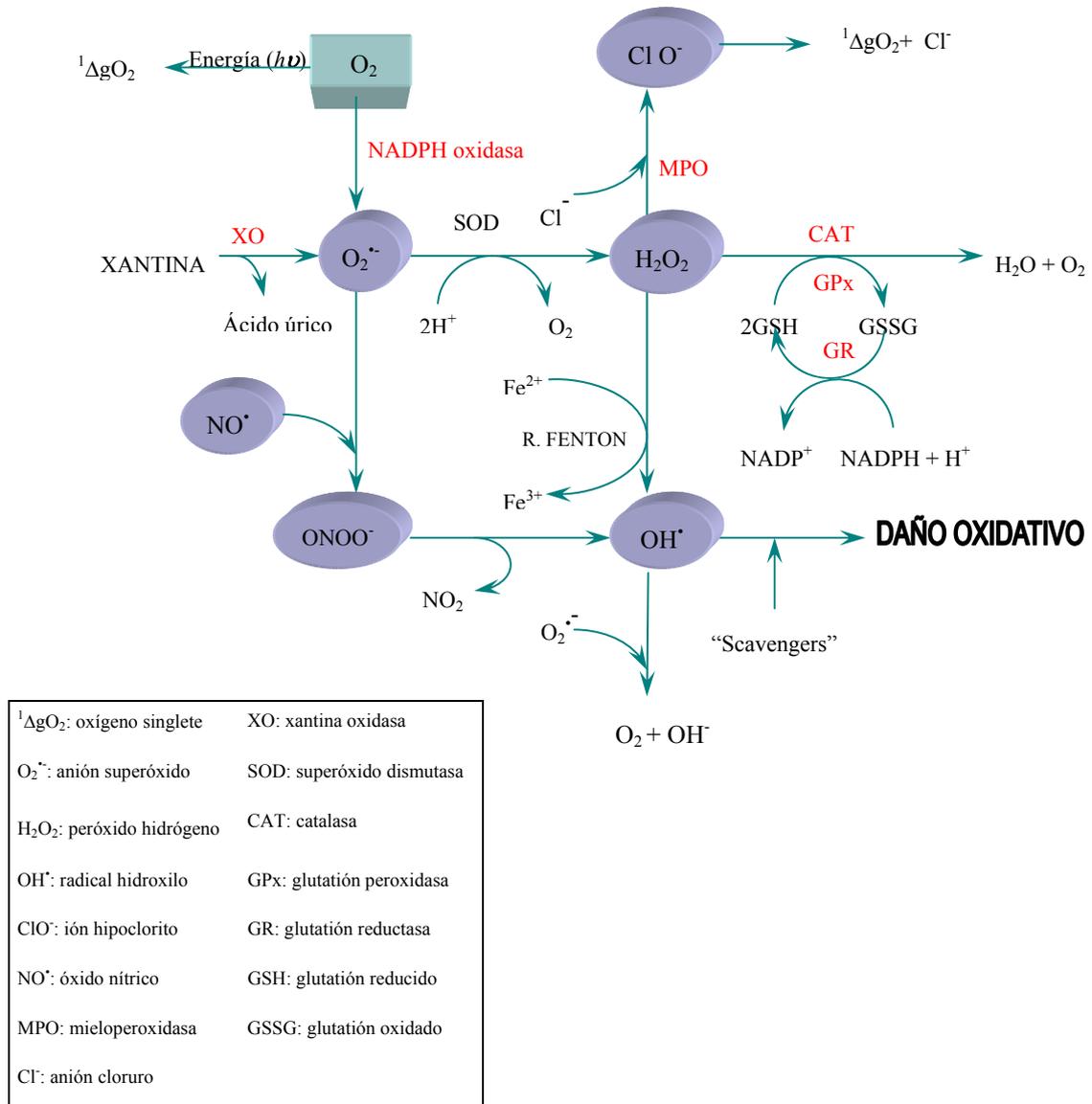


El  $H_2O_2$  no es estrictamente un radical libre pero por su capacidad de generar el  $OH^{\bullet}$  se trata como tal. A estos reactivos biológicos (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo, oxígeno singlete) y otros intermediarios reactivos del oxígeno que pueden participar (como el  $NO^{\bullet}$ ), se les conoce con el nombre de especies reactivas de oxígeno y tienen la particularidad de reaccionar con relativa facilidad con sustratos endógenos celulares

## 5.2. Fuentes de radicales libres en la naturaleza

En los seres vivos continuamente se están produciendo radicales libres. La generación de estos radicales se asocia principalmente al metabolismo celular del oxígeno y a las reacciones de oxido-reducción (Fig. 1). En la literatura científica se han descrito abundantes mecanismos bioquímicos y celulares a los que se les atribuye esta producción de radicales libres, entre los que cabe citar los siguientes (Triskow-Drost, 1996):

- a) Generación a partir de la cadena respiratoria de mitocondrias.
- b) En procesos de fagocitosis.
- c) Oxidación peroxisomal de los ácidos grasos
- d) Enzimas microsomales.
- e) Autooxidación de compuestos de carbono reducido
- f) Activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario,
- g) Ocasionalmente también se pueden formar en respuesta a sustancias y estímulos ajenos a la propia célula, como por ejemplo la *exposición* a radiación electromagnética, luz solar, ozono, xenobióticos, drogas, contaminantes, aditivos, etc.

**Figura 4.** Ejemplo de reacciones metabólicas que conducen a daño oxidativo

### 5.3. Acción de los oxidantes en los organismos vivos. Daño oxidativo a biomoléculas.

*Acción sobre los lípidos.* Es el proceso oxidativo más frecuente en el organismo. Se produce cuando un radical libre se fija a un carbono de la cadena alquilo de un ácido graso ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ ), iniciando lo que se conoce como peroxidación lipídica. Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Una vez generado el radical lipídico sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el  $\text{O}_2$  y formar un radical peroxi. Este radical libre puede dar lugar a endoperóxidos, o bien tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperóxido. El primero de ellos se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo (Fig. 2). Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena (Martínez-Cayuela, 1998).

*Acción sobre proteínas.* Los radicales libres son capaces de oxidar las cadenas de aminoácidos que forman las proteínas, alterando su conformación espacial y, por tanto, su función. Las moléculas más afectadas son las proteínas de membrana (canales iónicos, receptores, etc.), las proteínas estructurales y enzimáticas (Ramón, 1993; Castillo et al, 2001).

*Acción sobre los ácidos nucleicos.* Los ácidos nucleicos son atacados por los radicales libres, de manera que la citotoxicidad de estas especies químicas puede ser, en gran parte, consecuencia de las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN tras

reaccionar con radicales libres, especialmente con el  $\text{OH}^\bullet$ , traducándose básicamente en bloqueos de la replicación del ADN celular o en mutaciones (Kow, 1999).

*Acción sobre los carbohidratos.* Los carbohidratos también pueden ser dañados por los radicales libres, aunque en menor medida que otras biomoléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical  $\text{OH}^\bullet$  para producir sustancias reactivas (Blake et al, 1987; Sies, 1997). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, fragmentándose en unidades más sencillas.

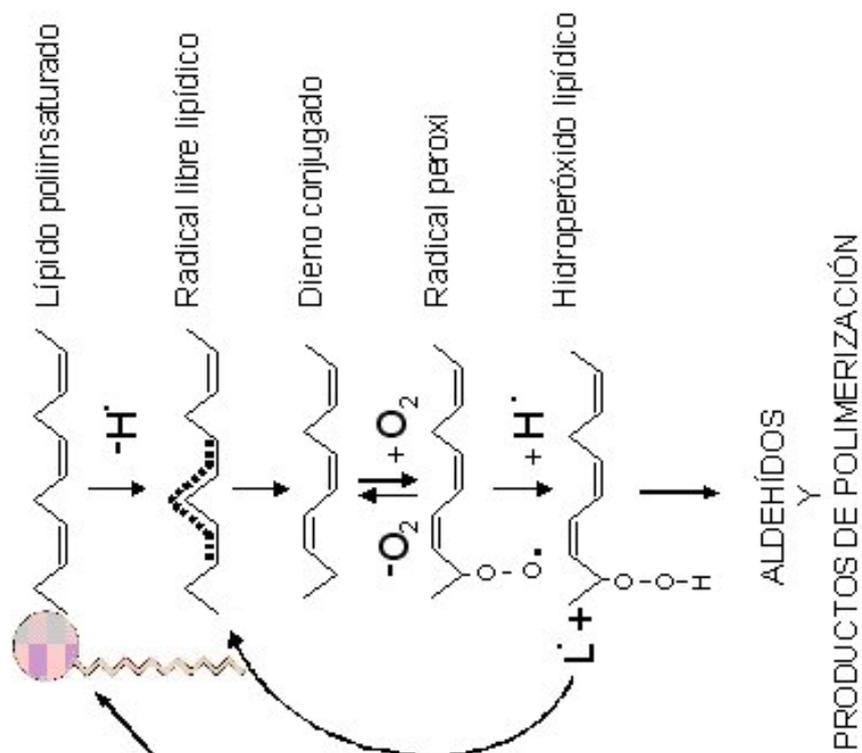
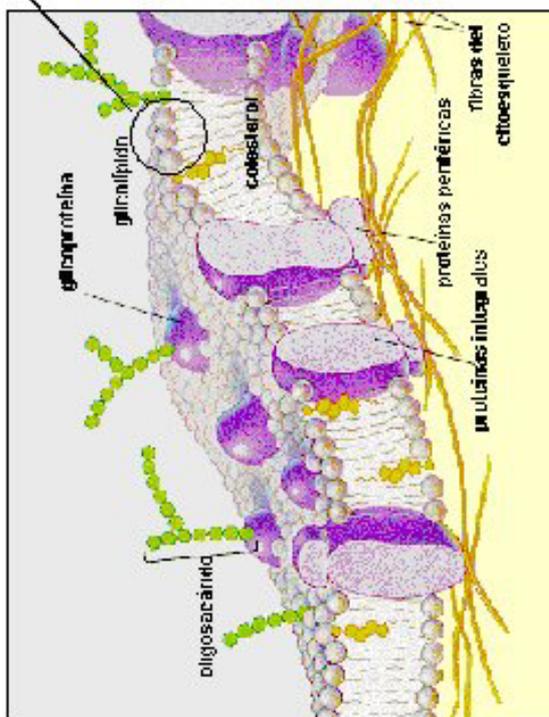


Fig. 2. Peroxidación lipídica de membrana celular.



#### **5.4. Defensa frente a los radicales libres: papel de los antioxidantes.**

La acumulación de radicales libres es incompatible con la vida, por ello existen en la célula sustancias y mecanismos que reducen o neutralizan sus efectos, los antioxidantes. Antioxidante es aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable y que inhibe o retrasa de forma significativa la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Todos los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante tanto a nivel fisiológico como bioquímico. A nivel fisiológico destaca el sistema microvascular, cuya función es mantener niveles tisulares adecuados de  $O_2$ , siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas. A nivel bioquímico están los mecanismos de defensa antioxidante, que pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, así como los “sistemas reparadores de moléculas”.

Entre los sistemas enzimáticos, hay que señalar la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es posteriormente metabolizado tanto por la catalasa (CAT) como por la glutatión peroxidasa (GPx). Otras enzimas implicadas también en la defensa antioxidante son la tiorredoxina reductasa, óxido nítrico sintasa (NOS), hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y peroxidasa eosinofílica (Matés, 2000).

Entre los sistemas no enzimáticos destacan diversos compuestos biológicos con función antioxidante, unos de tipo hidrosoluble y otros liposolubles, tanto de pequeño como de gran tamaño molecular. Entre ellos se podría citar el glutatión reducido (GSH), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A (siendo su precursor el  $\beta$ -caroteno), vitamina E (tocoferol), coenzima Q-10, ciertos ácidos grasos, polifenoles (flavonoides), fitoestrógenos (resveratrol), nitróxidos, poliaminas, metionina, NADPH, ADP, adenosina, ubiquinol, cisteína, homocisteína, taurina, ácido úrico, *S*-adenosil-*l*-metionina, metalotioneína, albúmina,

transferrina, ferritina, ceruloplasmina y mioglobina (Matés, 2000). Estas sustancias reaccionan directamente con los radicales libres impidiendo que actúen sobre las moléculas críticas.

En la siguiente tabla se resumen los principales sistemas antioxidantes:

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES		
<i>PREVENTIVOS</i>	<i>SCAVENGERS</i>	<i>REPARADORES</i>
	<u>*ENZIMATICOS:</u>	<u>*DIRECTOS:</u>
CERULOPLASMINA	SOD	DISULFURO REDUCTASA
TRANSFERRINA	CAT	SULFÓXIDO REDUCTASA
ALBUMINA	GPX	
	NOS	
	HO-1	
	<u>*NO ENZIMATICOS:</u>	<u>*INDIRECTOS:</u>
FERRITINA	VITAMINA E	
BILIRRUBINA	VITAMINA C	
	BETACAROTENO	8-OXOGUANINA ADN
ÁCIDO ÚRICO	FLAVONOIDES	
	FITOESTRÓGENOS	GLICOSILADA
METALOTIONEINA	UBIQUINOÑA	
	GLUTATIÓN	
	<u>*COFACTORES:</u>	
	COBRE, CINC, MANGANESO, HIERRO, SELENIO	

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la formación de RL y los mecanismos de defensa antioxidantes. Cuando este equilibrio se rompe a favor de la generación de RL nos encontramos ante una situación denominada “estrés oxidativo”. En esta situación aumenta la probabilidad de que los RL lesionen moléculas de mayor importancia biológica, tales como el ADN, proteínas y lípidos de membrana, ocasionando degeneración celular (Martínez-Yélamos et al, 1997; Sies, 1997; Kow, 1999; Matés et al, 1999).

### **5.5. Estrés oxidativo y patologías relacionadas**

Ante la situación de estrés oxidativo el organismo responde con los mecanismos de la defensa antioxidante, pero, en determinadas ocasiones esta respuesta puede ser insuficiente, desencadenándose entonces diferentes procesos fisiopatológicos.

Fue Rebeca de Gerschman quien en 1954 estableció por primera vez la conexión entre radicales libres y agentes tóxicos y radicales libres y enfermedad. Hasta entonces, el estudio de radicales libres estuvo restringido al campo de la física, química y biología. De hecho, el gran interés que suscita en la actualidad la acción de los radicales libres sobre el organismo se debe al importante papel que desempeñan estas sustancias, y los procesos en los que intervienen, en numerosas y graves patologías, entre ellas el envejecimiento celular, toxicidad del oxígeno, acción tóxica de numerosos xenobióticos, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), síndrome de Down, cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide, etc.

### **5.6. Estrés oxidativo y exposición a plaguicidas**

El estrés oxidativo juega un importante papel en la toxicidad de numerosos agentes químicos. Muchos de ellos, tras interactuar con diversos componentes titulares, generan RL responsables de las disfunciones observadas (Kehrer, 1993). En el caso de los plaguicidas, existe un gran interés sobre el daño que pueden ejercer los RL que generan sobre sistemas biológicos, aunque existe una falta de consenso respecto a cuáles serían las mejores determinaciones para cuantificar el riesgo potencial derivado de la exposición subcrónica a estos xenobióticos. Se ha sugerido que uno de los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad de los organoclorados, carbamatos y organofosforados (OPs) es la peroxidación

lipídica (Kehrer, 1993). Los mecanismos de defensa frente a RL, tales como SOD, CAT, GST, GPx, GR, etc. pueden ejercer un papel protector frente a los efectos deletéreos de los ERO inducidos por tales plaguicidas (Gutteridge, 1994; Kehrer, 1993).

En la última década ha cobrado especial relevancia la inducción de estrés oxidativo por diversos tipos de plaguicidas, como los organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretroides, bupiridilos, clorofenoxiácidos y ditiocarbamatos (Banerjee et al, 1999; Kale et al, 1999, Prakasam et al, 2001) como posible mecanismo de acción de los mismos, aunque en algunos casos no se conoce de forma exacta cómo se genera (Banerjee et al, 2001). Diversos plaguicidas pueden ejercer su efecto biológico por medio de un ataque electrofílico sobre determinados constituyentes celulares, proceso durante el cual generan ERO. Por tanto, los ERO pueden estar implicados en la toxicidad de diferentes plaguicidas (Dwivedi et al, 1998; Bagchi, 1995).

ERO, tales como aniones superóxido  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  y  $H_2O_2$ , incrementan los procesos oxidativos intracelulares y producen peroxidación lipídica en las membranas celulares. El radical  $OH^{\bullet}$  se considera un iniciador de LPO a través de la reacción de Fenton catalizada por hierro. Los eritrocitos son más susceptibles al daño oxidativo debido a su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados, en hierro del grupo hemo y en oxígeno, elementos todos ellos capaces de producir cambios oxidativos en las células rojas. Por tanto es probable que mientras los plaguicidas son transportados por la sangre hasta el hígado donde se van a metabolizar, produzcan daño celular a los eritrocitos (Kale et al, 1999). Prakasam et al (2001) han observado una mayor fragilidad en los eritrocitos de aplicadores de plaguicidas, debido probablemente a un descenso de los niveles de GSH intraeritrocitario y a alteraciones de la fluidez de la membrana eritrocitaria secundarias a la peroxidación lipídica, todo ello como consecuencia, a su vez, del estrés oxidativo inducido por la exposición a plaguicidas.

Generalmente, el indicador más usado para evaluar la peroxidación lipídica resultante del estrés oxidativo es la elevación de productos de la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) o de los niveles de aldehído malónico (MDA) (Prakasam et al, 2001). Sin embargo,

no hay que olvidar que el estrés oxidativo es un proceso complejo, con múltiples etapas, consecuencia de un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y el potencial de defensas antioxidantes. Por tanto puede aparecer estrés oxidativo no sólo por un exceso de producción de radicales libres sino también por un déficit en las defensas antioxidantes, tanto a nivel de metabolitos como de enzimas.

En definitiva, parece necesaria la realización de estudios epidemiológicos que permitan identificar las posibles alteraciones bioquímicas precoces derivadas de la exposición crónica a plaguicidas no solo para avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de estos agentes, sino también con objeto de realizar una intervención sanitaria de carácter preventivo, que presentaría grandes ventajas de tipo terapéutico (posible intervención precoz), así como una gran disminución de los recursos sanitarios que, caso de desarrollarse la patología crónica habría que poner a disposición de estos individuos.

**ANTECEDENTES**



---

A continuación se presenta una revisión detallada de los posibles efectos de los plaguicidas sobre diversas actividades enzimáticas, esterasas y enzimas antioxidantes que pueden jugar un papel más o menos importante en la toxicidad de los plaguicidas a largo plazo.

## **1. ESTERASAS PLASMÁTICAS**

### **1.1. Colinesterasas**

La confirmación analítica de la intoxicación por OPs o carbamatos se realiza determinando las actividades AChE y BChE. El análisis de orina, contenido gástrico o ropa para detectar restos de dichos compuestos no suele hacerse por carecer de interés clínico aunque constituyen importantes marcadores de exposición, especialmente la presencia de alquilfosfatos en orina en el caso de los OPs (Richter et al, 1992). A pesar de todo, la interpretación de los resultados no es fácil. Una BChE normal no excluye la intoxicación por OPs o carbamatos, aunque existe una gran variabilidad individual. Es preferible la determinación de la AChE ya que refleja mejor el estado de las sinapsis colinérgicas (es decir, es más específica), aunque técnicamente es algo más complicado de hacer debido a la dificultad para su automatización (Hernández, 2005). Es necesario determinar los valores basales de ambas colinesterasas en trabajadores con riesgo elevado de exposición a los plaguicidas anteriormente mencionados.

En las intoxicaciones agudas, los síntomas clínicos aparecen cuando se produce más de un 50% de inhibición de la colinesterasa (Jaga y Dharmani, 2003). En una intoxicación moderada la actividad baja hasta un 10-20% de los valores normales, mientras que en una

intoxicación grave la actividad siempre es inferior al 10% (Goldfrank, 1990).

Casi tan importante como el grado de inhibición de la colinesterasa es la rapidez a la que ocurre. Así, pequeñas exposiciones pero continuas pueden disminuir gradualmente la actividad colinesterasa hasta niveles muy bajos y con escasa sintomatología. Por el contrario, también se han observado signos clínicos de toxicidad en individuos expuestos a plaguicidas anticolinesterásicos con niveles “no adversos” de AChE (Ohayo-Mitoco et al, 2000, Srivastava et al, 2000) o de BChE (Richter et al, 1992). Por tanto, la actividad colinesterasa no se correlaciona del todo bien con las manifestaciones clínicas (Matchaba-Hove y Siziya, 1995); en cada caso hay que valorar la historia de la exposición y los síntomas y signos clínicos de toxicidad independientemente del valor de la actividad colinesterasa (Hernández, 2005). Todo esto plantea la duda de si las colinesterasas constituyen una medida adecuada de seguridad para los individuos expuestos.

En humanos, la exposición a OPs origina un descenso de la BChE que persiste de 1 a 3 semanas, mientras que el de la AChE puede durar hasta 12 semanas. La recuperación de las actividades también es diferente, de manera que la BChE experimenta un ascenso importante (25-30%) durante los primeros 7-10 días después de la intoxicación y posteriormente aumenta de forma más gradual. En un sujeto intoxicado no tratado, la AChE asciende a un ritmo de un 1% diario. El momento en el que puede regresar a su trabajo es cuando se alcanza una meseta en la recuperación de la actividad enzimática (Goldfrank, 1990).

Tras la exposición a OPs, la BChE se inhibe más rápidamente que la AChE (Ballantyne y Mars, 1992) y, como hemos visto, se recupera antes lo que indica la diferente sensibilidad de ambas (Mason, 2000). Ello justifica que la AChE se haya considerado un marcador de exposición crónica a OPs (Jaga y Dharmani, 2003). Así, por ejemplo, en un estudio realizado en trabajadores rurales de Brasil expuestos a plaguicidas anticolinesterásicos se observó que el 3% presentaba una exposición excesiva (considerada como “intoxicación”) según la BChE, mientras que el porcentaje se elevaba al 42% si se utilizaba la AChE (Oliveira-Silva et al, 2001). En base a ello, los autores sugieren que la AChE es mejor indicador que la BChE en el

---

contexto de la exposición crónica a plaguicidas.

Teniendo en cuenta que la BChE es una proteína hepática, algunas situaciones podrían originar falsas inhibiciones (Whittaker, 1984). Así ocurre en:

- déficit congénito de colinesterasa: es un raro procesos hereditarios que da lugar a variantes atípicas o silentes.
- procesos fisiológicos: durante el embarazo la actividad colinesterasa suele descender, especialmente en los dos primeros trimestres. En los recién nacidos y niños también suele estar descendida.
- diversos estados fisiopatológicos: hepatopatías crónicas, disfunciones hepáticas incluyendo cirrosis, malnutrición, colagenosis, infarto agudo de miocardio, hipertermia, mixedema, shock, uremia, carcinomas, infecciones, etc.
- procesos yatrogénicos: ciertos medicamentos como morfina o codeína, citostáticos, IMAO, anticonceptivos, etc.

Por el contrario, también se han observado incrementos de la actividad colinesterasa plasmática, denominados comúnmente “hipercolinesterasemia” y entre cuyas principales causas se pueden citar las siguientes: diabetes mellitus, hiperlipidemia, bocio nodular, hipertiroidismo, hígado graso, hipertensión arterial esencial, síndrome nefrótico, obesidad, asma, alcoholismo, estados de ansiedad, esquizofrenia, etc. (Whittaker, 1980).

Por su parte, la AChE se afecta en todos aquellos procesos que alteran la vida media de los eritrocitos circulantes, tales como hemoglobinopatías y anemias. En la práctica puede suceder que trabajadores expuestos crónicamente a inhibidores de la colinesterasa y asintomáticos presenten una BChE normal y una AChE inhibida. Las personas no expuestas a inhibidores de la colinesterasa presentan normalmente variaciones individuales de la actividad enzimática. Esta fluctuación es del orden del 15%, aunque algunos autores la estiman más alta

y diferente para la BChE y AChE. Igualmente existen importantes variaciones de la actividad enzimática en distintas personas de una misma comunidad. Es decir, existen variaciones tanto inter como intraindividuales (Hernández, 2005).

La BChE y AChE están controladas por diferentes mecanismos fisiológicos. Por tanto, un descenso de ambas constituye un buen indicador de exposición a OPs, mucho más plausible que cualquier otra causa, incluida la variación fisiológica (Whittaker, 1986). La secuencia característica después de la exposición aguda a OPs está constituida por un descenso de la BChE, seguido de un descenso de BChE y de AChE y, finalmente, de una BChE normal y un descenso de AChE (Gallo y Lawryk, 1991).

### **A) Estudios epidemiológicos**

---

A continuación se hace una revisión que no pretende ser exhaustiva de algunos estudios epidemiológicos llevados a cabo sobre diferente tipo de trabajadores expuestos a plaguicidas en diversas partes del mundo. Se puede ver que en la mayoría la AChE muestra mayor sensibilidad para detectar alteraciones derivadas de la exposición crónica a plaguicidas. Además, los estudios que también incluyen manifestaciones clínicas tóxicas no suelen encontrar correlación con los niveles de las colinesterasas.

Un trabajo previo realizado por nuestro grupo (Parrón *et al*, 1996) sobre un total de 105 fumigadores de invernadero clasificados en dos grupos, uno de alta y otro de baja exposición, observó una serie de descensos y recuperaciones de las actividades BChE y AChE tras año y medio de seguimiento analítico. El descenso de la BChE coincidió con los periodos de mayor exposición a plaguicidas (septiembre/octubre). También se observó un desfase de unos 45-60 días entre el descenso de BChE y el de AChE, lo cual se atribuyó a la diferente sensibilidad de ambas enzimas a OPs y carbamatos, así como a su diferente velocidad de regeneración. No obstante, no encontró diferencias significativas en los valores de ambas

---

colinesterasas de los dos grupos de fumigadores. En ningún momento del seguimiento el valor medio de las colinesterasas se situó por debajo del rango de normalidad

Otro trabajo de nuestro grupo (Gómez Vidal, 2000) confirmó la utilidad de las colinesterasas como marcadores de exposición a plaguicidas en fumigadores de invernadero. Aunque sus valores medios se encontraban dentro del rango de la normalidad, el análisis multivariante mostró que los individuos expuestos presentaban niveles significativamente más bajos que los controles en el periodo de mayor exposición a plaguicidas.

El comportamiento de la BChE puede ser, como hemos visto, muy diferente con respecto al de la AChE; es decir, no hay que asumir a priori que ambas actividades van a seguir un curso paralelo tras la exposición a OPs o carbamatos. En este sentido, Kashyap *et al* (1984) estudiaron un grupo de 40 formuladores de plaguicidas expuestos a forato que realizaban un uso aceptable de prendas de protección personal. Observaron un descenso de la BChE y de la colinesterasa de sangre total a los 7 y 14 días del comienzo de la exposición con respecto a sus valores basales medidos con anterioridad. El efecto fue más intenso en el caso de la BChE, cuya actividad bajó un 55% en la primera semana y un 71% en la segunda. Sin embargo, 10 días después de finalizar la exposición, sólo la BChE permanecía disminuida (79% del valor basal). Por el contrario, la colinesterasa de sangre total experimentó un pequeño incremento atribuido a un fenómeno de inducción enzimática desencadenado por la exposición prolongada a niveles bajos de OPs.

Trabajadores empleados en una industria de producción de OPs mostraron una BChE significativamente más baja que la del grupo control, aunque sus niveles se situaban dentro del rango de normalidad (Podolak y Panasiuk, 1997). Los autores consideran que la BChE es un indicador de exposición más sensible que la AChE, lo cual ha sido puesto de manifiesto en exposiciones de larga duración a bajas concentraciones de OPs (Richter *et al*, 1992).

Un estudio realizado (Saiyed *et al*, 1992) sobre 24 agricultores que realizaban aplicaciones con metomilo en la India encontró igualmente un descenso significativo de la

BChE después de la aplicación del insecticida con respecto al periodo previo a la exposición (niveles basales). Sin embargo, no observaron diferencias significativas en la AChE.

Hasta este momento se han comentado una serie de estudios en los que la BChE ofrecía mejor respuesta que la AChE o la colinesterasa de sangre total. A continuación se resumen aquellos otros estudios en los que ocurre lo contrario, es decir, donde la AChE se muestra como indicador más sensible que la BChE.

Así, un estudio realizado sobre 1000 aplicadores de plaguicidas de Minnesota (Garry *et al*, 1994), clasificó los trabajadores expuestos en 4 grupos según las diferentes clases de plaguicidas que utilizaban. En el grupo de mayor exposición (que utilizaba más clases de plaguicidas en espacios cerrados) observaron que había una mayor proporción de individuos con una inhibición de las colinesterasas superior al 20% (concretamente un 43% de inhibición de la AChE y un 36% de la BChE) con respecto a los agricultores del grupo control que no aplicaban plaguicidas, aunque alguno de ellos podía estar incidentalmente expuesto a ellos (descenso del 6% en la AChE y 12% en la BChE).

Misra *et al* (1985) estudiaron diferentes parámetros bioquímicos, incluyendo las colinesterasas, en 22 trabajadores de una Unidad de Salud Pública crónicamente expuestos a fentión. Tanto la AChE como la BChE estaban significativamente disminuidas (presentaban un 70 y 74% de sus valores medios, respectivamente). Sustrayendo 2 errores estándar al valor medio de ambas colinesterasas, el 86% de los trabajadores presentaba cifras bajas de AChE mientras que sólo el 64% mostraba un descenso de la BChE. En un seguimiento posterior de estos trabajadores, efectuado a las 3 semanas de dejar de utilizar el fentión, observaron una importante y significativa recuperación de ambas colinesterasas. Se desprende, por tanto, que la AChE es un mejor indicador de exposición crónica que la BChE, tal y como hemos comentado previamente.

Un estudio realizado sobre 36 trabajadores de invernadero del País Vasco (Álvarez *et al*, 1993) encontró un pequeño descenso no significativo en los valores medios de AChE y

---

BChE entre momentos basales y postexposición (2.3% y 1.9%, respectivamente). No obstante, ningún individuo en concreto presentó un descenso superior al 25% en alguna de las dos colinesterasas.

Srivastava *et al* (1991) estudiaron un grupo de 34 trabajadores expuestos a diferentes tipos de plaguicidas en la India. Observaron una gran variabilidad en la BChE, con un coeficiente de variación de casi el 47%, de ahí que no consideraran útil este parámetro. Sin embargo, la AChE sí resultó particularmente afectada, pues sufrió un descenso medio del 31.6% respecto al grupo control.

Un estudio sobre 81 trabajadores encargados del control de plagas en Etiopía, y que utilizaban clorpirifós y profenifos, mostraron niveles de BChE y AChE postexposición significativamente más bajos que los basales (preexposición). El 16 y 40% de los trabajadores presentaba, respectivamente, niveles de BChE y AChE por debajo del 50% de los valores basales. La determinación de otras actividades enzimáticas, como fosfatasa alcalina y GPT, se situó dentro de los límites de la normalidad (Lakew y Mekonnen, 1998).

A continuación se resumen los hallazgos más significativos de una serie de estudios en los que se determina sólo una actividad colinesterasa, comentando inicialmente aquellos que obtienen resultados significativos, que son la mayoría, dejando para el final los que no los obtienen.

Desi *et al* (1986) hicieron un seguimiento a una brigada de 11 trabajadores de invernadero que fumigaban con plaguicidas de forma discontinua durante todo el año. Varios días después de aplicar OPs, carbamatos y piretroides, observaron un descenso de la colinesterasa de sangre total por debajo del límite inferior de la normalidad, aunque no era significativamente distinto de la actividad correspondiente al grupo control. Una segunda determinación analítica efectuada varios días después de aplicar sólo piretroides arrojó un valor de colinesterasa muy similar a la del grupo control, indicando una recuperación de la

misma tres meses después de la primera determinación.

Un estudio efectuado sobre 989 trabajadores de una fábrica de plaguicidas en Taiwan (Wu *et al*, 1989), observó que el 8-9% de los fabricantes, formuladores y empaquetadores de insecticidas OPs o carbámicos presentaban un descenso de la BChE, lo que consideraron una prevalencia relativamente alta. Además, el valor medio de BChE de los formuladores y empaquetadores, aunque dentro del rango de normalidad, era significativamente más bajo que el de trabajadores no relacionados con la producción de plaguicidas.

Gomes *et al* (1997) estudiaron 532 agricultores de los Emiratos Arabes Unidos dedicados al cultivo de vegetales, tanto en invernaderos como a cielo abierto, y otros tantos controles. Para determinar el grado de toxicidad debido a la exposición a OPs y carbamatos midieron la AChE y observaron que los agricultores presentaban niveles significativamente más bajos que los controles. Según estos autores, los agricultores crónicamente expuestos a bajas concentraciones de plaguicidas pocas veces presentan signos o síntomas clínicamente significativos. No obstante, consideran que un buen criterio para identificar a los agricultores con mayor riesgo de toxicidad por plaguicidas sería la utilización de patrones de morbilidad que incluyan tanto síntomas clínicos como parámetros objetivos del tipo de las colinesterasas (Gomes *et al*, 1998).

Un estudio efectuado sobre 65 trabajadores empleados en una fábrica de producción de plaguicidas de Zimbawe mostró que la adopción de malos hábitos higiénicos, tales como fumar o comer en el lugar de trabajo, se asociaba a una mayor exposición a OPs, aunque los síntomas no se correlacionaban con la actividad colinesterasa. El valor medio de BChE bajó hasta el 75.3% de la normalidad si bien el 44% de los trabajadores presentaba una BChE por debajo del 75% (Matchaba-Hove y Siziya, 1995).

Un estudio comparativo basado en 202 agricultores expuestos a plaguicidas y 42 individuos no agricultores mostró que los primeros tenían una AChE significativamente más baja. La mitad de los agricultores manifestaron haber fumigado con plaguicidas y haber

---

trabajado en sitios con un olor penetrante a estos compuestos. El 12% de los agricultores y ninguno de los no agricultores presentaba niveles muy bajos de AChE. De entre los agricultores, los que aplicaban plaguicidas eran lo que tenían niveles mucho más bajos de la actividad enzimática. Sin embargo, la exposición a plaguicidas estaba fuertemente asociada con los síntomas (Ciesielski *et al*, 1994).

Un estudio efectuado sobre 204 trabajadores dedicados al cultivo intensivo de flores y 360 controles no expuestos mostró un descenso de carácter estacional de la actividad BChE sólo en los trabajadores. Esto, de alguna manera indica que los productos anticolinesterásicos utilizados en este tipo de cultivos, pueden dar lugar a una absorción crónica por vía cutánea, e incluso oral, a pesar de la utilización de guantes (Lander *et al*, 1992). Los factores laborales que influyen significativamente sobre los niveles de BChE son la frecuencia con la que se realizan las aplicaciones y, en segundo lugar, la utilización de ropa protectora, sobre todo trajes impermeables más que máscara o guantes (Lander y Hinke, 1992).

Se han observado resultados contradictorios en las colinesterasas en el denominado "baño de la oveja", actividad desarrollada por ganaderos ingleses. Para evitar los efectos indeseables de las ectoparasitosis, las ovejas se sumergen por completo en una solución líquida de OPs. En el estudio efectuado por Rees (1996), se observó que la BChE presentaba una mayor variabilidad que la AChE. La BChE de los 24 ganaderos incluidos en el estudio estaba dentro del rango de normalidad. Por el contrario, la AChE de 13 de ellos mostró un incremento superior al 10% después del trabajo; mientras que sólo 3 casos mostraron incrementos de la BChE superiores al 15% de los valores basales. Este efecto totalmente opuesto al esperado lo justifica el autor en base al efecto de variables de confusión. Se puede descartar una posible toxicidad de carácter acumulativo y fenómenos de tolerancia ya que los ganaderos estaban expuestos a plaguicidas de forma intermitente. Sin embargo, estos fenómenos podrían tener importancia en el caso de trabajadores dedicados profesionalmente a la labor del baño de la oveja (por tanto con exposición continua).

La BChE y AChE de un grupo de 57 trabajadores empleados en la formulación de

dimetoato tampoco mostraron diferencias significativas entre las determinaciones efectuadas antes y después de la exposición, a pesar de que la absorción estimada de dimetoato excedió la dosis diaria admisible (Aprea *et al*, 1998).

Un estudio sobre fumigadores japoneses expuestos principalmente a OPs y piretroides observó un descenso de la AChE con respecto a los controles en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Simultáneamente presentaban también una menor calidad del semen. Asimismo observaron alteraciones hormonales, concretamente un descenso de los niveles séricos de testosterona con normalidad de LH y FSH en el periodo de menor exposición a plaguicidas (Kamijima *et al*, 2004).

Trabajadores de una plantación de flores de Ecuador expuestos a plaguicidos clasificados como muy tóxicos por la OMS (entre ellos fenamifos y aldicarb) presentaron una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas que los controles. El 88% de ellos tenía la AChE por debajo del límite inferior de normalidad. Observaron una correlación negativa entre la AChE y la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (Paz y Mino *et al*, 2002).

La AChE de 65 campesinos mejicanos de la región de Chiapas mostró niveles significativamente más bajos que el valor basal de preexposición y también que el grupo de referencia sin exposición ocupacional (Tinoco-Ojanguren y Halperin, 1998). Los autores sugieren un mayor riesgo de efectos adversos sobre la salud en las comunidades más pobres que manipulan plaguicidas.

Un trabajo en el que se revisó la actividad AChE de una cohorte de 1680 a 3800 aplicadores urbanos de plaguicidas mostró que el 0.44% tuvo que ser retirado del trabajo por presentar niveles bajos de AChE como consecuencia de la exposición a insecticidas anticolinesterásicos (Yeary *et al*, 1993).

---

## **B) Colinesterasas y utilización de EPIs**

---

A continuación se resume la información más relevante relativa a alteraciones de las colinesterasas en trabajadores en función del grado de utilización de equipos de protección personal (EPIs).

- Trabajadores dedicados al cultivo de algodón expuestos a carbamatos y que no utilizaban EPIs mostraron un ligero descenso de la BChE durante el periodo de exposición. Sin embargo, el resto de parámetros clínicos, bioquímicos y hematológicos no sufrió alteraciones (More et al, 2003).
- Mediante regresión logística se intentaron caracterizar los factores de riesgo asociados a la intoxicación por plaguicidas en agricultores brasileños. Los siguientes fueron estadísticamente significativos: no utilización de EPIs por los aplicadores de plaguicidas, manejo de carbamatos y OPs, haber contactado con plaguicidas en las dos semanas previas a la extracción de la muestra de sangre y haber recibido instrucciones por el vendedor de plaguicidas (Soares et al, 2003).
- Agricultores nicaragüenses que utilizaban EPIs no mostraron alteraciones de la BChE; sin embargo, aquellos otros que no hacían uso de los mismos sí presentaban un descenso significativo de la actividad enzimática (Hruska y Corriols, 2002).
- Agricultores de Tanzania dedicados al cultivo del café no mostraron asociación entre la AChE y el uso de EPIs (guantes, botas, gorro, máscara o peto). La actividad

enzimática tampoco se afectaba tras la exposición a OPs, indicando que utilizaban productos de escasa toxicidad (Ngowi et al, 2001).

- Es curioso el caso de una intoxicación aguda ligera por OPs en un individuo de una industria de reciclado de envases de plaguicidas que tenía rotas las suelas de los zapatos durante varios días de intensa lluvia que arrastró restos de plaguicidas al suelo. Ello pone de manifiesto la importancia de la utilización de botas como EPIs (Wang et al, 2000).
- Un estudio de revisión sistemática concluye que los EPIs son efectivos para reducir la exposición y que la monitorización mediante BChE puede identificar a trabajadores con mayor riesgo de sobreexposición a plaguicidas (Keifer, 2000).
- La inhibición de AChE en agricultores de los Emiratos Árabes Unidos mostró una correlación inversa con el uso de guantes, monos, mascarillas y con la mejora de las condiciones higiénicas en el trabajo (Gomes et al, 1999). Por el contrario, se asoció de forma directa con la frecuencia de fumigación. Los autores concluyen que los agricultores de países en vías de desarrollo no suelen usar EPIs durante la utilización de plaguicidas.
- Un estudio sobre 123 agricultores de Ghana mostró una mayor prevalencia de síntomas clínicos y niveles de AChE más bajos en los agricultores que en los controles. Como prácticas de riesgo observaron las siguientes: frecuente manipulación de plaguicidas, almacenamiento de los mismos en sus propias casas y no respetar el plazo de seguridad. Asimismo, el uso de EPIs era mínimo por falta de recursos

---

económicos (Clarke et al, 1997).

- La BChE de trabajadores japoneses dedicados al control de plagas que utilizaban mascarillas simples era más baja que la de los que usaban máscaras de gas. También era menor en los trabajadores que cambiaban menos la ropa de trabajo con respecto a los que lo hacían con más frecuencia (Ueda et al, 1992).
- Trabajadores empleados en la fabricación de plaguicidas de Taiwan tenían una BChE inhibida con respecto a otros trabajadores que no se dedicaban a la producción. La mala ventilación y las malas condiciones higiénicas del trabajo mostraron una tendencia a disminuir la BChE aunque de forma no significativa (Wu et al, 1989).

### **C) Fenotipado sérico de colinesterasa.**

---

Además de las formas usuales de BChE, en suero humano existen aproximadamente unas 9 variantes anormales debidas a diferentes mutaciones genéticas. El número exacto es incierto debido a que aún no se ha confirmado si todos los tipos descritos representan realmente nuevas variantes. Se conocen unos 20 fenotipos distintos de los que sólo 10 han sido identificados claramente por medio de pruebas bioquímicas estándar.

El descubrimiento por Karlow de la variante atípica (A) de la butirilcolinesterasa proporcionó una explicación bioquímica a la apnea prolongada con que reaccionaban determinados pacientes (portadores de la misma) a la succinil colina, un relajante muscular de acción corta (Simeon-Rudolf *et al*, 1999). La duración de la acción de la succinilcolina es 3 veces superior en los individuos heterocigotos para algún gen anormal y 18 veces mayor en los homocigotos, con respecto a los que no presentan la anormalidad (Jensen *et al*, 1995). Este

hallazgo surgió tras observar que la colinesterasa atípica es resistente a la inhibición por el anestésico local dibucaína. Mientras que la enzima usual se inhibe en un 80%, la variante atípica muestra sólo un 20% de inhibición. Este hallazgo propició la búsqueda de otras variantes genéticas, conduciendo finalmente a la detección del enzima resistente al fluoruro (F) y a varios alelos cuantitativamente deficientes: silente (S), Karlow (K) y James (J).

La determinación de la actividad enzimática, junto a la inhibición selectiva y los estudios familiares, permitieron la identificación de diferentes productos génicos de butirilcolinesterasa. Con la ayuda de las actividades catalíticas y los números de inhibición (porcentaje de inhibición con dibucaína, fluoruro y el dimetilcarbamato Ro 02-0683) se pueden distinguir 10 combinaciones genéticas de las variantes usual, atípica, fluoruro resistente y silentes en suero de individuos homo y heterocigotos (Simeon-Rudolf *et al*, 1999).

Es importante resaltar que la AChE (tanto en eritrocitos como en el tejido nervioso) tiene un control genético distinto del de la BChE, que se sintetiza en el hígado. Por tanto, el déficit congénito de la BChE no constituye un riesgo específico frente a la toxicidad de los OPs o carbamatos, ya que esta se ejerce a nivel de los neuroreceptores. Sin embargo, estos individuos podrían tener un riesgo algo más elevado debido a un desfavorable potencial estequiométrico.

Los estudios realizados en Europa indican que la prevalencia del déficit congénito de BChE en la población general es de aproximadamente un 4% (Rosenman y Guss, 1997). Estos autores estudiaron un total de 127 trabajadores americanos durante un programa de salud ocupacional y observaron que el 3.9% tenía niveles basales por debajo del límite inferior de normalidad, pero en ningún caso se trataba de homocigotos para la deficiencia genética sino de heterocigotos. Hernández *et al* (1999), tampoco encontraron ningún caso de homocigocia para la variante atípica en una muestra de 187 donantes de sangre sanos de la provincia de Granada. Sin embargo, observaron que casi el 23% de los individuos estudiados presentaban fenotipos inusuales de BChE (US, UA y UF), mientras que un 1% mostraba niveles muy bajos de la actividad enzimática por lo que serían muy sensibles a los OPs. De forma interesante

---

observaron que los individuos con fenotipo sérico de muy baja actividad tenían niveles de paraoxonasa significativamente más bajos, por lo que se pueden considerar particularmente sensibles a la toxicidad de los OPs. De ahí que el fenotipado sérico de ambas actividades enzimáticas tenga interés en la vigilancia de la salud de los trabajadores expuestos.

## 1.2. Paraoxonasa (PON1)

Inicialmente el interés sobre la paraoxonasa (PON1) se centró en su capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados (OPs). De hecho su nombre deriva de uno de los sustratos artificiales más utilizados, el paraoxón, metabolito activo del insecticida paratión. Posteriormente, en la década de los noventa se puso de manifiesto su implicación en el metabolismo lipídico, desempeñando un papel importante en las primeras fases de la patogenia de la aterosclerosis (Mackness et al, 1991), alcanzando un gran protagonismo como factor de riesgo/protector en la enfermedad cardiovascular. Últimamente se ha observado que algunos de sus sustratos naturales son carbonatos cíclicos y lactonas, por lo que podría metabolizar determinados medicamentos debido a su actividad lactonasa (Draganov et al, 2000).

Los primeros estudios poblacionales en los que se determinaba la actividad con paraoxón revelaron una distribución trimodal de la actividad, lo que permitía dividir a la población en tres fenotipos en función de la mayor o menor tasa de hidrólisis de paraoxón: los de actividad baja, alta e intermedia (Geldmacher-von Mallinckrodt y Diepgen, 1988). Posteriormente se diseñaron procedimientos bioquímicos para caracterizar más fácilmente tales fenotipos y poder separarlos con mayor claridad, para lo cual se determinaba también la actividad PON1 con otro sustrato artificial (fenilacetato, que correspondía a la actividad arilesterasa, ArE). Además, la paraoxonasa se determinaba en presencia y ausencia de NaCl 1 M, lo cual daba lugar a la actividad salina (ssPOasa) y basal (POasa), respectivamente (Eckerson et al, 1983). Ello permitía inferir los fenotipos de dos formas:

- Calculando el porcentaje de estimulación salina de la paraoxonasa de la siguiente forma:  $100 * \frac{ssPOasa - POasa}{ssPOasa}$ . Al representar gráficamente este cálculo mediante el correspondiente histograma de frecuencias se obtenían dos modos (es decir, dos distribuciones normales) separadas por un antimodo que suele oscilar entre el 50 y el 70% de estimulación salina. De esta manera, los individuos incluidos en el primer modo son los que presentan el fenotipo AA, mientras que los del segundo modo son los portadores del alelo B (fenotipos BB y AB).
- Otra forma de inferir los fenotipos séricos es representando gráficamente mediante histograma de frecuencias el cociente entre la actividad ssPOasa y la ArE. Ello generaba tres nubes de puntos, correspondientes a cada uno de los fenotipos (AA, AB y BB).

En 1993 se identificaron las bases genéticas de dicho polimorfismo, es decir, de la distribución polimodal de la actividad POasa (Adkins et al, 1993; Humbert et al, 1993). Consistía en la existencia de una mutación en la región codificante de la PON1 que daba lugar a la sustitución del aminoácido glutamina (Q) en posición 192 por arginina (R). Así, la tasa de hidrólisis de paraoxón (POasa) disminuía en el siguiente orden: 192 RR > 192 QR > 192 QQ. Los genotipos RR, QR y QQ corresponden a los fenotipos BB, AB y AA. Además se observaron diferentes distribuciones genóticas y alélicas en función de la ubicación geográfica de las poblaciones, con una mayor frecuencia del alelo R en poblaciones orientales (Williams et al, 1993).

Posteriormente se identificó un segundo polimorfismo en la región codificante, por sustitución del aminoácido leucina (L) por metionina (M) en posición 55. En 1996 se identificaron varios genes paraoxonasa (Primo-Parmo et al, 1996), por lo que pasó a considerarse como una familia multigénica que en humanos se localiza en el cromosoma 7.

---

Así estaban el *PON1*, *PON2* y *PON3*, de todos estos genes el más estudiado hasta el momento era el *PON1* que daba lugar a la paraoxonasa sérica, enzima sintetizada en el hígado y posteriormente vertida al torrente sanguíneo. A partir del año 2000 se describen más polimorfismos en la región promotora o reguladora del gen, algunos de los cuales modulaban la cantidad de proteína presente en suero (entre ellos el *PON1* -108 C/T).

El genotipo *PON1* 192 se puede predecir con una elevada exactitud mediante la representación gráfica de las actividades POasa y ArE (Eckerson et al, 1983) o POasa y diazoxonasa (DZOasa, Richter y Furlong, 1999). Sin embargo, existe un 5-10% de desajuste entre ambos procedimientos (fenotipado y genotipado) que puede obedecer a diversas mutaciones genéticas de tipo “nonsense” y “missense” (Jarvik et al, 2003) que conducen a fallos en la proteína final, la cual a pesar de tener un genotipo *PON1* 192RR, muestra escasa actividad enzimática.

En cuanto a la relación de la *PON1* con el metabolismo de los OPs se sabe que diversos insecticidas organofosforotioatos (entre ellos paratión, clorpirifós, diazinón) siguen una vía metabólica en dos pasos, que incluyen una bioactivación del compuesto original por el sistema CYP450 microsomal y la posterior hidrólisis del metabolito oxigenado (oxón) por las paraoxonasas hepática y sérica (Furlong et al, 2000a). Al existir un polimorfismo funcional de esta enzima, los individuos con genotipo QQ (fenotipo AA) muestran una menor tasa de hidrólisis de los OPs, por lo que serían más sensibles a estos compuestos que los portadores del genotipo RR (fenotipo BB). De esta forma, la caracterización del genotipo o fenotipo *PON1* permitiría establecer a priori la mayor o menor sensibilidad de individuos expuestos a OPs. En otras palabras, dicho parámetro puede constituir un importante biomarcador de susceptibilidad individual, con importantes aplicaciones a nivel laboral, ambiental e incluso militar.

Hemos visto que la isoforma Arg192 (*PON1* 192R) hidroliza paraoxón rápidamente mientras que la isoforma Gly 192 (*PON1* 192Q) lo hace mucho más lentamente. Sin embargo, ambas hidrolizan el fenilacetato y clorpirifós-oxón a aproximadamente la misma velocidad.

Este polimorfismo es totalmente opuesto para el caso de los gases nerviosos (sarín, somán) pues la PON1 192 R prácticamente no hidroliza el sarín mientras que la PON1 192 Q muestra una importante actividad sarinasa. Además, esta isoforma Q también hidroliza diazoxón mucho más rápidamente que la R (Furlong et al, 1998).

Estudios relativamente recientes del grupo de Costa y Furlong han encontrado resultados sorprendentes y discordantes con lo expuesto anteriormente. Así, diseñaron ratones “knock-out” a los que les suprimieron el gen PON1 y, por tanto, carecían de actividad paraoxonasa sérica o hepática. Estos ratones eran particularmente sensibles al clorpirifós-oxón y diazoxón, pero sorprendentemente no eran más sensibles al paraoxón que los ratones normales (Furlong et al, 2000b). La explicación de este hecho residía en la diferente eficacia catalítica ( $K_m/V_{max}$ ), más desfavorable para el paraoxón. La isoforma PON1 192Q humana tiene una eficacia catalítica similar a la del ratón, sin embargo, la de la 192R es mucho mejor, de manera que se puede predecir que los individuos que expresan niveles altos de la isoforma PON1 192R presentan una mayor resistencia a la toxicidad del paraoxón. Estos autores consideran asimismo que la PON1 tiene escasa eficiencia para hidrolizar paraoxón a bajas dosis, por lo que la PON1 no degrada eficientemente el paraoxón “in vivo”, siendo necesario el concurso de otras vías metabólicas para llevarlo a cabo (como por ejemplo, el CYP450, carboxilesterasas, etc.).

Estudios “in vivo” con ratones “knock-out” mostraron que las dos isoformas de PON1 (192R o 192Q) protegían a los ratones de forma similar frente al diazoxón, mientras que la isoforma 192R confería mejor protección frente al clorpirifós-oxón que la 192Q. Por el contrario, la inyección de PON1 de conejo o de cualquiera de las dos isoformas PON1 192 humanas no protegían el ratón “knock-out” de la toxicidad del paraoxón. El análisis cinético de las dos isoformas humanas de PON1 192 reveló que la eficacia catalítica determina la eficacia in vivo de la PON1 para la degradación de los OPs. En definitiva, la PON1 juega un papel destacado en la detoxificación del diazoxón y clorpirifós, pero no del paraoxón (Li et al, 2000).

---

En una revisión reciente, Costa et al (2005) intentan explicar la enorme variación poblacional de la actividad paraoxonasa sérica, que puede llegar a ser de hasta 40 veces. Consideran que los polimorfismos genéticos tanto de la región codificante (Q192R) como de la región 5' reguladora (T-108C) son la principal causa de la misma, pero que también influyen una serie de factores ambientales que pueden modular la PON1:

- *Compuestos exógenos*: sustancias químicas ambientales, como por ejemplo metales pesados (muchos de ellos afectan la actividad enzimática “in vitro” aunque posteriores estudios “in vivo” no han mostrado tales alteraciones), plaguicidas (aldrín), medicamentos (estatinas, glucocorticoides) o inductores clásicos (fenobarbital, 3-metilcolantreno).
- *Estilos de vida*: el consumo de tabaco se asocia a una menor actividad PON1 por interaccionar sus aldehídos reactivos (formaldehído, acetaldehído, acroleína, crotonaldehído) e hidrocarburos aromáticos con el grupo sulfhidrilo libre de la molécula de PON1, lo que conduce a una inhibición de la misma. Por otro lado, el consumo de alcohol da lugar a un efecto bifásico sobre la actividad PON1, pues a dosis bajas produce un aumento de la misma mientras que las dosis altas originan una importante disminución.
- *Dieta*. Las dietas aterogénicas (ricas en colesterol) y aquellas otras ricas en grasas *trans* originan un descenso de la actividad PON1. Por el contrario, los ácidos grasos omega-3 y, sobre todo, el ácido oleico del aceite de oliva dan lugar a un importante aumento de la actividad PON1. Además, la ingesta de algunos antioxidantes también conduce a niveles más altos de PON1, como es el caso de flavonoides, vino tinto y zumo de granada, posiblemente por impedir que especies oxidantes inhiban los grupos sulfhidrilo de la PON1.
- *Edad y sexo*. La actividad PON1 es baja al nacer y aumenta progresivamente con la edad hasta alcanzar una meseta hacia los 6-15 meses de vida. Posteriormente, la

actividad disminuye con el paso de los años, efecto que es significativo en los ancianos ya que en esta edad tiene lugar una mayor producción de estrés oxidativo así como un mayor grado de aterosclerosis. Con respecto al sexo, la heterogeneidad genética de los humanos impide detectar diferencias de la actividad PON1, aunque algunos estudios han observado niveles algo más elevados en mujeres, pero no de forma significativa.

- *Condiciones fisiopatológicas.* El embarazo origina una menor actividad PON1, mientras que el ejercicio moderado aumenta la actividad. Con respecto a algunas enfermedades, generalmente se suele describir un descenso de la actividad enzimática, como por ejemplo en la diabetes, insuficiencia renal crónica (subsidiaria de hemodiálisis), artritis reumatoide, enfermedad del ojo de pez, hipertiroidismo, demencia vascular y tipo Alzheimer, hepatitis crónica, cirrosis y en la respuesta de fase aguda.

#### **A) Estudios epidemiológicos de exposición a plaguicidas y genotipos PON1**

---

- *Agricultura.* Lee et al (2003) estudiaron 100 granjeros de Sudáfrica y encontraron que los portadores del alelo Q de PON1 (genotipos QQ o QR) tenían casi 3 veces más probabilidad de presentar sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas que los individuos con genotipo RR. La prevalencia de toxicidad crónica aumentaba en una forma gen-dependiente (59% en portadores del genotipo RR y 75% en los del QQ). Los autores concluyen que el genotipo PON1 es un importante determinante de la susceptibilidad de agricultores a la intoxicación crónica por plaguicidas. Estudios propios de nuestro grupo sobre aplicadores de plaguicidas en invernadero han mostrado que los portadores del alelo R tienen 5 veces más probabilidad de inhibir la BeChE por encima de un 25% con respecto a los que

---

presentan un fenotipo QQ (Hernández et al, 2004). Además, la utilización de OPs da lugar a una menor actividad ssPOasa en los fumigadores y ello independientemente de los polimorfismos genéticos de PON1 así como de otros posibles factores de confusión (Hernández et al, 2003).

- Baño de la oveja (“sheep dipping”). El grupo de Mackness ha realizado un estudio en ganaderos ingleses que emplean diazinón con objeto de destruir los ectoparásitos que afectan a las ovejas y menoscaban su productividad. Observaron que los ganaderos que mostraban sintomatología crónica atribuida a la exposición a OPs tenían una mayor probabilidad de presentar el alelo PON1 192R así como una menor tasa de hidrólisis de diazoxón (es decir, menor actividad DZOasa) que los controles. Por tanto, sus manifestaciones clínicas podrían explicarse por una menor capacidad de detoxificar el diazoxón (Mackness et al, 2003).
- *Síndrome de la Guerra del Golfo*. En base a los polimorfismos genéticos de la PON1, que determinan la diferente tasa de hidrólisis de OPs, se ha intentado explicar por qué algunos veteranos de guerra desarrollaron dicho síndrome mientras que otros no. Haley sugirió que este síndrome estaba relacionado con la exposición de los soldados a una combiación de OPs, agentes nerviosos, altas concentraciones de DEET (un repelente de insectos) y a cierto grado de toxicidad aguda derivada de la ingesta de piridostigmina durante la guerra. Haley et al (1999) observaron que los veteranos de guerra con manifestaciones neurológicas tenían más probabilidad de presentar el alelo R de PON1 (homocigotos RR y heterocigotos QR) que los controles. No obstante, la variable “baja actividad enzimática dentro del alelo Q” distinguía aún mejor a los veteranos de los controles que cualquier otra actividad enzimática (incluyendo colinesterasas) o isoformas de PON1. Precisamente el tipo Q de PON1 hidroliza con

mayor eficacia varios OPs, entre ellos sarin, somán y diazinón. Posteriormente se observó que la actividad somanasa y sarinasa corría paralela a la del tipo Q de PON1 (La Du et al, 2001). Por su parte, Mackness et al (2000) observaron que la actividad POasa era un 50% menor en un grupo de veteranos británicos que en los controles y que esa menor actividad era independiente del genotipo PON1. Asimismo, la PON masa (concentración de proteína en sangre) era algo menor en los veteranos con respecto a los controles. Sin embargo, no observaron diferencias en la tasa de hidrólisis de diazoxón (DZOasa). Los autores concluyeron que la menor capacidad de detoxificar insecticidas OPs derivada de una baja actividad PON1 podría contribuir a la aparición del síndrome de la guerra del golfo. De todas formas, no se encontraron evidencias de que los veteranos hubieran estado expuestos directamente a gases neurotóxicos (La Du et al, 2001) por lo que se planteó la hipótesis de que podrían haberlo estado a alguna sustancia química o tóxico ambiental que mostrara asimismo preferencia para ser hidrolizado por la isoenzima PON1 Q. En un estudio posterior, el grupo de Mackness (Hotopf et al, 2003) confirmó que los veteranos de la guerra del golfo mostraban una POasa significativamente menor que la de otros grupos militares de control (veteranos de Bosnia sintomáticos y controles militares sintomáticos no desplegados en ninguna zona de conflicto) y ese efecto era independiente del estado de salud de los veteranos de guerra.

## **2. ENZIMAS DE ESTRÉS OXIDATIVO INTRAERITROCITARIAS**

### **2.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)**

Diversos estudios experimentales han mostrado tanto incrementos como descensos en esta actividad enzimática en eritrocitos de rata. Así, Thapar et al (2002) observaron un descenso significativo de la G6PDH eritrocitaria tras la administración subaguda de acefato, un compuesto OP. Previamente, Agrawal et al (1991) también observaron un descenso de la G6PDH después de una dosis única de hexaclorociclohexano (HCH, 1/3 de la DL<sub>50</sub>).

Por el contrario, Kiran et al (1990) observaron un incremento de G6PDH en eritrocitos de rata tras 4 días de tratamiento con endosulfán. Pero este efecto estaba en función de la edad del animal, pues sólo lo mostraban las ratas de 30 y 70 días de edad, pero no las de 15 y 365 días. Asimismo, estudios “in vitro” han documentado un descenso de la G6PDH tras incubar eritrocitos humanos con ácido 4-clorofenoxiacético, un herbicida de la familia de los clorofenoxiácidos (Aliciguzel et al, 2001) o con fosforamidón, un insecticida organofosforado (Datta et al, 1992). En cultivos celulares el diaquat también induce una menor actividad G6PDH (Slaughter et al, 2002).

En el caso del paraquat, el tratamiento subcrónico da lugar a un aumento de la G6PDH en varios tejidos, incluyendo hígado de rata, probablemente con objeto de normalizar los bajos niveles de NADPH derivados de un descenso de glucógeno y posterior descenso de glucosa 6-fosfato.

## 2.2. Glutation reductasa (GR)

Estudios previos han mostrado un comportamiento desigual de esta enzima, con incrementos y descensos de su actividad tras administrar diferentes plaguicidas a animales de experimentación (ratas). Así, Thapar et al (2002) señalaron un aumento de la actividad GR en eritrocitos de rata tras la administración subaguda de acefato. Ahmed et al (2000) también observaron un aumento de la GR en suero de ratas tras la administración subcrónica de malatión.

Por el contrario, se ha observado un descenso de GR en eritrocitos de rata tras la administración de fosforamidón (Datta et al, 1992) y endosulfán (Cereser et al, 2001). Un estudio diferente confirmó el descenso de la GR en eritrocitos de rata tras la administración de endosulfán, pero sólo en animales de 30 y 70 días no en las de 15 y 365 días (Kiran et al, 1990). El tiram, un fungicida ditiocarbamato, también produce este mismo efecto en ensayos “in vitro” con cultivos celulares (Naqvi y Vaishnavi, 1993). Agrawal et al (1991), tras administrar una dosis única de HCH (1/3 DL<sub>50</sub>) observaron un descenso de la GR en eritrocitos de rata. Sin embargo, este mismo compuesto dio lugar a un aumento de dicha actividad en cerebro de rata tras exposiciones subagudas y subcrónicas (Sahoo et al, 2000).

Pedrosa et al (2001) observaron que la administración subaguda y subcrónica de dosis terapéuticas de benzonidazol ocasionaba un aumento de la GR en hígado de ratas al principio del tratamiento pero una disminución al final del mismo. Con respecto a otros agentes tóxicos, se ha visto que el plomo origina una disminución de la GR en hígado de ratas (Sandhir et al, 1995).

### 2.3. Catalasa (CAT)

La CAT, como hemos comentado previamente, protege a las células de los efectos nocivos del peróxido de hidrógeno generado dentro de ellas. Aunque en condiciones normales la CAT no es esencial para algunos tipos celulares, juega un importante papel en el desarrollo de tolerancia al estrés oxidativo como respuesta adaptativa de las células (Hunt et al, 1998). A diferencia del hígado o del riñón, donde la CAT se localiza en los peroxisomas, en los eritrocitos se encuentra en forma soluble, ya que su función fisiológica es evitar la peroxidación de la hemoglobina (Aebi, 1984).

John et al (2001) han observado un aumento de CAT en eritrocitos de rata tras la administración subcrónica de dimetoato y malatión. Ahmed et al (2000) y Akhgari et al (2003) también observaron, de forma independiente, un incremento de la CAT eritrocitaria tras administrar malatión de forma subcrónica a ratas.

Por el contrario, Altuntas et al (2002) observaron el efecto opuesto, es decir, un descenso de la CAT en eritrocitos de rata tras administrar una dosis única de metidatión. Estudios “in vitro” han confirmado este hallazgo pero sólo con dosis altas de fosalón, otro compuesto OP (Altuntas et al, 2003).

Con relación a otros tejidos, Gupta et al (1998) observaron un efecto dual, pues mientras que la administración subaguda de quinalfós a ratas recién nacidas ocasionaba un aumento de la CAT en cerebro, la administración subcrónica daba lugar a un descenso de la misma.

La administración subaguda, subcrónica y crónica de dosis altas de cipermetrina a ratones se siguió de un descenso de la CAT eritrocitaria. Por el contrario, la administración de una dosis única de cipermetrina y fenilvalerato a ratas dio lugar a un incremento de la misma (Kale et al, 1999).

Con respecto a experiencias con organoclorados, Sahoo et al (2000) observaron que la administración subaguda y subcrónica de HCH a ratas ocasionaba un descenso de la CAT en cerebro. Por su parte, diversos herbicidas de la familia de los clorofenoxiácidos han producido “in vitro” una disminución de la CAT de eritrocitos (Bukowska et al, 2000; Aliciguzel et al, 2001). Por el contrario, Pedrosa et al (2001) observaron un aumento de la CAT en hígado de ratas tratadas de forma subaguda y subcrónica con dosis terapéuticas de benzonidazol. En la misma línea, dosis únicas de PH<sub>3</sub> han dado lugar a descensos de la CAT en riñón y corazón de ratas (Hsu et al, 2002).

Estudios en humanos han obtenido también resultados contradictorios. Prakasan et al (2001) observaron un aumento de CAT eritrocitaria en fumigadores con más de 5 años de exposición a diferentes plaguicidas. Banerjee et al (1999) observaron el mismo efecto en casos de intoxicaciones agudas por lindano, malatión y propoxur. Por el contrario, Zhou et al (2002) señalaron un descenso de CAT eritrocitaria en intoxicaciones agudas por OP, así como una correlación directa entre AChE y CAT.

Estudios realizados con otro tipo de tóxicos, en este caso metales pesados, han encontrado un descenso de la CAT en eritrocitos de ratas tratadas con cadmio (Sarkar et al, 1997) y de la CAT hepática de ratas tratadas con plomo (Sandhir et al, 1995). En el caso de consumidores de MDMA (éxtasis) se ha observado también un descenso de la CAT eritrocitaria (Zhou et al, 2003).

## 2.4. Glutation Peroxidasa (GPx)

Estudios previos han mostrado tanto aumentos como descensos de la GPx en eritrocitos de rata tras la administración de diversos plaguicidas. Así, Bebe et al (2003) observaron que la administración subcrónica de dosis bajas de clorpirifós y endosulfán daba lugar a un descenso de la actividad GPx en plasma de rata, mientras que dosis altas producían un incremento de la misma. Altuntas et al (2002) observaron un descenso de la GPx eritrocitaria después de la administración de una dosis única de metidatió. Este mismo grupo confirmó el descenso de GPx en estudios “in vitro” tras incubar fosalón con sangre, aunque dicho efecto sólo se observó a dosis altas (Altuntas et al, 2003).

Por el contrario, Gultekin et al (2001) no observaron alteración de la GPx eritrocitaria después de tratar ratas con clorpirifós-etil durante dos días, pero sí de otros parámetros de estrés oxidativo. Tampoco se han observado alteraciones de la GPx eritrocitaria al incubar “in vitro” el herbicida ácido 4-clorofenoxiacético con sangre (Aliciguzel et al, 2001).

Por su parte, Ahmed et al (2000) señalaron un aumento de GPx eritrocitaria tras administrar malatió de forma subcrónica a ratas. Estudios “in vitro” con fosforamidón (otro insecticida organofosforado) han observado un aumento de GPx en eritrocitos y un descenso de la misma en plasma. Gupta et al (1998) describen ligeros incrementos de GPx en cerebro tras la administración subaguda y subcrónica de quinalfós a ratas recién nacidas.

Estudios epidemiológicos en humanos han encontrado aumentos significativos de la GPx eritrocitaria tanto en fumigadores expuestos a diversos plaguicidas (Prakasam et al, 2001) como en individuos que han sufrido una intoxicación aguda por lindano, malatió o propoxur (Banerjee et al, 1999). Por el contrario, Zhou et al (2002), han descrito un descenso de la GPx en eritrocitos de personas con intoxicaciones agudas por diferentes organofosforados, así como una correlación directa entre AChE y GPx.

La administración de deltametrina a ratones en diferentes regímenes (subagudo, subcrónico y crónico) dio lugar a un descenso de la GPx eritrocitaria, pero sólo a dosis altas (Yarsan et al, 2002). Idéntico resultado se ha observado tras la administración subcrónica de cipermetrina (Gabbianelli et al, 2002). Sin embargo, la cipermetrina, tanto en dosis únicas como repetidas, no dio lugar a alteraciones de la GPx en otros tejidos de rata, como hígado o cerebro (Giray et al, 2001).

En el caso de los organoclorados, se ha descrito un descenso de la GPx en cerebro de rata tras la administración subaguda y subcrónica de HCH (Sahoo et al, 2000). Sin embargo, este mismo compuesto no modificó la GPx eritrocitaria de rata tras la exposición a dosis altas - 1/3 de la DL<sub>50</sub>- (Agrawal et al, 1991).

Otros plaguicidas, como el PH<sub>3</sub> en dosis únicas, también produce incrementos de la GPx en riñón y corazón de ratas (Hsu et al, 2002). Slaughter et al (2002) han documentado un descenso de GPx en cultivos celulares tras incubar células de neuroblastoma humano con diquat. Estos autores, al utilizar cumeno hidroperóxido como sustrato determinan la GPx total, más susceptible de inactivarse por el anión superóxido. Además, al estar localizada dicha enzima preferentemente en el citoplasma, las lesiones de la membrana celular secundarias al estrés oxidativo pueden facilitar su salida del interior de la célula. El efecto conjunto de estos dos fenómenos explicaría el descenso de la GPx.

Además de los plaguicidas, otros tóxicos como el MDMA es capaz de producir descensos de la GPx eritrocitaria en consumidores de esta droga (Zhou et al, 2003). También, los metales pesados pueden alterarla; así, el plomo por ejemplo produce un descenso de la GPx en hígado de rata (Sandhir et al, 1995).

## 2.5. Superóxido Dismutasa (SOD)

Al igual que ocurre con los enzimas anteriores, estudios previos han mostrado tanto incrementos como descensos de la SOD eritrocitaria tras la exposición a diferentes tipos de plaguicidas. Así, Dowla et al (1996) observaron un descenso “in vitro” de la SOD tras incubar sangre con diversos plaguicidas, entre ellos acefato, metamidofós, cadmio, nicotina e hidrazida maleica. El mismo grupo confirmó posteriormente este resultado en agricultores de granjas de tabaco expuestos a los mismos plaguicidas (Panemangalore et al, 1999). Recientemente, este equipo ha realizado experimentos “in vivo” (Bebe y Panemangalore, 2003) y han observado que la administración subcrónica de clorpirifós y endosulfán a ratas produce efectos opuestos sobre la SOD eritrocitaria (aumento y descenso, respectivamente).

Otros estudios realizados con diversos OP han obtenido resultados contradictorios. Así, se ha observado un descenso de la SOD eritrocitaria con metidation (Altuntas et al, 2002), clorpirifós-etil (Gultekin et al, 2001) y fosalón (Altuntas et al, 2003) y un aumento de la misma con dimetoato y malatión (John et al, 2001; Ahmed et al, 2001; Akhgari et al, 2003) y fosforamidón (Datta et al, 1992).

En otros tejidos se han encontrado también resultados contradictorios, pues la administración subaguda de quinalfós a ratas recién nacidas produjo un aumento de SOD en cerebro, mientras que la administración subcrónica dio lugar a un descenso de SOD cerebral.

Estudios epidemiológicos en humanos han mostrado preferentemente un incremento de SOD en eritrocitos de fumigadores con más de cinco años de exposición a plaguicidas (Prakasam et al, 2001) así como en individuos que han sufrido una intoxicación aguda por lindano, malatión o propoxur (Banerjee et al, 1999). Por el contrario, Zhou et al (2002) observaron un descenso de la SOD eritrocitaria en casos de intoxicaciones agudas por diversos organofosforados y una correlación directa entre AChE y SOD.

Las piretrinas también son capaces de afectar la SOD. Así, Yarsan et al (2002) han observado un descenso de la SOD eritrocitaria tras la administración subaguda, subcrónica y crónica de deltametrina a ratas. Por el contrario, Kale et al (1999) observaron un incremento de SOD en eritrocitos de rata tras la administración de dosis únicas de cipermetrina y fenilvalerato.

Los organoclorados, por su parte, afectan también la SOD de forma desigual. Se ha descrito un aumento de la SOD eritrocitaria de rata tras la administración subcrónica de DDT y lindano (Koner et al, 1998). Por el contrario, la administración subaguda y subcrónica de HCH ocasionó un descenso de SOD en cerebro de rata (Sahoo et al 2000).

Otro tipo de plaguicida, el PH<sub>3</sub> en dosis únicas, ha producido un aumento de SOD en riñón y corazón de ratas (Hsu et al, 2002). Sin embargo, los clorofenoxiácidos no alteran la SOD eritrocitaria, al menos en estudios “in vitro” (Aliciguzel et al, 2001).

Con respecto a tóxicos distintos de los plaguicidas, se ha documentado un descenso de la SOD en sangre de consumidores de MDMA (Zhou et al, 2003), en eritrocitos de ratas tratadas con cadmio (Sarkar et al, 1997) y en hígado de ratas tratadas con plomo (Sandhir et al, 1995).

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## **1. JUSTIFICACIÓN**

En el balance riesgo-beneficio de los plaguicidas hay que considerar no sólo los efectos agudos sobre la salud sino también la posible aparición de efectos crónicos. Estos últimos pueden aparecer en la población general, debido a la exposición ambiental y/o alimentaria, pero mucho antes se observarían en los trabajadores con exposición ocupacional a plaguicidas. Los síntomas clínicos relacionados con la exposición crónica son muy inespecíficos y fácilmente pasan desapercibidos, siendo difícil establecer una relación causal con estos compuestos. Sin embargo, antes que ellos tienen que producirse una serie de alteraciones bioquímicas cuya identificación sería de gran importancia para poder realizar un diagnóstico precoz de la intoxicación, e impedir así su manifestación clínica. Para ello pueden ser de gran utilidad los denominados marcadores biológicos o “biomarcadores”, tanto de exposición, efecto como de susceptibilidad.

Se han realizado considerables esfuerzos para obtener una serie de indicadores capaces de relacionar la exposición a plaguicidas con determinadas alteraciones funcionales u orgánicas. Este tipo de correlaciones no es siempre fácil de obtener; de hecho, ni siquiera es válido para las colinesterasas. Sin embargo, son muy numerosos los estudios destinados a monitorizar el estado de salud de la población de una u otra forma expuesta a plaguicidas, aunque estos estudios generalmente adolecen de falta de información acerca de la intensidad de exposición, o realizan el seguimiento sobre un grupo reducido de trabajadores o la exposición de los mismos no es de especial magnitud. En este sentido, en el presente estudio se ha intentado: controlar al máximo posible las variables de exposición, monitorizar un número relativamente importante de personas expuestas a plaguicidas y, además, que la exposición fuera la mayor posible, como ocurre en el caso de los fumigadores de invernadero, que realizan un uso intensivo de plaguicidas y que, por las características ya comentadas, presentan un mayor riesgo de exposición.

Aunque en España, la zona con mayor densidad de invernaderos es la de la costa de Almería, esta forma de cultivo se está extendiendo por todo el litoral andaluz, siendo el pueblo de Carchuna la principal concentración de invernaderos en la provincia de Granada.

De hecho, se trata de un pueblo prefabricado, cuyo origen fue el de la implantación de agricultura intensiva en forma de cultivo bajo plástico. Hasta ahora se han realizado pocos estudios de exposición crónica en esta zona y algunos más en la de Almería, por eso se consideró que dada la proximidad geográfica de ambas zonas podría ser interesante desarrollar esta investigación, aprovechando la buena infraestructura sanitaria de la zona, especialmente en cuanto a la motivación de los recursos humanos implicados, muy sensibles a esta problemática.

En este trabajo se ha estudiado un amplio grupo de biomarcadores considerados como indicadores de exposición, efecto y susceptibilidad, los cuales pueden proporcionar indicaciones válidas de efectos bioquímicos precoces que podrían preceder a la sintomatología clínica. En este sentido, se ha intentado evaluar determinados marcadores periféricos, determinados en sangre, que puedan reflejar lo que está sucediendo en otros tejidos, principalmente en las dianas celulares (neuroquímicas o parenquimatosas). El mejor ejemplo de este tipo de estrategia se encuentra en el campo de los insecticidas anticolinesterásicos. Las colinesterasas han mostrado bastante utilidad en la intoxicación aguda por compuestos organofosforados o carbámicos, pero no están exentas de una importante variabilidad interindividual y sometidas a la influencia de algunas enfermedades (especialmente la colinesterasa plasmática). Por ello, se ha pretendido buscar otros marcadores enzimáticos que, junto a las colinesterasas, ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico precoz de la intoxicación crónica o, al menos, revelen también exposición y/o efecto.

En caso de obtener resultados significativos, estos biomarcadores podrían ser de utilidad en la evaluación de riesgos tóxicos, e incluso podría considerarse su incorporación a los controles sanitarios de trabajadores dentro de los programas de vigilancia de la salud.

En definitiva, en este trabajo se ha abordado la repercusión bioquímica de la exposición continuada de una serie de agentes químicos que constituyen una herramienta de trabajo de primer orden para los agricultores profesionalmente expuestos en cultivos intensivos y que el contacto día a día con los mismos les hace perder, en cierta medida, el respeto hacia estos productos. En base a los resultados de esta repercusión bioquímica se intentarían establecer unos criterios de identificación, evaluación y prevención de riesgos, no excesivamente complicados pero fiables y económicos, que los Servicios de prevención de riesgos laborales, en colaboración con personal especializado, podrían poner en marcha a la hora de establecer un programa de vigilancia de la salud cuya finalidad sería la prevención de riesgos tóxicos a largo plazo.

## **2. OBJETIVOS**

General:

- Evaluar la asociación entre exposición crónica de tipo ocupacional a plaguicidas y cambios en diversos marcadores bioquímicos de exposición y/o efecto (actividades enzimáticas eritrocitarias y plasmáticas), determinadas alteraciones clínicas y marcadores de susceptibilidad (polimorfismos genéticos de enzimas implicados en el metabolismo de plaguicidas).

Específicos:

- Determinar diversas actividades enzimáticas: eritrocitarias (AChE, G6PDH, CAT, GPx, GR, SOD) y plasmáticas (BChE, POasa basal y salina y DZOasa) y ver si existen

diferencias entre los individuos expuestos a plaguicidas con respecto al grupo control.

- Determinar el fenotipo plasmático de PON1 (concretamente el alelo B de “alta actividad”) y el fenotipado de colinesterasa sérica (BChE) y ver si existen diferencias entre los expuestos a plaguicidas y los controles.
- Detectar alteraciones clínicas compatibles con exposición crónica a plaguicidas en los individuos expuestos mediante la realización de una anamnesis y exploración física. Asimismo, identificar los que tienen antecedentes de intoxicación previa.
- Evaluar la posible influencia de los fenotipos séricos (PON1 y BChE) sobre las actividades enzimáticas estudiadas y sobre la presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas e historia previa de intoxicación.
- Relacionar las actividades enzimáticas (AChE, G6PDH, CAT, GPx, GR, SOD, BChE, POasa basal y salina y DZOasa) con la presencia de síntomas clínicos relacionados con exposición crónica a plaguicidas, historia previa de intoxicación y diversas variables ocupacionales (utilización de protección durante la preparación de la mezclas y durante la fumigación).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. DISEÑO

El diseño corresponde al de un estudio transversal (observacional de carácter analítico).

### 1.1. Sujetos de estudio

Este estudio se llevó a cabo en trabajadores dedicados a la agricultura intensiva en el SE de España, durante el periodo comprendido entre abril y noviembre de 2002. Por las características de esta zona así como del tipo de cultivo, se pueden descartar otros procesos de fumigación desde avionetas o a cielo abierto en las zonas próximas.

- *Criterios de inclusión.* Trabajadores de invernadero del litoral de Granada (Carchuna) y del poniente almeriense, que realizan regularmente operaciones de aplicación o fumigación con plaguicidas en el interior del recinto bajo plástico.
- *Criterios de exclusión.* Trabajadores con enfermedades crónicas previamente conocidas, como diabetes o cáncer o portadores de trastornos neurológicos.

Un total de 135 trabajadores con exposición crónica a pesticidas cumplieron los requisitos anteriormente expuestos y aceptaron participar en el estudio.

### 1.2. Clasificación de los sujetos

- *Individuos expuestos a plaguicidas (aplicadores o fumigadores).* Constituido por 135 trabajadores de invernadero (130 varones y 5 mujeres; de edad comprendida entre 14 y

59 años.) que realizaban aplicaciones con diferentes plaguicidas de forma regular durante el ciclo anual de fumigación. Este grupo presentaba una antigüedad mínima de cinco años como fumigador. De ellos 62 (todos varones) procedían de la costa de Granada y 73 de la de Almería (68 varones y 5 mujeres). Entre los diferentes grupos de plaguicidas que manejaban destacan los siguientes que presentaron una frecuencia de uso superior al 5% (es decir, eran manejados al menos por 5 de cada 100 trabajadores): N-metilcarbamatos, piretroides, ditiocarbamatos, neonicotinoides, organofosfatos y organoclorados (dentro de estos el único citado fue el endosulfán).

- *Grupo control.* Constituido por 54 sujetos sanos (27 hombres y 27 mujeres; de edad comprendida entre 23 y 55 años) pertenecientes a la población general no agricultora de las mismas zonas de estudio, ajustados por edad y características socioeconómicas, culturales y educacionales y que no estaban expuestos directa o indirectamente a ningún tipo de agente químico en su trabajo, ni tampoco plaguicidas. Con todo ello se pretendía que la exposición basal a residuos de plaguicidas (de origen ambiental o nutricional) fuese lo más similar posible con la del grupo de expuestos, lo cual determinó un desajuste en cuanto al número de individuos controles y en cuanto al sexo.

### **1.3. Protocolo de reclutamiento.**

Los sujetos de estudio fueron reclutados por los médicos de Atención Primaria del Ambulatorio de Carchuna y por personal sanitario de la Delegación Provincial de Salud de Almería. Inicialmente se contactó telefónicamente con ellos (Carchuna) o a través de cooperativas agrarias (Almería) con objeto de explicarles los objetivos del estudio.

En función de un trabajo previo sobre la misma zona de estudio, y teniendo en cuenta que se realiza un uso discontinuo o estacional de los plaguicidas típico de una zona de

---

agricultura intensiva (con varias cosechas al año), se escogieron dos periodos con diferente intensidad de exposición a plaguicidas:

- El de menor exposición (M-2), correspondiente a abril de 2002. Dadas las características de la agricultura intensiva en la zona de estudio no es posible obtener un valor basal, ya que siempre están en contacto con plaguicidas a lo largo de todo el año. Por tanto, en su lugar se ha escogido un periodo donde la exposición a plaguicidas sea lo más baja posible.
- El de mayor exposición (M-1), correspondiente a noviembre de 2002.

Una vez seleccionados los individuos que cumplían las condiciones establecidas se les citó, por el personal sanitario de cada zona, para celebrar una entrevista en abril de 2002. En ella se realizó:

- Una anamnesis clínica y laboral y una exploración física, dirigidas específicamente a detectar alteraciones derivadas de la exposición crónica a plaguicidas. Para ello se ha empleado un cuestionario estructurado (ver anexo en pag. 303), previamente validado, que incluye variables de tipo ocupacional, entre ellas: años de exposición (es decir, antigüedad como aplicador), exposición a OPs, utilización de medidas de protección durante la preparación de la mezcla de plaguicidas y durante la fumigación.
- Una extracción de sangre (10 ml en tubos con citrato) donde efectuar la determinación de actividades enzimáticas, tanto plasmáticas como eritrocitarias.

Posteriormente fueron citados de nuevo en noviembre de ese mismo año donde sólo se realizó una segunda extracción de sangre. Por problemas logísticos, no todos los individuos de Almería en el momento de mínima exposición estuvieron disponibles en el de máxima exposición, por lo que se incorporaron individuos nuevos en noviembre de los cuales no se tenían muestras de abril.

Entre los individuos expuestos, el grado de exposición se cuantificó utilizando como criterio la inhibición de AChE superior a un 15% en el periodo de mayor exposición con respecto al de menor exposición.

## **2. MÉTODOS DE LABORATORIO**

### **2.1. Preparación de las muestras.**

Para la correcta conservación de las muestras, éstas se trasladaron en nevera portátil sumergidas en baño de hielo. En el momento que las muestras llegaron al laboratorio de Toxicología del Hospital Universitario San Cecilio se procedió a la obtención de plasma y lisado de eritrocitos. Entre la extracción y el procesado no transcurrió un tiempo superior a 6 horas, incluido el transporte desde el lugar de la toma de muestras hasta el laboratorio.

Una alícuota de 0.5 ml de la muestra del tubo con anticoagulante (citrato) se remitió al Servicio de Hematología del Hospital Universitario San Cecilio para la determinación del hematocrito. El resto se centrifugó a 3000 rpm/10 minutos, marcando en el tubo el volumen original de sangre total. Una vez separado el plasma y la “capa amarillenta” de los eritrocitos, se agregó NaCl 0.9 % hasta la señal y se mezcló por inversión suave. Se volvió a centrifugar a 3000 rpm/10 minutos, retirando el NaCl. El proceso de lavado con NaCl se repitió 2 veces más. Después del último lavado se reconstituyó hasta el volumen inicial con agua fría Mili-Q, dejando 15 minutos en baño de hielo, obteniendo de esta forma el lisado de eritrocitos. El plasma se dividió en alícuotas de 1 ml, y el lisado de eritrocitos en alícuotas de 0.5 ml. Las alícuotas de las muestras se conservaron a temperatura inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis. Estudios previos demostraron que las actividades se mantuvieron estables al

menos 3 meses en esas condiciones.

## 2.2. Ensayos enzimáticos.

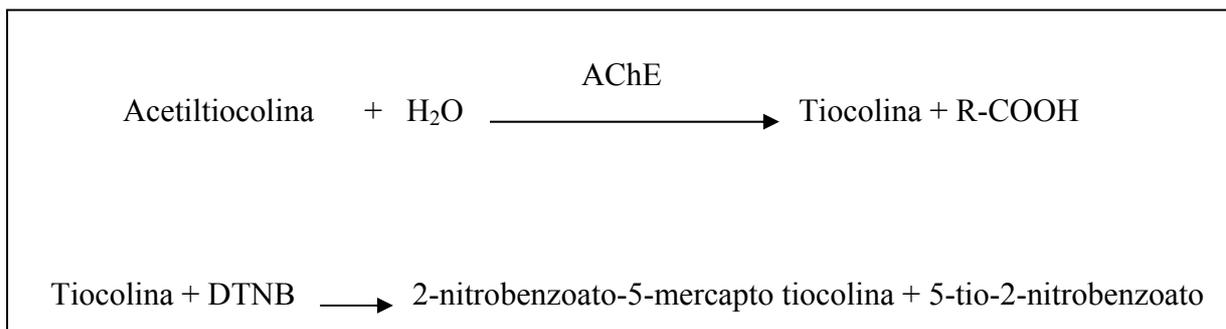
Todas las lecturas de los ensayos enzimáticos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible de doble haz Perkin-Elmer Lambda 2, provisto de portacubetas múltiple termostatzado.

## 2.3. Determinación de actividades enzimáticas eritrocitarias.

### A) Acetilcolinesterasa (AChE).[EC 3.1.1.7]

#### Fundamento

La actividad AChE se determinó según el método de *Ellman et al* (1961), monitorizando la tasa de formación de tiocolina a partir del sustrato acetiltiocolina, de acuerdo con la siguiente secuencia de reacciones:



La aparición del anión amarillo 5-tio-2-nitrobenzoato se monitoriza a 410 nm.

*Reactivos:*

\* Buffer fosfato 100 mM pH 7.0 y 8.0

- Na<sub>2</sub> H PO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (Merck, p.a.)

- Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, p.a.)

\* Solución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma, p.a.).

Solución de trabajo: 10 mM en buffer fosfato 100 mM pH 7.0

Estabilidad de las soluciones: 1 mes en botella ámbar.

\* Solución de yoduro de acetiltiocolina (Sigma, p.a.).

Solución de trabajo: 75 mM en agua destilada

Estabilidad de las soluciones: 1 semana.

*Metódica:*

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer fosfato 100 mM pH 8.0	2.85 ml	91 mM
DTNB 10 mM	0.10 ml	0.32 mM
Acetiltiocolina 75 mM	0.02 ml	0.48 mM
Incubar a 25°C/5 min		
Muestra*	0.17 ml	

\*Muestra: lisado de eritrocitos (diluido 1/100 en agua destilada).

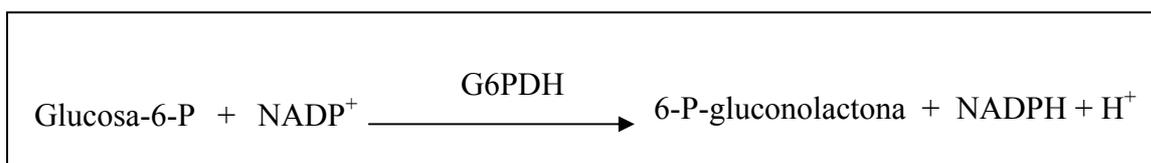
La reacción se inició agregando la muestra a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire, monitorizando el aumento de extinción a 410 nm debido a la formación de 5-nitro-2-tiobenzoato a partir de 15 segundos del inicio, con intervalos de 30 segundos y durante 2 minutos. La temperatura de la cubeta se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1$  durante el curso de la reacción.

$$\text{Actividad (U/l eritrocitos)} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times 6.892 \times 10^6}{\text{Hematocrito (\%)}}$$

### **B) Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). [EC 1.1.1. 49]**

#### *Fundamento:*

La actividad G6PDH se determinó según el método de *Deutsch* (1983), de acuerdo con la siguiente reacción, adicionando maleimida para inhibir la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH) endógena.



La actividad enzimática se determinó monitorizando el aumento de la absorbancia a 339 nm, por la formación de NADPH.

#### *Reactivos :*

\* Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5:

- Trizma base 99.9% (Sigma, p.a.)
- HCl 35% (Panreac, p.a.)

\* NADP 3.8 mM en agua. Estable 2 semanas a 0-4° C:

- NADP, sal sódica, riqueza 98% (Sigma, p.a.)

\* MgCl<sub>2</sub> 0.63 M en agua:

- MgCl<sub>2</sub> (Merck, p.a.)

\* Glucosa-6-fosfato 33 mM en agua. Estable 2 semanas a 0-4° C:

- Glucosa-6-fosfato (G-6-P), sal monosódica, riqueza 98.5% (Sigma, p.a.)

\* Maleimida 0.5 mg/ml de la mezcla de reacción:

- Maleimida (Sigma, p.a.)

*Metódica:*

Se preparó una mezcla de reacción con las siguientes soluciones:

Mezcla de reacción (para una determinación)	
<i>Reactivos</i>	<i>Volumen (cantidad)</i>
H <sub>2</sub> O	0.58 ml
NADP 3.8 mM	0.1 ml
Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 7.5	0.1 ml
MgCl <sub>2</sub> 0.63 M	0.1 ml
G-6-P 33 mM	0.1 ml
Maleimida	0.5 mg

Es necesario mantener en frío la mezcla de reacción durante todo el tiempo que dure el ensayo.

*Ensayo:*

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

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Mezcla de la reacción:	1 ml	
- H <sub>2</sub> O		
- NADP 3.8 mM		0.37 mM
- BufferTris-HCl 0.5 M pH 7.5		0.49 M
- MgCl <sub>2</sub> 0.63 M		0.0617 M
- G-6-P 33 mM		3.2 mM
- Maleimida		0.5 mg/ml
Incubar a 37° C/3 min		
Muestra*	20 µl	
Agitar y transferir a la cubeta de cuarzo de 1 cm		

\*Muestra: lisado de eritrocitos diluido 1/6 en Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5

La reacción se inicia por la adición de la muestra. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad monitorizando el aumento a 339 nm por la aparición de NADPH a intervalos de 30 segundos durante un tiempo total de 3 minutos.

La estabilidad de la enzima una vez descongelada la muestra, es muy baja, por lo que debe realizarse rápidamente el ensayo (máximo 2 horas).

$$\text{Actividad (U /l de sangre)} = (\Delta\text{DO} / \text{min}) \times 48571.42$$

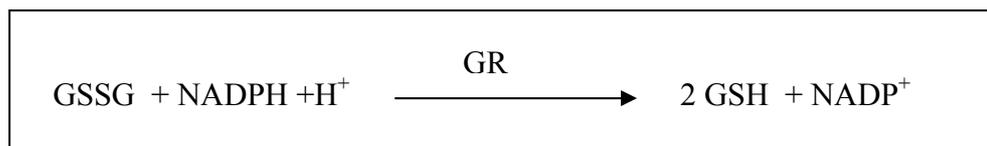
---

**C) Glutación reductasa (GR). [EC 1.6.4.2]**

---

*Fundamento:*

La determinación se hizo según el método de *Goldberg y Spooner* (1984), de acuerdo con la siguiente reacción:



La actividad catalítica se mide monitorizando el descenso de absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup>.

*Reactivos :*

- \* Buffer fosfato 0.12 M, pH 7.2. Estable durante 6 meses a -20° C.
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Probus, p.a.)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, p.a.)
- \* Glutación oxidado (GSSG) 65.3 mM en agua. Preparación extemporánea.
  - GSSG riqueza 98 % (Sigma, p.a.)
- \* FAD 155 μM en agua. Estable 2 semanas a 0-4°C.
  - FAD, sal disódica (Sigma, p.a.)
- \* EDTA 15 mM en agua.
  - EDTA, sal disódica, dihidratada (Merck p.a.)
- \* NADPH 9.6 mM en NaHCO<sub>3</sub> 1 % (p/v). Preparación extemporánea.
  - NADPH, sal tetrasódica, riqueza 98% (Sigma, p.a.)
  - NaHCO<sub>3</sub> (Merck, p.a.)

*Metódica:*

En cada cubeta se dispusieron los siguientes reactivos en el orden, cantidad y concentración que se indica:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Buffer fosfato 0.12 M pH 7.2	2.6 ml	0.1 M
EDTA 15 mM	100 µl	0.49 mM
FAD 155 µM	100 µl	5.1 µM
GSSG 65.3 mM	100 µl	2.14 mM
Muestra *	100 µl	
Agitar e incubar 37° C/5 min		
NADPH 9.6 mM	50 µl	
Agitar y transferir a una cubeta de cuarzo de 3 ml; leer a 340 nm.		

\*Muestra: lisado de eritrocitos diluido 1 / 8 en Buffer fosfato 0.12 M, pH 7.2

La reacción se inicia por la adición del NADPH. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad, monitorizando la absorbancia a 340 nm por el consumo de NADPH a intervalos de 20 segundos durante 3 minutos. Durante la realización del ensayo los reactivos han de conservarse en baño de hielo, salvo el GSSG que puede precipitar.

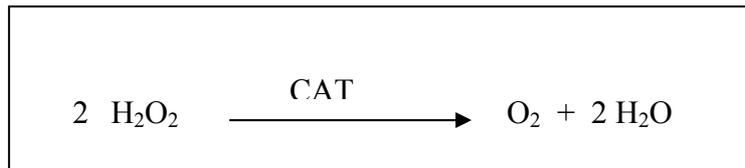
$$\text{Actividad enzimática (U / l de sangre)} = \Delta\text{DO} / \text{min} \times 38730$$

**D) Catalasa (CAT). [EC 1.11.1.6.]**

---

*Fundamento:*

La determinación se hizo según el método descrito por *Aebi* (1984), basado en la siguiente reacción:



La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se mide por el descenso de absorbancia a 240 nm.

*Reactivos:*

\* Buffer fosfato 50 mM, pH 7.0. Estable a 2°C mientras no exista contaminación bacteriana:

-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, p.a.)

-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Probus, p.a.)

\* Solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10.34 mM en el buffer anterior. Preparación extemporánea.

Mantener en frío:

-  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, d=1.1 (Merck, p.a.).

*Metódica:*

Los reactivos se añadieron directamente a la cubeta de cuarzo, agitando suavemente por inversión:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Solución H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10.34 mM	2.9 ml	10 mM
Muestra*	100 µl	

\*Muestra: lisado de eritrocitos 1/50 en buffer fosfato, 50mM, pH 7.0.

La reacción se inicia por la adición de la muestra. Las lecturas se realizaron frente al aire en cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad, monitorizando el descenso de absorbancia a 240 nm por la desaparición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a intervalos de 15 segundos durante un tiempo total de 1 minuto. La temperatura de la cubeta se mantuvo a 20°C ± 0.1.

$$\text{Actividad enzimática (k/l)} = 229.5 \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

*k*: constante de primer orden de la reacción enzimática.

*A*<sub>1</sub>: valor de la absorbancia a los 15 segundos.

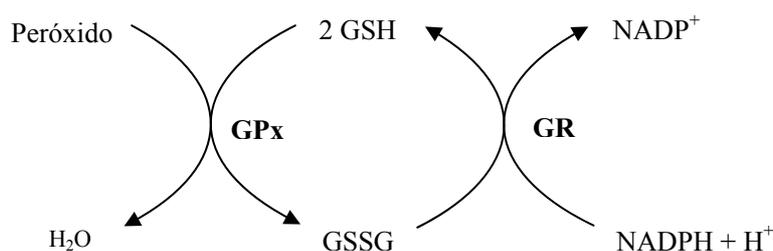
*A*<sub>2</sub>: valor de la absorbancia a los 30 segundos.

Para corregir la hidrólisis no enzimática se introdujo un blanco sin muestra al principio de cada serie de medidas.

### E) Glutación Peroxidasa (GPx). [EC 1.11.1.9]

#### Fundamento:

La determinación se hizo según el método descrito por *Plagia y Valentine* (1967), que se basa en las siguientes reacciones:



La reacción se inicia añadiendo un peróxido en exceso. La oxidación de dos moléculas de glutatión (GSH), va unida a la oxidación de NADPH, catalizada a su vez por la glutatión reductasa (GR). El consumo de NADPH se registra midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm. Como peróxido iniciador de la reacción se utiliza ter-butil hidroperóxido.

#### Reactivos :

- \* Buffer fosfato 100 mM , pH 7.4, EDTA 1 mM.
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Probus, p.a.)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, p.a.)
  - EDTA, sal disódica, dihidratada (Merck , p.a.)
- \* NADPH 2.5 mM en agua. Solución extemporánea.
  - NADPH, sal tetrasódica, riqueza 98% (Sigma, p.a.).

\* Glutación reducido (GSH) 2.5 mM en agua. Solución extemporánea.

- GSH 98 % (Sigma, p.a.)

\* Glutación reductasa 5 U/ml H<sub>2</sub>O. Solución extemporánea.

- Glutación reductasa (GR) de levadura de cerveza (Sigma, p.a.)

\* Ter-butil hidroperóxido 25 mM en agua. Solución extemporánea.

- Ter-butil hidroperóxido 70 % d = 0.94 g/ml (Sigma, p.a.)

*Metódica:*

Se preparó una mezcla de reacción con las siguientes soluciones:

---

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>
Buffer fosfato 100 mM pH 7.4	4 ml
GR 5U/ml	2 ml
NADPH 2.5 mM	1 ml
GSH 2.5 mM	1 ml

---

Durante la realización del ensayo la mezcla de reacción ha de conservarse en baño de hielo.

*Ensayo:*

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

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Mezcla de reacción:	1.2 ml	
- Buffer fosfato 100 mM pH 7.4		44.1 mM
- GR 5U/ml		1.1 U/ml
- NADPH 2.5 mM		0.3 mM
- GSH 2.5 mM		0.3 mM
Muestra*	100 $\mu$ l	
Incubar a 37°C/2min		
Ter-butil hidroperóxido	60 $\mu$ l	1.1 mM

\*Muestra: lisado de eritrocitos diluido 1/50 en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM.

La reacción se inició agregando el ter-butil hidroperóxido. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad monitorizando el descenso de absorbancia a 340 nm por el consumo de NADPH a intervalos de 30 segundos durante un tiempo total de 3 minutos.

Debido a la inestabilidad del ter-butil hidroperóxido y la oxidación espontánea del NADPH en ausencia de ter-butil hidroperóxido fue necesario introducir dos blancos en cada serie de ensayos:

- Blanco "A" = con muestra y sin ter-butil hidroperóxido.
- Blanco "B" = sin muestra y con ter-butil hidroperóxido. De éste se hicieron 3 determinaciones intercaladas en cada serie de ensayos y se tomó el valor medio de  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  para los cálculos.

*Cálculos:*

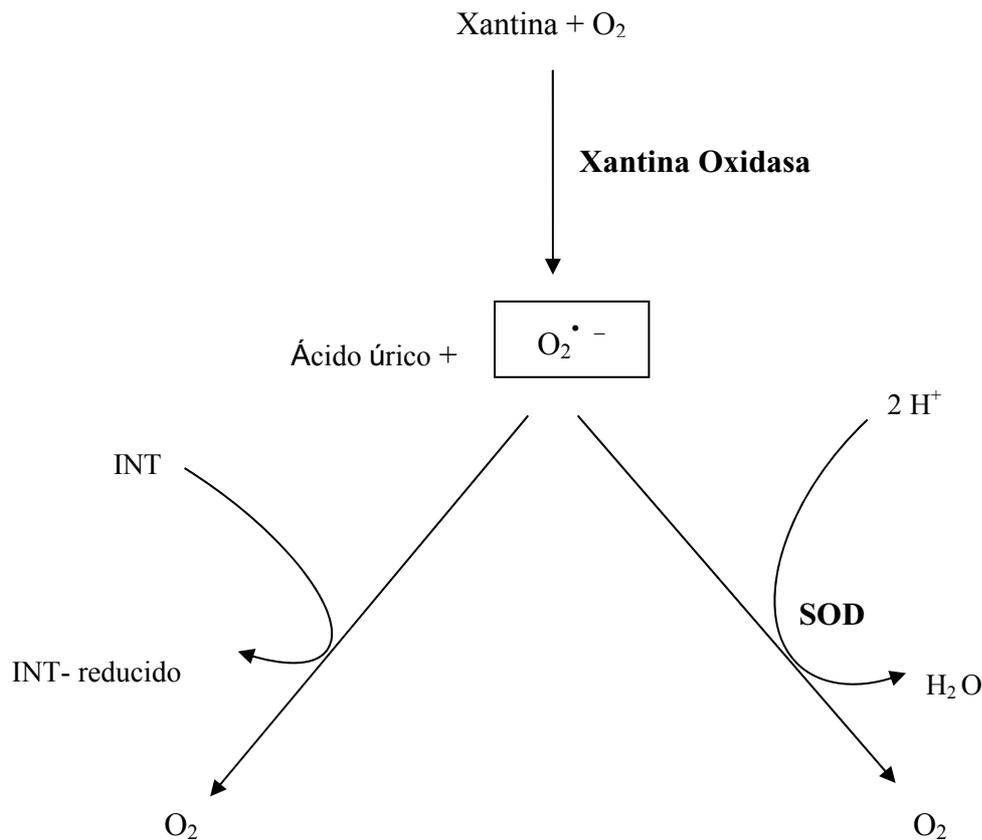
$$\Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{"CORREGIDA"}} = \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{"MUESTRA"}} - (\Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{BLANCO "A"}} + \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{BLANCO "B"}})$$

$$\text{Actividad (U/litro de sangre)} = \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{"CORREGIDA"}} \times 107936.5$$

### F) Superóxido dismutasa (SOD). [EC 1.15.1.1]

#### Fundamento:

La determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se realizó de acuerdo con el método descrito por *Andersen* (1997):



La reacción consiste en un generador de superóxidos y un detector de superóxidos. El generador (xantina) sirve para producir los radicales y para controlar la velocidad de la reacción. En ausencia de SOD, los radicales reaccionan con el detector (INT). En presencia de SOD, ésta compite con el detector por el superóxido. Este método utiliza xantina y xantina oxidasa (E.C.1.2.3.2) como fuente de superóxidos e INT como indicador de la eliminación de radicales. La reducción del INT es medida a 500 nm.

*Reactivos:*

\* Buffer fosfato 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Probus, p.a.)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, p.a.)
- EDTA, sal disódica, dihidratada (Merck, p.a.)

\* Xantina 5 mM en NaOH 0.1 mM. Estable una semana entre 0-4° C.

- Xantina (Sigma, p.a.)
- NaOH (Merck, p.a.)

\* Cloruro de yodo-nitrotetrazolio (INT): cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio, 10mM en agua. Preparación extemporánea. Para disolverlo mantenerlo unos minutos en ultrasonidos.

- INT (Sigma, p.a.)

\* Xantina oxidasa (XO) 1/200 en buffer fosfato. Mantener en baño de hielo.

- Xantina oxidasa: 38 U/ml (Sigma, p.a.)

\* Superóxido dismutasa (SOD) 15 U/ml en buffer fosfato 50 mM. Mantener en baño de hielo.

- Superóxido dismutasa de hígado bovino (Sigma, p.a.) 15000 U/ml.

*Metódica :*

Preparar la siguiente mezcla de reacción:

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
Buffer fosfato 50 mM, pH 7.8	2.8 ml
Xantina 5 mM	30µl
INT 10 mM	30µl

El ensayo propiamente dicho se realizó de la siguiente forma:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concent. cubeta</i>
Mezcla de Reacción:	2.86 ml	
- Buffer fosfato 50 mM, pH 7.8		46.5 mM
- Xantina 5mM		0.05 mM
- INT 10 mM		0.01 mM
Muestra *	100 µl	
Incubar 30° C/5 min		
XO (1/200)	50 µl	3.1 mU/ml

Las lecturas se realizaron frente al aire, monitorizando la tasa de formación de INT reducido a 500 nm

\*a) Lisado de eritrocitos 1/100 en buffer fosfato 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM.

b) Punto de la curva patrón.

---

La reacción se inicia por la adición de la XO. Las lecturas se realizaron frente al aire en cubetas de 3 ml de capacidad, monitorizando el descenso de absorbancia a 500 nm a intervalos de 15 segundos durante un tiempo total de 2 minutos.

*Cálculo de la actividad:*

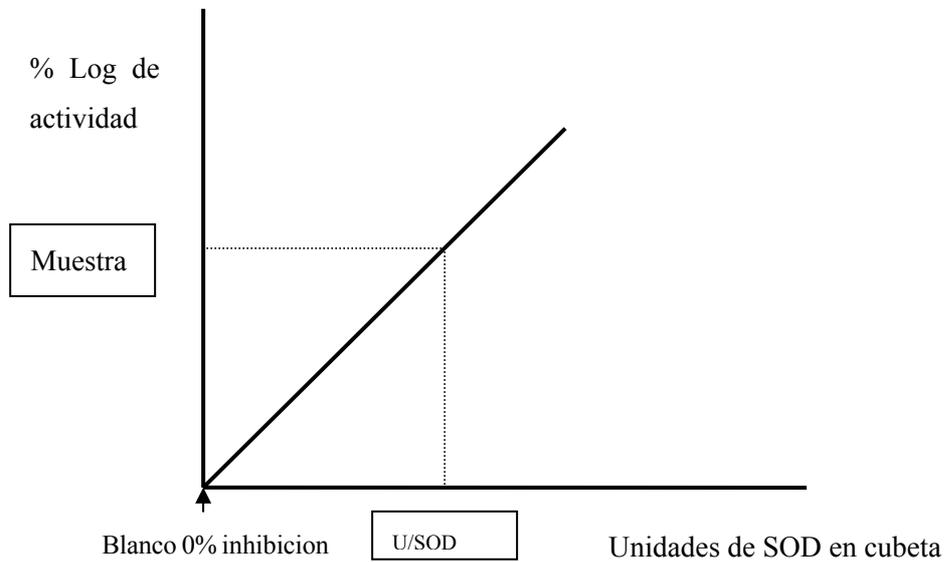
Se define una unidad de SOD como la cantidad de SOD necesaria para inhibir la velocidad de reducción del INT un 50%.

a) Curva patrón:

A partir de una solución madre de 15 U/ml de SOD purificada, se hicieron diluciones seriadas con buffer fosfato 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM obteniéndose las siguientes concentraciones: 0.937 U/ml, 1.87 U/ml, 3.75 U/ml, 7.5 U/ml y 15 U/ml. De cada una de estas soluciones se utilizaron 100  $\mu$ l para el ensayo, por lo que las unidades totales de SOD en cubeta fueron de 0.0937, 0.187, 0.375, 0.75 y 1.5.

Un blanco sin SOD se tomó como 100% de actividad y sirvió de base para calcular la actividad remanente de los patrones de la curva así como las muestras problema. Una actividad remanente del 50% corresponde a una inhibición del 50 % en la reducción del INT y por tanto a una unidad SOD.

La curva patrón se construyó representando el log de la actividad remanente frente a las unidades de SOD en cubeta.



b) La actividad SOD de las muestras problema se calculó interpolando en la curva patrón el % de la actividad remanente obteniéndose así las unidades SOD en cubeta.

A partir de ellas y teniendo en cuenta el volumen de muestra (lisado de eritrocitos) utilizado en el ensayo el resultado final se expresó en U/litro de sangre.

---

## 2.4. Determinación de actividades enzimáticas plasmáticas.

**A) Paraoxonasa, (PON1).[EC 3.1.8.1]. Este enzima se determinó utilizando tres sustratos diferentes: paraoxón, fenilacetato y diazoxón.**

---

### *-Paraoxón-hidrolasa (POasa)*

#### *Purificación del paraoxón comercial.*

Experiencias previas demostraron que al utilizar paraoxón comercial se observaba una inhibición de la actividad paraoxonasa al aumentar la concentración de sustrato que se correspondía con una típica inhibición por sustrato. La presencia de inhibidores en los preparados comerciales de paraoxón es un hecho conocido, siendo precisa su purificación. Este procedimiento consiguió eliminar por completo tal efecto, permitiendo utilizar las concentraciones de paraoxón deseadas con la única limitación de su solubilidad. El paraoxón se purificó según el método descrito por Johnson (1977). Todos los análisis se efectuaron con paraoxón purificado.

#### *Reactivos:*

- \* Paraoxón (dietil *p*-nitrofenil fosfato; Sigma, p.a., riqueza ~ 90%).
- \* Tricloroetileno (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>, d =1,46; Merck, p.a).
- \* Bicarbonato sódico al 1% p/v (NaHCO<sub>3</sub>; Merck, p.a ).
- \* Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Merck p.a).



---

La determinación de la actividad paraoxonasa se realizó por el método continuo propuesto por *Reiner y Radic* (1985). Esta actividad se determinó también en presencia de NaCl 1M (Paraoxonasa estimulada por sal , ssPOasa).

*Reactivos:*

- \* Tampón Tris- H Cl 100 mM, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 1 mM.
  - Tris (hidroximetil) amino metano (Sigma, p.a.)
  - HCl concentrado, d = 1.16 (Merck, p.a.)
  - Ca Cl<sub>2</sub> (Merck, p a.)
- \* Tampón Glicina-NaOH 100 mM, pH 10, Ca Cl<sub>2</sub>1 mM
  - Glicina (Sigma, p.a.)
  - NaOH (Panreac, p.a.)
- \* Tampón Glicina-NaOH 100 mM, pH 10, CaCl<sub>2</sub>1 mM , NaCl 1 M.
  - Glicina (Sigma, p.a.)
  - NaOH (Panreac, p.a)
  - NaCl (Panreac, p.a.)
- \* Soluciones de paraoxón purificado 1 mM en los tampones anteriores.
  - Paraoxón (dietil *p*-nitrofenil fosfato, Sigma, p.a), riqueza 90%.

*Metódica:*

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

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Solución de paraoxón 1 mM	0.95 ml	
- Tris- H Cl 100 mM		95 mM
- CaCl <sub>2</sub> 1 mM		0.95 mM
- Paraoxón 1 mM		0.95 mM
Incubar a 37°C/3 min		
Muestra	100µl	

La reacción se inició agregando la muestra a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas desechables monitorizando el aumento de la extinción a 405 nm (por la formación de *p*-nitrofenol) a intervalos de 30 segundos durante 2 minutos.

Para hacer los cálculos de la actividad catalítica se tuvo en cuenta la hidrólisis no enzimática, aunque fue despreciable, salvo en la PON medida a pH 10 (con o sin NaCl), después de 24 h de la preparación de la solución de trabajo de paraoxón, por lo que siempre se realizó esta determinación en las primeras horas tras su preparación, desechando el sobrante.

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

**- Arilesterasa (ArE)***Fundamento:*

La determinación de la actividad arilesterasa se realizó siguiendo el método descrito por *Junge y Klees* (1984). El fenilacetato es hidrolizado a fenol y ácido acético y se monitoriza espectrofotométricamente la tasa de formación de fenol a 270 nm.

*Reactivos:*

\* Tampón 1: Tris-Acetato 100 mM, pH 7.4, Cl<sub>2</sub> Ca 10 mM.

- Tris (hidroximetil) amino metano (Sigma, p.a.).

- CaCl<sub>2</sub> (Merck, p.a.).

- Ácido acético glacial (Merck, p.a.).

\* Solución de Fenilacetato 8.08 mM, (estable 5 días a 4°C).

- Fenilacetato (Sigma, p.a.).

\* Tampón 2: Tris-Acetato 50 mM, pH 7.4, Ca Cl<sub>2</sub> 5 mM.

- Tris (hidroximetil amino metano) (Sigma, p.a.).

- CaCl<sub>2</sub> (Merck, p.a.).

- Ácido acético glacial (Merck, p.a.).

*Metódica:*

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

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen en cubeta</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Tampón 1:		
- Tris-Acetato 100 mM		47.6mM
- CaCl <sub>2</sub> 10 mM		4.76 mM
Fenilacetato 8.08 mM		3.85 mM
Incubar a 25°C/3 minutos		
100 µl		

\*Muestra: plasma diluido 1/50 en el tampón 2.

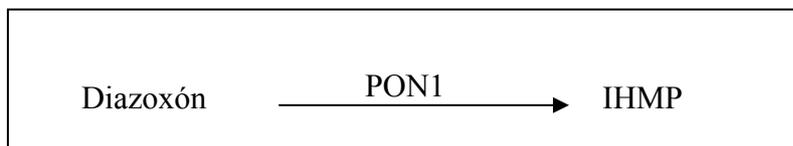
La reacción se inició agregando la muestra a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire en microcubetas de cuarzo, monitorizando el aumento de extinción a 270 nm por la aparición de fenol a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 2 minutos.

$$\text{Actividad catalítica (kU/l)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 35472.5$$

Para corregir la hidrólisis no enzimática del sustrato, se introdujo un blanco al principio de cada serie de medidas.

**- Diazoxonasa (DZOasa)***Fundamento:*

La determinación se hizo según el método descrito por *Richter y Furlong* (1999):



La actividad enzimática se determinó monitorizando el aumento de la absorbancia a 270 nm, por la formación del 2-isopropil-4-metil-6-hidroxi pirimidina (IHMP).

*Reactivos:*

\* Diazoxón 500  $\mu$ M en buffer Tris HCl 1M, NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 2 mM; pH 8.0

- Diazoxón (Chem Service, p.a. MET-90)
- NaCl (Merck, p.a.)
- CaCl<sub>2</sub> (Merck, p.a.)

Mantener en agitación (en campana) durante 30 minutos para facilitar la disolución del diazoxón.

*Metódica:*

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración en cubeta</i>
Buffer con Diazoxón :	1 ml	
- Tris- HCl 0.1 M		0.099 M
- NaCl 2 M		1.99 M
- CaCl <sub>2</sub> 2 mM		1.99 MM
<i>Muestra</i>	5 $\mu$ l	
<i>Leer a 270 nm/2.5 min</i>		

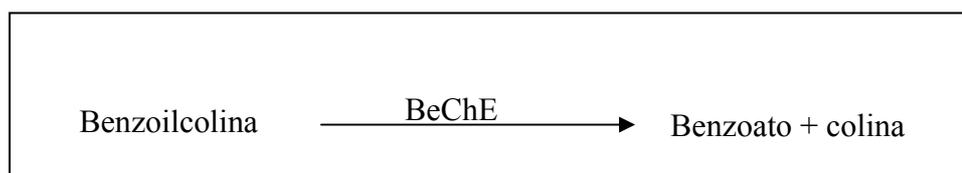
La reacción se inicia por la adición de la muestra. Las lecturas, se realizan frente al aire en microcubetas de cuarzo de 1 ml de capacidad, monitorizando el aumento de absorbancia por la aparición de IMHP a intervalos de 30 segundos durante un tiempo total de 2 minutos y medio.

$$\text{Actividad enzimática (U/L)} = \Delta\text{DO/ min} \times 6.6$$

### **B) Benzoilcolinesterasa plasmática (BeChE).[EC 3.1.1.8]**

*Fundamento:*

La actividad BeChE se determinó según el método de *Whittaker* (1984), monitorizando espectrofotométricamente la tasa de desaparición del sustrato benzoilcolina a 240 nm, de acuerdo con la siguiente reacción:



La utilización de diversos inhibidores (dibucaína, fluoruro sódico, cloruro sódico) permite poder adscribir un determinado fenotipo a un individuo en concreto.

*Reactivos:*

- \* Buffer fosfato Sorensen 67 mM, pH 7.4
  - Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> anhidro (Merck, p.a.)
  - K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro (Merck, p.a.)
- \* Cloruro de benzoilcolina 0.2 mM en buffer Sorensen
  - Cloruro de benzoilcolina (Sigma, p.a.)

Estabilidad de las soluciones (a 4°C): 1 día para la solución de benzoilcolina y 1 semana para las soluciones de los diferentes inhibidores.

Metódica para el ensayo de la benzoilcolinesteras:

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración. final</i>
Buffer fosfato 67 mM pH 7.4	1.0 ml	67 mM
Benzoilcolina 0.2 mM	1.0 ml	0.05 mM
Incubar a 37°C/5 min		
Muestra*	2.0 ml	

\*Muestra: plasma diluida 1/100 en buffer Sorensen

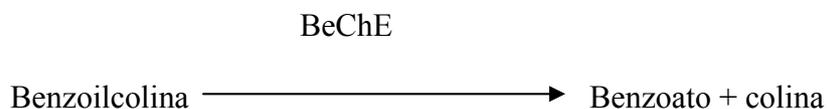
La reacción se inició agregando el plasma a la cubeta. Las lecturas se realizaron frente al aire, monitorizando la tasa de hidrólisis de benzoilcolina a 240 nm a partir de 30 segundos del inicio de la reacción, con intervalos de 30 segundos y durante 4 minutos. La temperatura de la cubeta se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1$  durante el curso de la reacción.

$$\text{Actividad catalítica (U/l)} = (\Delta\text{DO}/\text{min})_{\text{B}} \times 30300$$

## 2.5. Fenotipado de la colinesterasa plasmática (BeChE).[EC 3.1.1.8]

### *Fundamento:*

La actividad BeChE en presencia de distintos inhibidores (dibucaína, fluoruro sódico, cloruro sódico) permite poder adscribir un determinado fenotipo a un individuo en concreto (*Whittaker, 1984*).



### *Reactivos:*

\* Buffer fosfato Sorensen 67 mM, pH 7.4

-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro (Merck, p.a.)

-  $\text{K H}_2\text{PO}_4$  anhidro (Merck, p.a.)

\* Cloruro de benzoilcolina 0.2 mM en buffer Sorensen

- Cloruro de benzoilcolina (Sigma, p.a.)

\* Clorhidrato de dibucaína (0.04mM) en buffer Sorensen

- Clorhidrato de dibucaína (Sigma, p.a.)

\* Fluoruro sódico (0.2 mM) en buffer Sorensen

- Fluoruro sódico (Merck, p.a.)

\* Cloruro sódico (2 M) en buffer Sorensen

- Cloruro sódico (Panreac, p.a.)

Estabilidad de las soluciones (a 4°C): 1 día para la solución de benzoilcolina y 1 semana para las soluciones de los diferentes inhibidores.

*Metódica:*

Reactivos	Volumen	Concentración final
Benzoilcolina 0.2 mM		
Inhibidor:	1.0 ml	
(1) Dibucaína 0.04 mM (D)		0.01 mM
(2) Fluoruro sódico 0.2 mM (F)		0.05 mM
(3) Cloruro sódico 2 M (C)		500 mM
(Mezclar en el tubo de ensayo antes de proceder a la incubación)		
Incubar a 37°C/5 min		
Muestra*	2.0 ml	

\* Muestra: plasma diluido 1/100 en buffer Sorensen

Dibucaína:  $(\Delta\text{DO}/\text{min})_D$

Fluoruro sódico:  $(\Delta\text{DO}/\text{min})_F$

Cloruro sódico:  $(\Delta\text{DO}/\text{min})_C$

Cálculo de los diferentes números de inhibición:

$$\# \text{ números de dibucaína (ND)} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B - (\Delta\text{DO}/\text{min})_D}{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B}$$

$$\# \text{ números de fluoruro (NF)} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B - (\Delta\text{DO}/\text{min})_F}{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B}$$

$$\# \text{ números de cloruro sódico (NC)} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B - (\Delta\text{DO}/\text{min})_C}{(\Delta\text{DO}/\text{min})_B}$$

Para la determinación del fenotipo de colinesterasa sérica se ha hecho uso de los datos presentados en la Tabla 1 en la que se tiene en cuenta tanto la actividad benzoilcolinesterasa obtenida como los diferentes números de inhibición (Whittaker, 1984; Turner *et al*, 1985).

Como se puede apreciar, dado el considerable solapamiento entre el fenotipo UU y el US (iguales números de inhibición pero diferente actividad catalítica), en este trabajo se ha adoptado el criterio de considerar que un determinado individuo presenta el fenotipo US cuando su actividad se encuentra por debajo de 650 U/l. En aquellos casos en que la actividad sea inferior a 450 U/l y presente similares números en los diferentes inhibidores, consideramos

que se trata de un fenotipo desconocido de baja actividad, cuya caracterización hubiera requerido la utilización de otra serie de inhibidores no empleados en este estudio (Reiner *et al*, 1995).

Referencias para la adscripción individual del fenotipo sérico de colinesterasa:

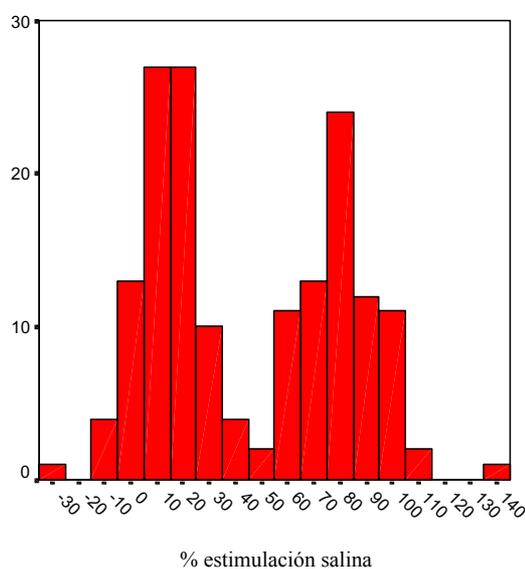
Fenotipo	U/I	ND	NF	NC
UU	650-1450	78-83	56-69	9-23
US	450-1015	78-83	56-69	9-23
UF	560-1250	70-83	46-54	5-32

## 2.6. Fenotipado de la paraoxonasa plasmática (Poasa). [E.C. 3.1.8.1]

Para establecer el fenotipo sérico de PON1 de los distintos individuos incluidos en el estudio se ha seguido el procedimiento de Eckerson et al (1983), realizando el siguiente cálculo:

$$[(\text{POasa salina} - \text{POasa basal})/\text{POasa salina}] * 100$$

Así se obtenía un porcentaje que tras representar gráficamente mediante el correspondiente histograma de frecuencias se apreciaba visualmente dos distribuciones normales, la primera correspondiente al fenotipo AA y la segunda a los fenotipos AB y BB (es decir, alelo B).



El porcentaje que permite separar ambas representaciones normales se utilizó como punto de corte para establecer la variable dicotómica “portador del alelo B de PON1”.

### 3. CÁLCULO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

El resultado de la determinación de la actividad catalítica (Z) de un enzima se expresa en unidades de actividad referida al peso o al volumen.

Una unidad internacional de actividad enzimática (U) se define como la actividad enzimática que convierte 1 μmol de sustrato en un minuto en las condiciones óptimas indicadas de ensayo.

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

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$(a) C (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d}$$

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

$$(b) Z (\text{U/ml}) = \frac{\Delta c \times V}{dt} = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times d \times dt} = \frac{\Delta A / \Delta t \times V}{\epsilon \times d}$$

donde,

$\Delta A / \Delta t$  = incremento de absorbancia (densidad óptica) por minuto.

V = Volumen final en la cubeta (ml)

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

d = Paso óptico de la cubeta (10 mm)

t = tiempo (min)

Para la determinación de la actividad enzimática en una muestra problema hay que tener en cuenta la relación entre el volumen del ensayo y el volumen de la muestra problema (v) expresado en ml. Puesto que las cubetas usadas eran de 1 cm de paso óptico la ecuación b resulta finalmente:

$$(c) Z \text{ (U/ml)} = \frac{V \times \Delta A / \Delta t}{\varepsilon \times v \times 10}$$

Para el cálculo de las actividades enzimáticas se utilizaron los siguientes valores del coeficiente de extinción molar:

a)  $\varepsilon_{\text{fenol}} (270\text{nm}) = 0.148 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

b)  $\varepsilon_{\text{benzoilcolina}} (240\text{nm}) = 0.66 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

c)  $\varepsilon_{\text{p-nitrofenol}} (405\text{nm}) = 1.6 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

d)  $\varepsilon_{\text{5-tio-nitrobenzoato}} (405\text{nm}) = 1.36 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

e)  $\varepsilon_{\text{NADP}^+} (340\text{nm}) = 0.63 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

f)  $\varepsilon_{\text{IHMP}} (270\text{nm}) = 3.03 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$

#### 4. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Todos los resultados se introdujeron en una base de datos generada en el programa informático SPSS versión 11 para Windows 98 y se procesaron estadísticamente de la siguiente forma:

##### 4.1. Análisis descriptivo:

- Inicialmente se estableció el perfil de los individuos mediante el cálculo de la distribución de frecuencias y las medidas de tendencia central y dispersión.
- Se utilizó la prueba de Kolgomorov-Smirnov (corrección de Lilliefors) para determinar la bondad de ajuste a una distribución normal y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de las varianzas de cada una de las muestras comparadas.

##### 4.2. Análisis bivalente:

- Las variables continuas biológicas (actividades
- enzimáticas, edad, índice de masa corporal) se analizaron mediante  $t$  de Student o análisis de la varianza de una vía. El factor de agrupación (variable independiente) en el que estábamos más interesados fue la exposición a plaguicidas (1: aplicadores; 0: controles). Cuando el análisis de la varianza para muestras independientes obtenía un valor  $F$  significativo se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Neuman-Keuls. En ausencia de normalidad, o cuando las varianzas eran heterogéneas, se utilizó el test de

Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis.

- El comportamiento de la misma actividad enzimática a lo largo de los dos momentos del ciclo de fumigación se analizó mediante el test de muestras apareadas o el test de Friedman, en caso de ausencia de normalidad o heterogeneidad de varianzas.
- Para evaluar la relación existente entre variables cuantitativas (actividades enzimáticas, edad, IMC, etc.) se utilizó el análisis de correlación de Pearson o, caso de que las variables no siguieran una distribución normal, el de Spearman.
- Las variables categóricas se compararon entre grupos por medio del test de la  $\chi^2$  que permitió, además, calcular *odds ratio* (OR) crudas.

#### **4.3. Análisis multivariante:**

- Mediante regresión lineal múltiple se cuantificó la contribución de los fenotipados séricos de PON1 y BChE así como de variables sociodemográficas y ocupacionales sobre la variabilidad de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas, tanto en suero como en eritrocitos.

Se construyeron dos modelos de regresión lineal múltiple utilizando el procedimiento paso a paso (*stepwise*) para estimar la proporción de variabilidad en los valores de los distintos parámetros analizados explicada por las variables más relevantes. En ellos, las variables independientes fueron las actividades enzimáticas (eritrocitarias y plasmáticas) y como variables dependientes o predictoras se introdujeron la edad, sexo, IMC, exposición (trabajadores expuestos frente a controles), consumo de tabaco (1: sí, 0: no), consumo de alcohol (1: sí, 0: no), fenotipado sérico de PON1 (1: portador del alelo B –fenotipos BB ó AB-; 0: fenotipo AA) y fenotipado sérico de BChE (1: portador de fenotipos inusuales como UA, UF o de baja actividad; 0: portador de fenotipos usuales UU ó US).

---

En el segundo modelo sólo se incluyeron los trabajadores de invernadero (es decir, los aplicadores de plaguicidas), introduciendo en él, además de los predictores mencionados anteriormente (salvo la exposición), diversas variables ocupacionales: presencia de sintomatología clínica relacionadas con la exposición a plaguicidas (1: sí; 0: no), antecedentes de intoxicación previa por plaguicidas (1: sí; 0: no), utilización de medidas de protección personal durante la preparación de la mezcla de plaguicidas (1: no; 0: sí) y utilización de medidas de protección personal durante la aplicación de los mismos (1: no; 0: sí).

Los criterios de inclusión y exclusión de las variables que se utilizaron en los modelos de regresión fueron: un nivel de significación inferior a 0.05 para la entrada y un nivel de significación inferior a 0.1 para la permanencia de la variable. El nivel de significación estadística se estableció para toda  $p < 0.05$ .

- Mediante análisis de regresión logística múltiple se valoró la influencia de las diferentes variables predictoras (ocupacionales, demográficas y polimorfismos enzimáticos) sobre las siguientes variables resultado (independientes): presencia de síntomas clínicos relacionados con la exposición a plaguicidas (1: sí; 0: no), intoxicación previa (1: sí; 0: no), e incluso riesgo de inhibir la AChE por encima de un 15% entre los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (1: sí; 0: no). Por este procedimiento se calcularon también los riesgos relativos e intervalos de confianza al 95%. En este análisis se introdujeron los siguientes factores como variables independientes o predictoras: edad, índice de masa corporal, consumo de tabaco (1: sí, 0: no), consumo de alcohol (1: sí, 0: no), fenotipos séricos de colinesterasa (1: fenotipo inusual; 0: fenotipo usual), fenotipos séricos de PON1 (1: portador del alelo B; 0: fenotipo AA), años de exposición como aplicadores, utilización de medidas de protección personal durante la preparación de la mezcla (0: sí; 1: no) o durante la fumigación (0: sí; 1: no). Se utilizó el procedimiento paso a paso (*stepwise*) de selección automática de variables



## RESULTADOS

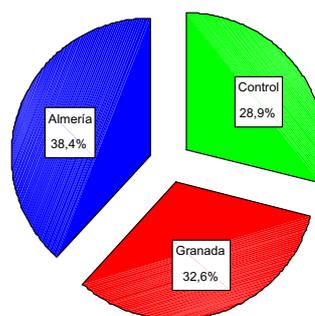


## 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

### 1.1. Sujeto de estudio

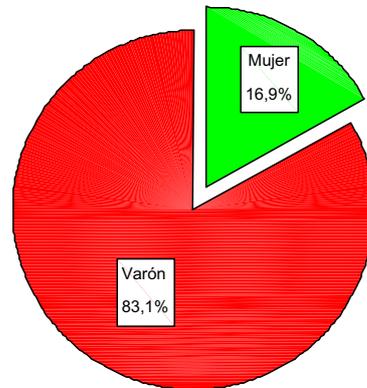
En este estudio han participado en total 190 individuos, distribuidos de la siguiente forma: 55 controles y 135 fumigadores/aplicadores de plaguicidas, de los cuales 62 proceden del litoral granadino (Carchuna) y 73 del Poniente almeriense. En la siguiente tabla y diagrama de sectores se puede apreciar la distribución de la muestra:

	Frecuencia	Porcentaje
Control	55	28,9
Granada	62	32,6
Almería	73	38,4
Total	190	100,0

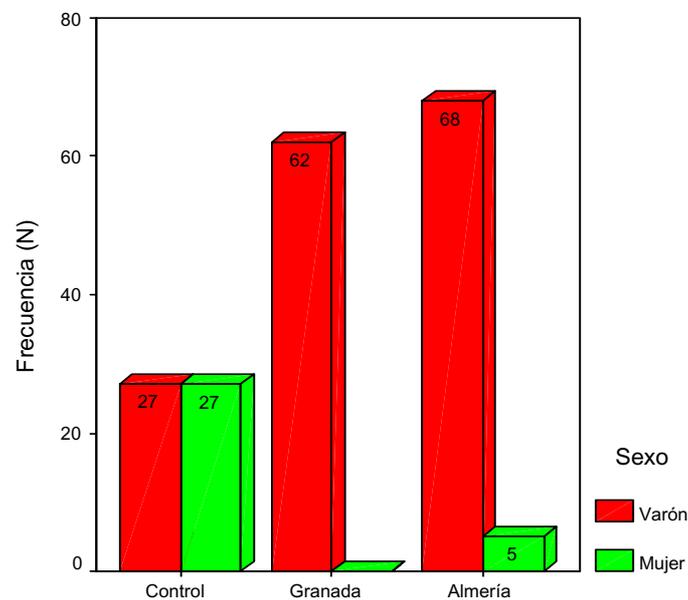


### 1.2. Sexo.

En cuanto a la distribución por sexo, hay datos disponibles de 189 individuos, de los cuales, la mayoría son varones según se muestra en la siguiente figura:



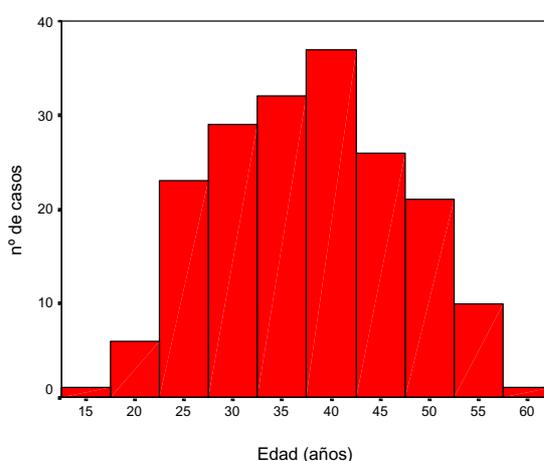
El grupo control está constituido por un 50% de varones y otro 50% de mujeres, mientras que los fumigadores son mayoritariamente varones (el 100% en Carchuna y el 92,5% en Almería). Concretamente hay 130 varones y 5 mujeres. En la siguiente figura se muestra esta distribución.



El análisis de la correspondiente tabla de contingencia muestra diferencias estadísticamente significativas en la distribución por sexo ( $\chi^2 = 59.9$ ,  $p < 0.001$ ).

### 1.3. Edad.

La edad media de todos los individuos estudiados es de  $37.5 \pm 9.3$  años (rango 14-59;  $n = 186$ ). El correspondiente histograma de frecuencias se muestra en la siguiente figura:



No se observan diferencias entre controles y expuestos según se puede ver en la siguiente tabla:

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
Edad (años)	Control	51	39,02	8,35	,17
	Expuestos	135	36,90	9,61	

Sin embargo, al estratificar por procedencia de los fumigadores sí se observan diferencias significativas, ya que los individuos más jóvenes son los de Almería (prueba de Student-Neuman-Keuls):

años de edad

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Control	51	39,02	8,35		23	55
Granada	62	40,35	8,49		22	57
Almería	73	33,96	9,58	< 0.001	14	59
<i>Total</i>	186	37,48	9,31		14	59

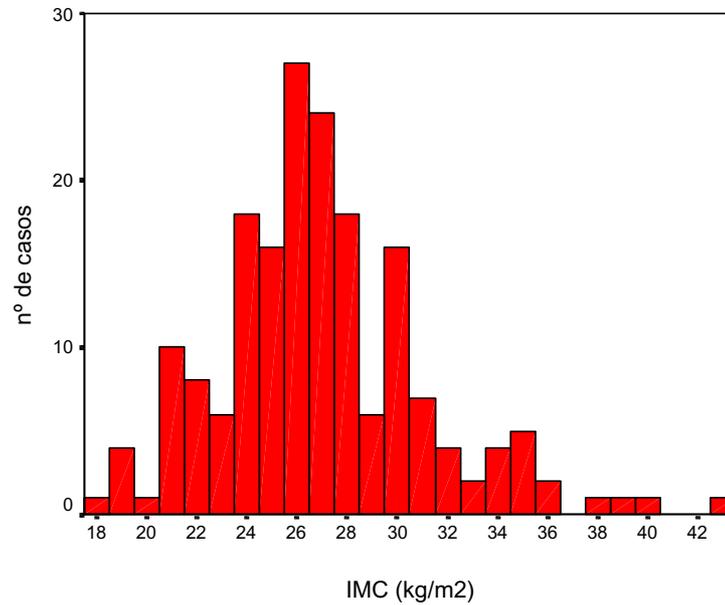
Tampoco se observan diferencias al comparar por intoxicación previa por plaguicidas o por existencia de sintomatología compatible con exposición crónica a plaguicidas, según se muestra en las siguientes tablas:

Intoxicación previa	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	93	36,99	10,04	,89
Sí	41	36,73	8,79	

Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	101	36,74	9,90	,82
Sí	29	37,21	9,23	

#### 1.4. IMC

El valor medio obtenido ha sido de  $27.0 \pm 4.11 \text{ kg/m}^2$  (rango: 18.4 - 42.5; n = 183). El correspondiente histograma de frecuencias se muestra en la siguiente figura:



Al comparar controles y expuestos se observan diferencias significativas, ya que los expuestos presentan un IMC mayor tal y como se muestra en la siguiente tabla:

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) Control	48	25,809	3,683	,023
Expuestos	135	27,377	4,183	

En cuanto a la procedencia de los fumigadores, los de Granada presentan un IMC significativamente más alto que los de Almería y los controles (test de Student-Neuman-Keuls), según se muestra en la siguiente tabla:

IMC						
	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv.</i>	<i>P</i>	<i>Mínim</i>	<i>Máximo</i>
Contro	48	25,80	3,683	,00	18,4	35,6
Granad	62	28,71	4,483		19,0	42,5
Almería	73	26,23	3,560		18,9	35,1
<i>Total</i>	183	26,96	4,106		18,4	42,5

No hay diferencias en el IMC entre los que han sufrido una intoxicación previa y los que no, según se puede apreciar en la siguiente tabla:

Intoxicación previa	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	93	27,433	4,537	,848
Sí	41	27,282	3,348	

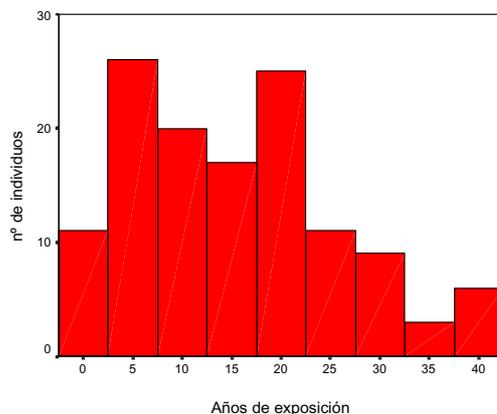
Tampoco hay diferencias al comparar por la existencia de sintomatología compatible con la exposición crónica a plaguicidas, según se puede ver en la siguiente tabla:

Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	101	27,178	4,183	,359
Sí	29	27,996	4,310	

El análisis de correlación simple ha hallado una asociación directa del IMC con la edad ( $r= 0.343$ ,  $p< 0.01$ ,  $n= 183$ ).

### 1.5. Años de exposición.

El valor medio obtenido ha sido de  $15.5 \pm 10.4$  años (rango: 1 - 40,  $n= 128$ ). El correspondiente histograma de frecuencias se muestra en la siguiente figura:



Al comparar por lugar de procedencia de los fumigadores se observa que los de Granada presentan casi el doble de años de exposición que los de Almería, según se muestra en la siguiente tabla:

Fumigadores		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
Años profesión	Granada	60	20,47	8,94	0.000
	Almería	68	11,13	9,67	

No hay diferencias significativas entre los que han sufrido una intoxicación previa por plaguicidas y los que no, según se muestra en la siguiente tabla:

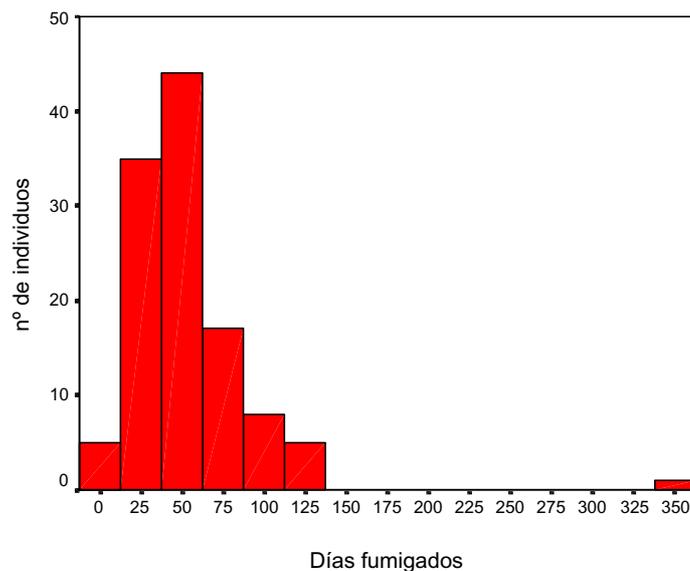
Intoxicación previa	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	89	15,03	10,27	0.330
Sí	38	17,00	10,61	

Tampoco hay diferencias al comparar por la existencia de sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas:

Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	96	15,89	10,36	0.667
Sí	29	14,93	10,71	

### 1.6. Días fumigados el último año.

La media de días fumigados el último año ha sido de  $52.0 \pm 40.1$  (rango: 0 - 360; n= 115). El correspondiente histograma de frecuencias se presenta en la siguiente figura:



No se observan diferencias significativas en el número de días fumigados el último año al comparar por procedencia de los fumigadores:

Procedencia	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
Granada	60	48,35	24,30	0.319
Almería	55	56,05	52,05	

No hay diferencias significativas entre los que han sufrido una intoxicación previa por plaguicidas y los que no, según se muestra en la siguiente tabla:

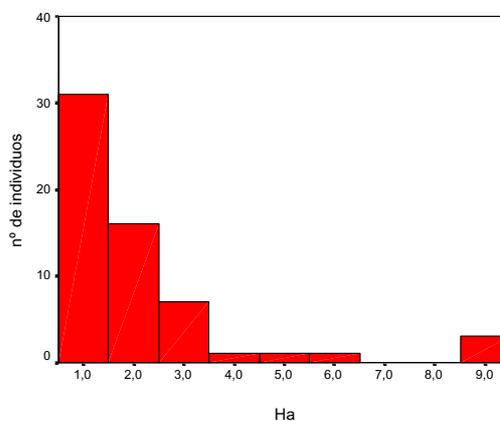
Intoxicación previa	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	79	51,63	44,26	0.732
Sí	35	54,43	28,24	

Tampoco se observan diferencias al comparar por la existencia de sintomatología compatible con la exposición crónica a plaguicidas:

Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	91	51,84	43,19	0.729
Sí	23	55,09	23,36	

### 1.7. Superficie de invernadero cultivada.

Esta información sólo la suministraron los fumigadores de Carchuna. El valor medio de superficie cultivada fue de  $2.04 \pm 1.89$  Ha (rango: 0.6 - 9, n= 60). El correspondiente histograma de frecuencias se muestra en la siguiente figura:



No se observan diferencias significativas entre los que han sufrido una intoxicación previa y los que no, según se muestra en la siguiente tabla:

Intoxicación previa	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	44	2,0720	2,0738	0.824
Sí	16	1,9475	1,3298	

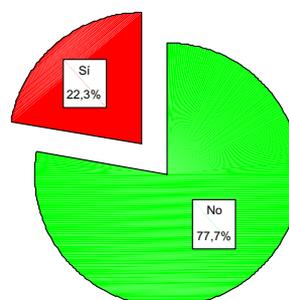
Tampoco hay diferencias al comparar por la existencia de sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas:

Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
No	46	1,8865	1,7689	0.262
Sí	14	2,5393	2,2577	

### 1.8. Síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas.

De los 130 fumigadores en que se conocía este dato, el 22.3% presentaba síntomas compatibles con la exposición crónica a plaguicidas, según se muestra en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	101	77,7
Sí	29	22,3
<i>Total</i>	<i>130</i>	<i>100,0</i>



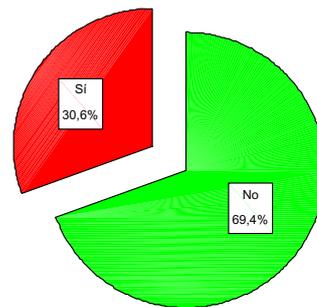
Al estratificar por zona de procedencia de los individuos no se observan diferencias significativas ( $p=0.795$ ). Tampoco hay diferencias al comparar por intoxicación previa por plaguicidas ( $p=0.154$ ), es decir, el hecho de tener antecedentes de intoxicación no conlleva un

mayor riesgo de presentar sintomatología relacionada con la exposición a plaguicidas. Por tanto, ambas variables no están relacionadas ( $r = -0.125$ ;  $p = 0.156$ ).

### 1.9. Intoxicación previa por plaguicidas.

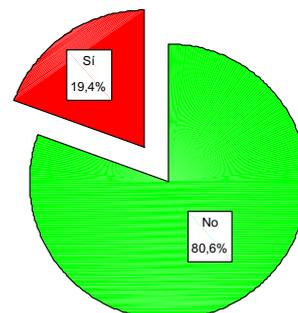
Algo menos de la tercera parte de los fumigadores (30.6%) tenía el antecedente de al menos una intoxicación por plaguicidas, según se presenta en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	93	69,4
Sí	41	30,6
<i>Total</i>	<i>134</i>	<i>100,0</i>



No existen diferencias significativas entre los fumigadores de Granada o de Almería al comparar por esta variable ( $p = 0.264$ ).

Al considerar sólo los casos intoxicados por plaguicidas anticolinesterásicos, el porcentaje desciende hasta el 13.2% de los individuos expuestos, según se indica en la siguiente tabla y figura:



	Frecuencia	Porcentaje
No	104	80,6
Sí	25	19,4
<i>Total</i>	<i>129</i>	<i>100,0</i>

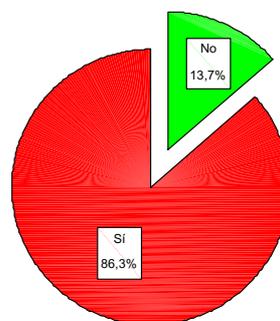
En este caso tampoco se observan diferencias significativas entre los fumigadores de

Granada y los de Almería ( $p= 0.147$ ).

### 1.10. Utilización de plaguicidas anticolinesterásicos.

La gran mayoría de los fumigadores estudiados (86.3%) utilizaban plaguicidas anticolinesterásicos, ya sea organofosforados o carbamatos, según se muestra en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	16	13,7
Sí	101	86,3
<i>Total</i>	<i>117</i>	<i>100,0</i>



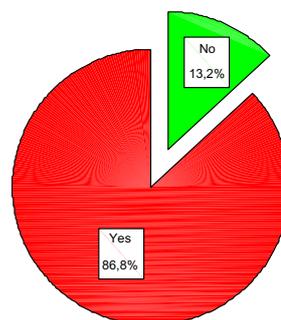
No hay diferencias significativas al comparar por lugar de procedencia de los fumigadores ( $p= 0.132$ ), por lo que el patrón de utilización de estos compuestos es similar en

ambas zonas.

Con relación a los plaguicidas más utilizados, los carbamatos, se observa que la gran mayoría de los fumigadores (casi el 87%) los utilizan, tal y como se puede ver a continuación:

**Utilización de Carbamatos**

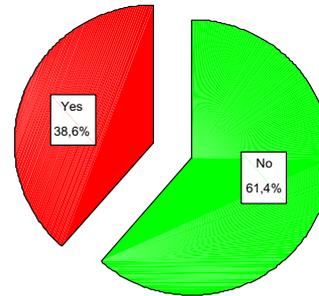
	Frecuencia	Porcentaje válido
No	15	13,2
Yes	99	86,8
<i>Total</i>	<i>114</i>	<i>100,0</i>



No se observan diferencias significativas al comparar por lugar de procedencia de los fumigadores ( $p= 0.189$ ).

Con relación a los plaguicidas organofosforados (utilizados más como fungicidas que como insecticidas), sólo los utiliza el 38.6% de los fumigadores, según se muestra en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	70	61,4
Yes	44	38,6
<i>Total</i>	<i>114</i>	<i>100,0</i>



Al estratificar por zona de procedencia de los individuos se observan diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), pues los organofosforados son utilizados 6.54 veces más por los fumigadores de Granada que por los de Almería (IC 95%: 2.75-15.38).

No se observa asociación entre utilización de organofosforados y sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas ( $p = 0.658$ ), intoxicación previa por estos agentes ( $p = 0.944$ ) o por plaguicidas anticolinesterásicos ( $p = 0.897$ ).

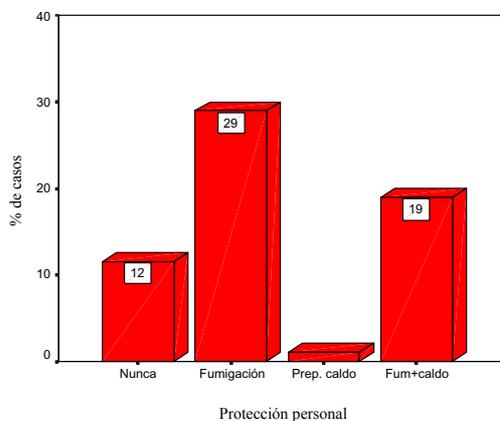
Tampoco existe asociación entre utilización de carbamatos y sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas ( $p = 0.348$ ), intoxicación previa por plaguicidas ( $p = 0.421$ ), o intoxicado por plaguicidas anticolinesterásicos ( $p = 0.728$ ).

Asimismo, se puede descartar también asociación entre utilización de plaguicidas anticolinesterásicos y sintomatología relacionada con exposición crónica a plaguicidas ( $p = 0.518$ ), intoxicación previa por plaguicidas ( $p = 0.351$ ) o intoxicación por agentes anticolinesterásicos ( $p = 0.755$ ).

### 1.11. Medidas de protección personal.

Aproximadamente uno de cada cinco fumigadores no utiliza ningún tipo de prenda de protección personal y uno de cada tres se protege durante los procesos de preparación del caldo (dilución del producto concentrado) y/o de fumigación (aplicación del producto). En la siguiente tabla y figura se muestra esta información:

	Frecuencia	Porcentaje
Nunca	22	19,1
Fumigación	55	47,8
Preparación caldo	2	1,7
Fumigación y preparación caldo	36	31,3
<i>Total</i>	<i>115</i>	<i>100,0</i>



Al estratificar por zona de procedencia de los fumigadores se observa que, en general,

los de Almería adoptan mejores medidas de protección que los de Granada ( $p < 0.001$ ), según se muestra en la siguiente tabla de contingencia:

Recuento

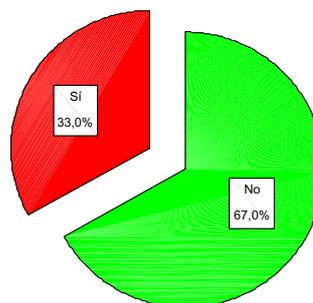
			<i>Total</i>
	Granada	Almería	
Nunca	16	6	22
Fumigación	18	37	55
Prep. caldo		2	2
Fum+caldo	26	10	36
<i>Total</i>	60	55	115

Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la utilización de medidas de protección personal al comparar por sintomatología relacionada con exposición crónica a plaguicidas ( $p = 0.336$ ), antecedentes de intoxicación previa por estos agentes ( $p = 0.532$ ), o intoxicación por compuestos anticolinesterásicos ( $p = 0.543$ ).

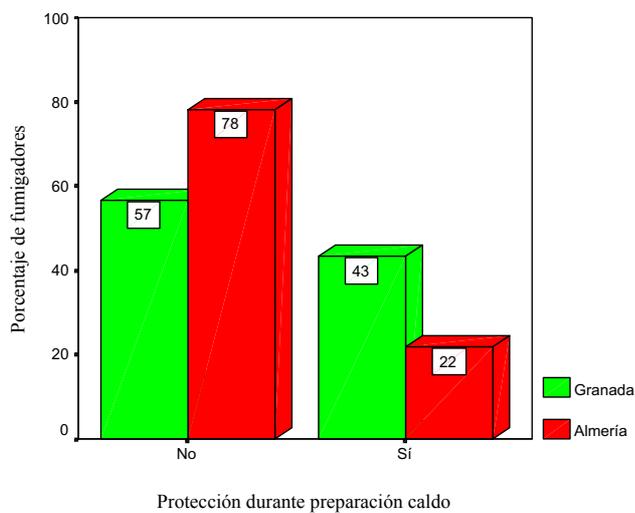
### 1.12. Protección durante la preparación del caldo.

Sólo la tercera parte de los fumigadores adopta medidas de protección durante la preparación del caldo, según se puede apreciar en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	77	67,0
Sí	38	33,0
Total	115	100,0



Al comparar por lugar de procedencia se observa que los fumigadores de Granada se protegen 2.74 veces más que los de Almería (IC 95%: 1.21-6-21;  $p=0.014$ ). En la siguiente figura se muestra esta diferencia:



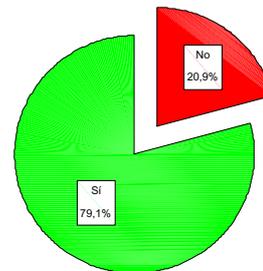
Sin embargo, no hay diferencias significativas en la protección durante la preparación

del caldo al comparar por sintomatología relacionada con plaguicidas ( $p= 0.999$ ), intoxicación previa por estos compuestos ( $p= 0.473$ ), o intoxicación por agentes anticolinesterásicos ( $p= 0.521$ ).

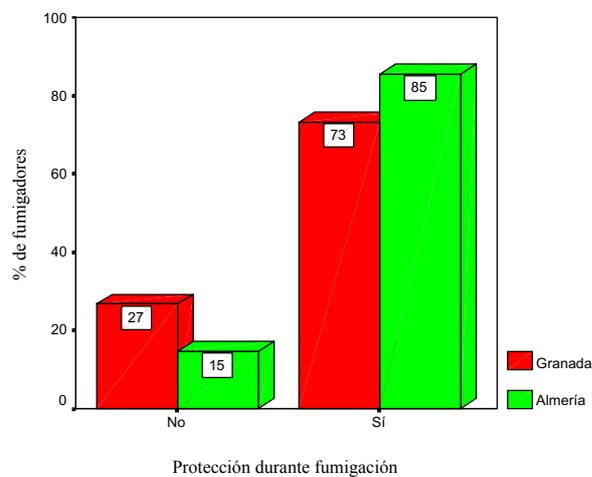
### 1.13. Protección durante la fumigación.

A diferencia de lo anterior, casi el 80% de los individuos adopta alguna medida de protección durante el proceso de fumigación, según se muestra en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	24	20,9
Sí	91	79,1
<i>Total</i>	<i>115</i>	<i>100,0</i>



Al comparar por lugar de procedencia se vuelve a constatar que los fumigadores de Granada se protegen durante la fumigación menos que los de Almería, aunque las diferencias no son significativas ( $p= 0.110$ ) según se muestra en la siguiente figura:

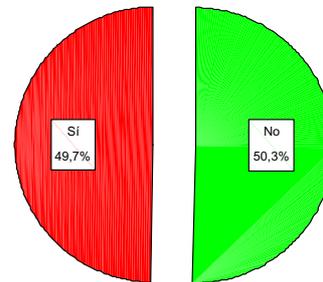


Tampoco hay diferencias al comparar la adopción de medidas de protección durante la fumigación con sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas ( $p=0.396$ ), intoxicación previa por plaguicidas ( $p=0.591$ ), o intoxicación por agentes anticolinesterásicos ( $p=0.999$ ).

#### 1.14. Consumo de tabaco.

Prácticamente la mitad de los individuos estudiados son consumidores de tabaco, según se puede apreciar en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	85	50,3
Sí	84	49,7
<i>Total</i>	<i>169</i>	<i>100,0</i>



Los fumigadores fuman 2.50 veces más que los controles (IC 95%: 1.16-5.39;  $p=0.017$ ). Por el contrario, no se observan diferencias significativas al comparar por la zona de procedencia de los fumigadores ( $p=0.134$ ), por lo que se puede asumir que los de Granada fuman igual que los de Almería.

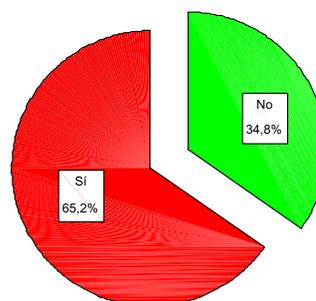
Sí se observan diferencias significativas al comparar por sexo, pues los hombres fuman 2.46 veces más que las mujeres (IC 95%: 0.98-6.17;  $p=0.050$ ).

También se ha observado una asociación entre tabaco y alcohol, pues los individuos que fuman tienen 4.20 veces más probabilidad de beber que los que no lo hacen (IC 95% 2.06-8.17).

### 1.15. Consumo de alcohol.

Aproximadamente dos de cada tres individuos estudiados son consumidores de alcohol, según se muestra en la siguiente tabla y figura:

	Frecuencia	Porcentaje
No	55	34,8
Sí	103	65,2
Total	158	100,0

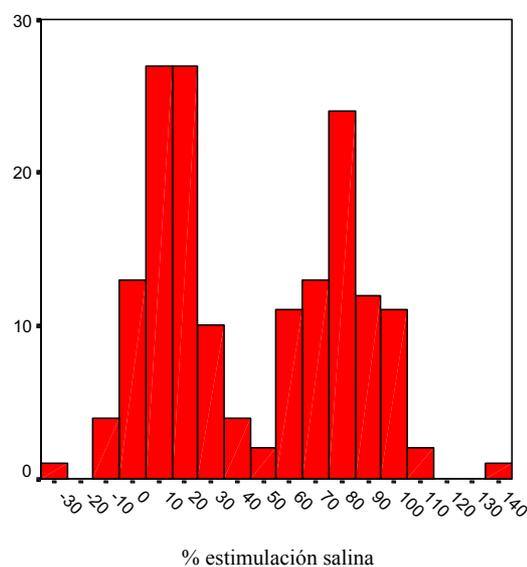


No existen diferencias entre controles y expuestos en cuanto al consumo de alcohol ( $p=0.104$ ). Sin embargo, al comparar los fumigadores entre sí, se observa que el consumo de alcohol es 2.51 veces mayor en los de Granada que en los de Almería (IC 95%: 1.13-5.59;  $p=0.022$ ).

No hay diferencias significativas en el consumo de alcohol entre los que presentan sintomatología relacionada con plaguicidas y los que no ( $p=0.557$ ); ni tampoco entre los que padecieron una intoxicación previa por estos compuestos y los que no ( $p=0.883$ ). Sin embargo, se han observado diferencias significativas al comparar el consumo de alcohol por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo, pues los que consumen alcohol se protegen 5.29 veces más que los que no son consumidores (IC 95%: 1.66-16.34;  $p=0.002$ ). Por el contrario, no se han encontrado diferencias significativas al efectuar la comparación entre consumo de alcohol y utilización de medidas de protección personal durante la fumigación ( $p=0.652$ ).

### 1.16. Fenotipo plasmático de paraoxonasa.

Utilizando el método de estimulación salina de la actividad paraoxonasa (POasa), tal y como se explica en el apartado de Material y Métodos, se observan dos modos correspondientes a sendas distribuciones normales. En la siguiente figura se representa el correspondiente histograma de frecuencias:



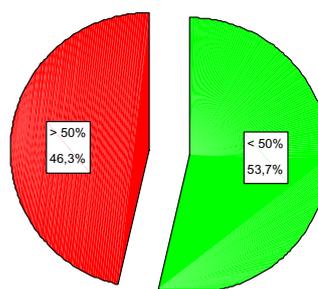
El segundo modo corresponde a los individuos portadores del alelo B (fenotipos AB y BB) y el primero corresponde a los individuos con fenotipo AA.

El valor medio de estimulación salina es de  $45.0\% \pm 36.3$  ( $n=162$ ), mientras que la mediana es  $32.3\%$  (rango intercuartílico  $12.8-80.3\%$ ). En la figura anterior se observa que el límite de separación entre los dos modos está en un  $50\%$  de estimulación salina de la actividad POasa. Este límite ha permitido clasificar los individuos en dos grupos, en función de que la

estimulación salina de la POasa sea superior o inferior al mismo, según se representa en la siguiente tabla y figura:

**Estimulación salina POasa**

	Frecuencia	Porcentaje
< 50%	87	53,7
> 50%	75	46,3
<i>Total</i>	<i>162</i>	<i>100,0</i>

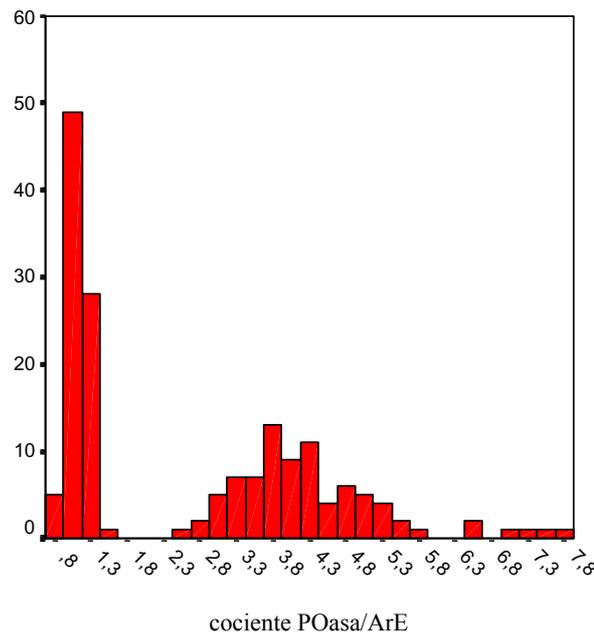


Al utilizar la estimulación de POasa por encima o por debajo de un 50% como factor de comparación no se observan diferencias significativas entre controles y expuestos ( $p=0.331$ ) ni entre los fumadores de Granada y los de Almería ( $p=0.757$ ).

Tampoco se observan diferencias al comparar por consumo de tabaco ( $p=0.401$ ) o de alcohol ( $p=0.376$ ). Asimismo, no hay diferencias al comparar por sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas ( $p=0.950$ ) ni con antecedentes de intoxicación por estos compuestos ( $p=0.170$ ). No hay diferencias al comparar por protección durante la preparación del caldo ( $p=0.775$ ) o durante la fumigación ( $p=0.316$ ).

### 1.17. Cociente paraoxonasa/arilesterasa (POasa/ArE).

Según se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, este cociente se utiliza para inferir el fenotipo plasmático de paraoxonasa. En nuestro caso, para establecer dicho cociente se han utilizado los valores medios de las actividades POasa y ArE en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. En la siguiente figura se muestra el correspondiente histograma de frecuencias:



El valor medio obtenido es de  $2.7 \pm 1.76$  ( $n= 166$ ). La mediana es 1.93 y el rango intercuartílico: 1.10-4.01. Visualmente se pueden apreciar 3 modos (distribución trimodal), separados entre sí por los valores 2 y 6. De esta forma, los individuos con cociente entre 0 y 2 corresponderían al fenotipo plasmático AA, aquellos otros entre 2 y 6 al fenotipo AB y un valor superior a 6 al fenotipo BB. En consecuencia, la distribución de los 3 fenotipos es la que se expresa en la siguiente tabla:

		Frecuencia	Porcentaje
Fenotipo sérico	AA (ratio < 2)	83	50,0
POasa	AB (ratio 2-6)	77	46,4
	BB (ratio >6)	6	3,6
	<i>Total</i>	166	100,0

Las distribuciones génicas serían: alelo A (0.7319) y alelo B (0.2681).

Posteriormente se han utilizado los fenotipos plasmáticos POasa como factor de comparación. Así, no se observan diferencias significativas entre controles y expuestos ( $p=0.702$ ), aunque sí indicios de significación al comparar los fumigadores de Granada con los de Almería ( $p=0.087$ ), debido a que los únicos 4 casos con fenotipo BB corresponden a esta última provincia.

Al comparar por sexo se observan indicios de significación ( $p=0.090$ ), pareciendo radicar las diferencias a nivel del fenotipo BB, según se muestra en la siguiente tabla de contingencia:

**Tabla de contingencia**

Recuento		fenotipo sérico PON			<i>Total</i>
		AA (ratio < 2)	AB (ratio 2-6)	BB (ratio >6)	
Sexo	hombre	70	64	3	137
	mujer	13	12	3	28
	<i>Total</i>	83	76	6	165

No hay diferencias significativas al comparar por consumo de tabaco ( $p= 0.395$ ), consumo de alcohol ( $p= 0.341$ ), síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas ( $p= 0.266$ ), intoxicación previa por estos compuestos ( $p= 0.372$ ), o por agentes anticolinesterásicos ( $p= 0.190$ ), uso de plaguicidas anticolinesterásicos ( $p= 0.721$ ), utilización de organofosforados ( $p= 0.295$ ), utilización de carbamatos ( $p= 0.621$ ), utilización de medidas de protección personal ( $0.955$ ), protección durante la preparación del caldo ( $p= 0.874$ ) o protección durante la fumigación ( $p= 0.477$ ).

### 1.18. Fenotipo plasmático BeChE.

En la siguiente tabla se muestra la distribución de fenotipos encontrada en toda la muestra de individuos estudiados:

	Frecuencia	Porcentaje
Usual (UU)	168	88,4
Inusual (UF, UA, AA)	22	11,6
<i>Total</i>	<i>190</i>	<i>100,0</i>

Posteriormente se han utilizado los fenotipos plasmáticos de BeChE como factor de comparación. Se han observado diferencias significativas entre controles y expuestos, pues éstos últimos tienen 5.43 veces más probabilidad de presentar fenotipo usual que los controles (IC 95% 2.12 – 13.89;  $p < 0.001$ ), según se muestra en la siguiente tabla:

Recuento	Fenotipo sérico BChE		Total
	Usual	Otro (UF, UA, AA)	
<i>Control</i>	41	14	55
<i>Expuestos</i>	127	8	135
<i>Total</i>	<i>168</i>	<i>22</i>	<i>190</i>

Dichas diferencias se mantienen tras ajustar por lugar de procedencia de los fumigadores, ya que los 8 casos con fenotipo inusual se reparten por igual entre los individuos de Granada y los de Almería (4 casos en cada zona).

Al comparar por sexo se observan indicios de significación, pues los hombres parecen presentar con mayor frecuencia fenotipos usuales (OR: 2.65, IC 95%: 0.98-7.15;  $p=0.066$ ).

No hay diferencias significativas al comparar por consumo de tabaco ( $p=0.502$ ), consumo de alcohol ( $p=0.306$ ), síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas ( $p=0.683$ ), intoxicación previa por estos compuestos ( $p=0.434$ ) o por agentes anticolinesterásicos ( $p=0.353$ ), uso de plaguicidas anticolinesterásicos ( $p=0.527$ ), utilización de organofosforados ( $p=0.639$ ), utilización de carbamatos ( $p=0.999$ ), utilización de medidas de protección personal (0.248), protección durante la preparación del caldo ( $p=0.091$ ) o protección durante la fumigación ( $p=0.341$ ). No obstante, dado el pequeño número de individuos con fenotipo inusual de colinesterasa, los resultados de estas últimas comparaciones hay que tomarlos con precaución.

## **2. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ESTUDIADAS**

A continuación se realiza un análisis estadístico de cada una de las enzimas (plasmáticas y eritrocitarias) estudiadas. Se ha seguido la misma sistemática en todas ellas, con la finalidad de explorar asociaciones con las diferentes variables estudiadas. Así, inicialmente se realiza un análisis bivariante en el que se explora la asociación de cada actividad enzimática con la exposición a plaguicidas, procedencia de los fumigadores, sexo, existencia de síntomas

relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, antecedentes de intoxicación por estos productos, utilización de organofosforados, carbamatos o compuestos anticolinesterásicos, adopción de medidas de protección personal durante la preparación del caldo y durante la fumigación.

Posteriormente se comenta el resultado del análisis de correlación simple, cuyo objetivo ha sido explorar la asociación entre cada actividad enzimática con el resto de enzimas así como con otras variables cuantitativas como la edad y el IMC.

Finalmente se presentan los resultados del análisis de regresión lineal múltiple, cuya finalidad ha sido explorar qué variables estudiadas pueden predecir los niveles de cada una de las enzimas analizadas; es decir, estudiar las posibles asociaciones entre éstas (utilizadas como variables dependientes) y aquéllas (utilizadas como variables independientes). Este análisis sin duda otorga mayor calidad a los datos que los anteriores, de ahí que sus resultados se antepongan a los obtenidos con el análisis bivalente, en el que sólo se analizaban dos variables entre sí.

Con objeto de sintetizar los resultados más relevantes, a continuación se presentan 9 tablas. Las dos primeras resumen los resultados de las actividades enzimáticas controlando por la variable en la que estamos más interesados (exposición a plaguicidas), por lo que se presentan los datos de los individuos expuestos (fumigadores) frente a los controles. Las tres tablas siguientes contienen los análisis de correlación simple, expresando el coeficiente “r” y la significación estadística. Finalmente, las cuatro últimas tablas presentan los datos más relevantes de los dos modelos de análisis de regresión lineal múltiple donde se puede apreciar a simple vista y de forma rápida cuáles son las principales variables predictoras de las actividades enzimáticas en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados.

**TABLA 1.** Resumen de las actividades enzimáticas plasmáticas de controles y fumigadores en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

Actividad	Periodo máxima exposición		Periodo mínima exposición		P
	Control <i>Media ± D.T.</i>	Fumigadores <i>Media ± D.T.</i>	Control <i>Media ± D.T.</i>	Fumigadores <i>Media ± D.T.</i>	
BeChE	928.1 ± 215.5	940.9 ± 180.0	894.9 ± 175.5	833.0 ± 161.8	0.695
ArE	110.7 ± 20.8	104.2 ± 24.6	108.4 ± 19.6	107.0 ± 23.3	0.100
POasa *	262.9 ± 125.6	260.3 ± 122.8	238.2 ± 114.0	217.6 ± 107.2	0.900
ssPOasa *	435.4 ± 259.5	393.7 ± 252.1	452.8 ± 274.0	384.8 ± 226.62	0.332
DZOasa	7.2 ± 2.4	7.2 ± 2.6	7.4 ± 1.9	6.6 ± 2.2	0.967

Las actividades enzimáticas se expresan en U/l excepto la ArE que es en kU/l.  
*t*-Student, \* *U* Mann-Whitney.

**TABLA 2.** Resumen de las actividades enzimáticas eritrocitarias de controles y fumigadores en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

Actividad	Periodo máxima exposición		Periodo mínima exposición		P
	Control Media $\pm$ D.T.	Fumigadores Media $\pm$ D.T.	Control Media $\pm$ D.T.	Fumigadores Media $\pm$ D.T.	
AChE	13408 $\pm$ 2022	11464 $\pm$ 2439	13823 $\pm$ 2614	13178 $\pm$ 1923	0.111
G6PDH	4.3 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.2	3.7 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 1.1	0.107
GR	9.0 $\pm$ 2.0	8.4 $\pm$ 1.8	8.9 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 1.3	0.011
CAT	85.3 $\pm$ 22.6	89.7 $\pm$ 19.9	97.6 $\pm$ 17.6	97.2 $\pm$ 15.4	0.900
GPx	32.6 $\pm$ 7.6	35.4 $\pm$ 8.4	41.5 $\pm$ 3.4	43.1 $\pm$ 5.3	0.046
SOD	3322 $\pm$ 899	2597 $\pm$ 606	3342 $\pm$ 1235	2647 $\pm$ 878	0.002

*t*-Student

Las actividades enzimáticas se expresan en U/g Hb (salvo la AChE que es en U/hematocrito y la CAT que es en mU/g Hb).

Olga López Guarnido

**TABLA 3.** Correlaciones globales de las diferentes actividades enzimáticas entre sí en el **periodo de mayor exposición** a plaguicidas.

Actividad	BeChE	ArE	POasa	ssPOasa	DZOasa	AChE	G6PDH	GR	CAT	GPx	SOD
BeChE	--										
ArE	0.067	--									
POasa	0.078	0.112	--								
ssPOasa	0.053	0.119	0.960**	--							
DZOasa	0.029	0.732**	-0.231**	-0.252**	--						
AChE	-0.096	0.136	0.022	0.088	0.019	--					
G6PDH	0.150	0.078	0.109	0.102	0.005	0.062	--				
GR	-0.023	-0.058	0.022	0.055	-0.161*	0.091	0.168*	--			
CAT	-0.129	0.028	0.006	0.019	0.029	0.237**	0.236**	0.164*	--		
GPx	-0.020	0.084	0.082	0.033	0.055	-0.194*	0.104	0.262**	0.064	--	
SOD	-0.069	0.172*	0.090	0.113	0.032	0.356**	0.185*	0.261**	0.246**	0.172*	--

**TABLA 4.** Correlaciones globales de las diferentes actividades enzimáticas entre sí en el **periodo de menor exposición** a plaguicidas.

Actividad	BeChE	ArE	POasa	ssPOasa	DZOasa	AChE	G6PDH	GR	CAT	GP	SOD
BeChE	--										
ArE	0.160	--									
POasa	0.128	0.025	--								
ssPOasa	<b>0.185*</b>	0.040	<b>0.956**</b>	--							
DZOasa	0.116	<b>0.763**</b>	<b>-0.243**</b>	<b>-0.193**</b>	--						
AChE	0.094	0.048	-0.093	-0.022	0.120	--					
G6PDH	0.121	0.159	-0.032	-0.036	0.104	-0.041	--				
GR	0.138	-0.008	0.043	0.025	-0.022	-0.122	0.162	--			
CAT	<b>-0.201*</b>	0.105	-0.091	-0.094	0.081	<b>-0.222**</b>	0.117	0.077	--		
GPx	-0.134	<b>-0.186*</b>	0.059	0.014	<b>-0.187*</b>	-0.086	0.108	<b>0.167*</b>	0.056	--	
SOD	-0.005	-0.092	-0.029	-0.063	-0.037	<b>-0.205**</b>	<b>0.373**</b>	0.079	<b>0.201*</b>	<b>0.228**</b>	--

En la tabla se muestra el coeficiente de correlación. La significación estadística se expresa como: \* p<0.05; \*\* p<0.01

**TABLA 5.** Correlaciones globales de las diferentes actividades enzimáticas con la edad y el IMC en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

Actividad	<i>Periodo de máxima exposición</i>		<i>Periodo de mínima exposición</i>	
	<b>Edad</b>	<b>IMC</b>	<b>Edad</b>	<b>IMC</b>
BeChE	0.174*	0.294**	0.204*	0.329**
ArE	-0.149	0.046	0.034	0.089
POasa	0.014	-0.114	-0.015	-0.121
ssPOasa	-0.019	-0.153	0.029	-0.071
DZOasa	-0.123	0.130	0.077	0.054
AChE	-0.045	-0.217**	0.275**	0.184*
G6PDH	0.024	0.101	-0.129	0.069
GR	0.135	-0.080	-0.063	-0.169*
CAT	-0.133	-0.211**	-0.055	-0.253**
GPx	0.168*	0.003	-0.183*	-0.165
SOD	-0.001	0.209**	-0.173*	-0.018

En la tabla se muestra el coeficiente de correlación. La significación estadística se expresa como: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

**Tabla 6.** Análisis de regresión lineal múltiple de las esterasas plasmáticas (utilizadas como variable dependiente) en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

<i>Esterasa parcial</i>	Periodo de mayor exposición a plaguicidas (M-1)				Periodo de menor exposición a plaguicidas (M-2)					
	<i>R<sup>2</sup> ajustada*</i>	<i>Predictores</i>	<i>B</i>	<i>P</i>	<i>Correlación parcial</i>	<i>R<sup>2</sup> ajustada*</i>	<i>Predictores</i>	<i>B</i>	<i>P</i>	<i>Correlación</i>
BeChE	0.098	IMC	14.02	<0.001	0.325	0.137	IMC	12.17	0.001	0.330
							Exposición	-128.1	0.005	-0.275
							Sexo	-108.8	0.005	-0.195
ArE	0.054	Alelo B PON1	-11.98	0.004	-0.247	0.121	Alelo B PON1	-15.95	<0.001	-0.359
POasa	0.423	Alelo B PON1	159.8	<0.001	0.654	0.297	Alelo B PON1	120.9	<0.001	0.551
ssPOasa	0.659	Alelo B PON1	413.7	<0.001	0.814	0.554	Alelo B PON1	361.3	<0.001	0.747
DZOasa	0.205	Alelo B PON1	-2.45	<0.001	-0.459	0.265	Alelo B PON1	-1.94	<0.001	-0.495
							Exposición	-1.09	0.005	-0.275
							Alcohol	0.91	0.017	0.236

\*El modelo se ha ajustado por las siguientes variables: edad, sexo (0: hombre; 1: mujer), IMC, exposición a plaguicidas (0: control; 1: fumigador), consumo de tabaco y alcohol (0: no; 1: sí), alelo B PON1 (0: ausente; 1: presente) y fenotipo inusual BeChE (0: no; 1: sí).

**Tabla 7.** Análisis de regresión lineal múltiple de las enzimas eritrocitarias (utilizadas como variable dependiente) en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

Enzima	Periodo de mayor exposición a plaguicidas (M-1)				Periodo de menor exposición a plaguicidas (M-2)					
	R <sup>2</sup> ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial	R <sup>2</sup> ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial
AChE	0.206	Exposición	-2636	< 0.001	-0.455	0.069	Tabaco	983.2	0.013	0.238
		Edad	-50.8	0.021	-0.199		Edad	46.7	0.049	0.189
G6PDHN.S.					0.126		Edad	-0.90	0.001	-0.319
GR	0.115	Exposición	-1.49	< 0.001	-0.349	0.106	Exposición	-0.93	< 0.001	-0.338
CAT	0.126	Sexo	13.75	0.001	0.290	0.054	IMC	-0.88	0.009	-0.252
		Edad	-0.50	0.003	-0.262					
GPx	N.S.					N.S.				
SOD	0.378	Exposición	-1023	< 0.001	-0.578	0.075	Exposición	-642.3	0.003	-0.290
		Edad	-12.14	0.043	-0.179					
		Tabaco	-222.7	0.043	-0.179					

\*El modelo se ha ajustado por las siguientes variables: edad, sexo (0: hombre; 1: mujer), IMC, exposición a plaguicidas (0: control; 1: fumigador), consumo de tabaco y alcohol (0: no; 1: sí), alelo B PON1 (0: ausente; 1: presente) y fenotipo inusual BeChE (0: no; 1: sí).

N.S.: el modelo no es significativo

**Tabla 8.** Análisis de regresión lineal múltiple de las esterasas plasmáticas (utilizadas como variable dependiente) en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. En este modelo sólo se han incluido los individuos expuestos a plaguicidas (fumigadores).

Esterasa	Máxima exposición a plaguicidas (M-1)				Mínima exposición a plaguicidas (M-2)					
	$R^2$ ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial	$R^2$ ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial
BeChE	0.099	IMC	12.75	0.003	0.333	0.063	IMC	9.68	0.024	0.279
ArE	0.129	Alelo B PON1	-12.03	0.015	-0.268	0.229	Alelo B PON1	-18.79	< 0.001	-0.435
		Alcohol	13.85	0.019	0.260		Alcohol	15.56	0.007	0.327
		Edad	-0.59	0.030	-0.241					
POasa	0.429	Alelo B PON1	153.3	< 0.001	0.638	0.297	Alelo B PON1	113.2	< 0.001	0.527
		EPI (caldo)	61.87	0.004	0.312					
ssPOasa	0.686	Alelo B PON1	413.0	< 0.001	0.829	0.600	Alelo B PON1	344.1	< 0.001	0.778
		EPI (caldo)	98.0	0.003	0.327					
		Intox. previa	78.3	0.022	0.255					
DZOasa	0.214	Alelo B PON1	-2.59	< 0.001	-0.473	0.291	Alelo B PON1	-2.08	< 0.001	-0.524
							Alcohol	1.19	0.018	0.291

\*El modelo se ha ajustado por las siguientes variables: edad, IMC, consumo de tabaco y alcohol (0: no; 1: sí), alelo B PON1 (0: ausente; 1: presente) y fenotipo inusual BeChE (0: no; 1: sí), años de exposición a plaguicidas, utilización de compuestos OP (0: no; 1: sí), utilización de medidas de protección personal (EPI) durante la preparación del caldo (0: no; 1: sí) o durante la fumigación (0: no; 1: sí); presencia de sintomatología clínica relacionada con la exposición crónica a plaguicidas (0: no; 1: sí), intoxicación previa por plaguicidas (0: no; 1: sí).

**Tabla 9.** Análisis de regresión lineal múltiple de las enzimas eritrocitarias (utilizadas como variable dependiente) en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. En este modelo sólo se han incluido los individuos expuestos a plaguicidas (fumigadores).

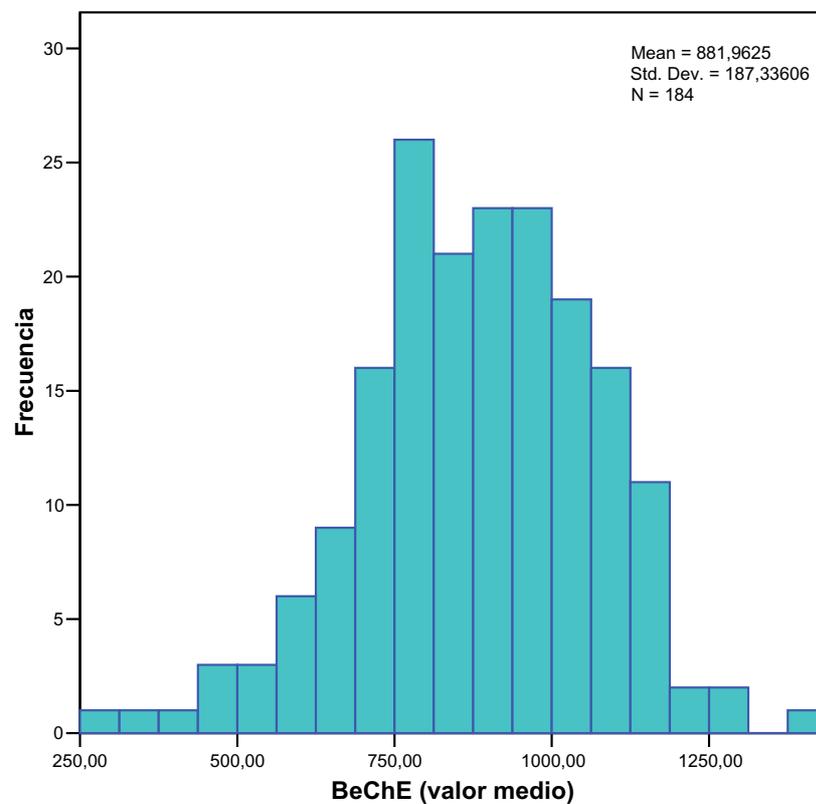
Enzima	Máxima exposición a plaguicidas (M-1)				Mínima exposición a plaguicidas (M-2)					
	R <sup>2</sup> ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial	R <sup>2</sup> ajustada*	Predictores	B	P	Correlación parcial
AChE	0.206	Utilización OP	-1591	0.001	-0.361	0.069	Tabaco	1360	0.001	0.409
		Edad	-50.8	0.021	-0.199		Años profesión	61.4	0.004	0.358
G6PDH0.037	0.115	PI (fumigación)	0.59	0.045	0.220	N.S.	Alelo B PON1	-890.4	0.026	-0.278
		Tabaco	-0.97	0.010	-0.282					
CAT	0.037	Alelo B PON1	0.76	0.042	0.225	0.075	IMC	-0.95	0.014	-0.299
		Edad	-0.41	0.046	-0.220					
SOD	0.124	Años profesión	-18.64	0.006	-0.302	N.S.				
		Tabaco	-222.7	0.040	-0.228					

\*El modelo se ha ajustado por las siguientes variables: edad, IMC, consumo de tabaco y alcohol (0: no; 1: sí), alelo B PON1 (0: ausente; 1: presente) y fenotipo inusual BeChE (0: no; 1: sí), años de exposición a plaguicidas, utilización de compuestos OP (0: no; 1: sí), utilización de medidas de protección personal (EPI) durante la preparación del caldo (0: no; 1: sí) o durante la fumigación (0: no; 1: sí); presencia de sintomatología clínica relacionada con la exposición crónica a plaguicidas (0: no; 1: sí), intoxicación previa por plaguicidas (0: no; 1: sí).

### 3. ENZIMAS PLASMÁTICAS

#### 3.1. Benzoilcolinesterasa (BeChE).

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad BeChE (U/l) de todos los individuos estudiados:



Los individuos expuestos presentan niveles significativamente más bajos de BeChE que los controles sólo en el periodo de menor exposición a plaguicidas (un 6.91% menos), según se muestra en la siguiente tabla:

## Prueba t de Student

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
BeChE (M-1)	Control	52	928,06	215,48	0.695
	Expuestos	106	940,86	180,02	
BeChE (M-2)	Control	39	894,87	175,54	0.050
	Expuestos	100	833,04	161,81	

Al ajustar por lugar de procedencia de los individuos se observan diferencias significativas en M-2, tal y como se expresa en la siguiente tabla:

## Anova 1 (Benzoilcolinesterasa U/l)

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
BeChE (M-1)	Control	52	928,06	215,48	0.593
	Granada	62	955,74	159,58	
	Almería	44	919,90	205,52	
	<i>Total</i>	<i>158</i>	<i>936,65</i>	<i>191,81</i>	
BeChE (M-2)	Control	39	894,87	175,54	0.002
	Granada	58	875,14	158,59	
	Almería	42	774,91	149,28	
	<i>Total</i>	<i>139</i>	<i>850,39</i>	<i>167,47</i>	

Las diferencias radican en que la BeChE de los fumigadores procedentes de Almería es significativamente más baja que los de Granada y controles ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la actividad BeChE a lo largo de los dos periodos del ciclo de fumigación se observan niveles significativamente más bajos en M-2, con un descenso de un 8.7%, según

se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
BeChE (M-1)	947,76	112	170,51	< 0.001
BeChE (M-2)	865,44	112	167,65	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente de 0.806 ( $p < 0.001$ ,  $n = 112$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control, también se observa un 3.6% de diferencia a lo largo del ciclo de fumigación ( $928.7 \text{ U/l} \pm 185.7$  en M-1 vs  $895.4 \text{ U/l} \pm 182.5$  en M-2,  $p = 0.021$ ,  $n = 36$ ), aunque no tan acusada como el 11% que presentan los individuos expuestos a plaguicidas ( $956.8 \text{ U/l} \pm 163.3$  en M-1 vs  $851.2 \text{ U/l} \pm 158.4$  en M-2,  $p < 0.001$ ,  $n = 76$ ).

Al efectuar la comparación por sexo se observan diferencias en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, pues las mujeres presentan niveles significativamente más bajos que los hombres, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
BeChE (M-1) hombre	129	964,43	174,78	< 0.001
BeChE (M-1) mujer	28	800,10	209,68	
BeChE (M-2) hombre	98	873,67	163,29	0.209
BeChE (M-2) mujer	21	823,64	170,88	

No se han observado diferencias significativas al comparar por existencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, antecedentes de intoxicación por compuestos anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, utilización de organofosforados o de carbamatos en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

Tampoco se han observado diferencias significativas en la BeChE al comparar por utilización de medidas de protección durante la preparación del caldo ni durante la fumigación.

El análisis de correlación simple de las esterasas plasmáticas entre sí no ha mostrado ninguna asociación significativa de la BeChE con las diferentes actividades enzimáticas plasmáticas o eritrocitarias en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Sin embargo, se ha observado una asociación directa con la ssPOasa e inversa con la CAT en M-2 (Tablas 3 y 4). Asimismo, se ha hallado una asociación directa con la edad y el IMC en los dos periodos del ciclo de fumigación (Tabla 5).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la BeChE como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenidos los siguientes resultados:

- BeChE (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.098,  $p < 0.001$ ,  $n = 122$  individuos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	14,016	,000	,325

- BeChE (M-2): R<sup>2</sup> ajustada: 0.137, p< 0.001, n = 104:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	12,170	,001	,330
Exposición	-128,118	,005	-,275
Sexo	-108,772	,050	-,195

Se observa que el IMC se asocia de forma directa al enzima, de forma que por cada unidad de aumento del IMC la actividad BeChE aumenta también 14 y 12 U/l en M-1 y M-2, respectivamente. Asimismo, se observa que las variables exposición y sexo muestran una asociación inversa, lo que indica que los individuos expuestos y las mujeres presentan una menor actividad BeChE en el periodo de menor exposición a plaguicidas (128 y 108 U/l, respectivamente).

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la BeChE, se observaron los siguientes resultados:

- BeChE (M-1): R<sup>2</sup> ajustada: 0.099, p= 0.003, n = 80

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	12,748	,003	,333

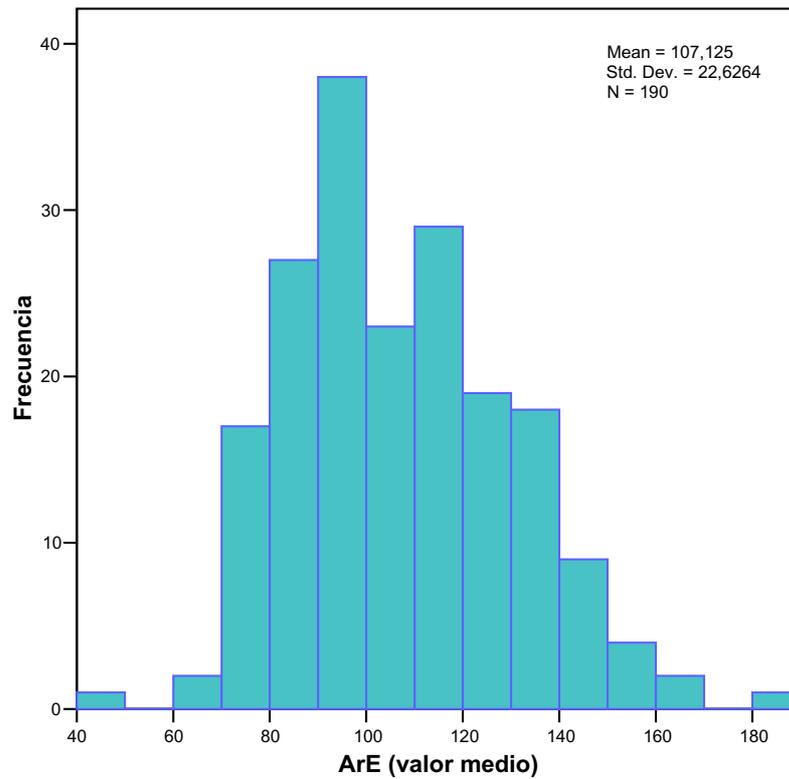
- BeChE (M-2): R<sup>2</sup> ajustada: 0.063, p= 0.024, n = 65

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	9,683	,024	,279

Ahora se observa que el IMC es la única variable asociada con la BeChE en ambos periodos del ciclo de fumigación. Ello significa que por cada unidad de aumento del IMC la actividad BeChE aumenta 12 y 9 U/l en M-1 y M-2, respectivamente.

### 3.2. Arilesterasa (ArE)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad ArE (kU/l) de todos los individuos estudiados:



No se observan diferencias significativas en la actividad ArE entre controles y expuestos en ninguno de los dos momentos del ciclo de fumigación estudiados, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (Ariesterasa, kU/l)**

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
ArE (M-1) Control	52	110,72	20,82	0.100
Expuestos	115	104,22	24,62	
ArE (M-2) Control	39	108,36	19,61	0.754
Expuestos	102	107,04	23,28	

Sin embargo, al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos, se observan diferencias significativas en M-1. Las diferencias obedecen a que los fumigadores de Granada presentan niveles más bajos de ArE en comparación a los otros dos grupos ( $p=0.058$  en el test de Newman-Keuls:  $p=0.058$ ).

**Anova 1 (Ariesterasa, kU/l)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
ArE (M-1)	Control	52	110,72	20,82	0.048
	Granada	62	100,51	20,02	
	Almería	53	108,57	28,69	
	<i>Total</i>	167	106,25	23,64	
Are (M-2)	Control	39	108,36	19,61	0.311
	Granada	60	109,81	21,24	
	Almería	42	103,08	25,66	
	<i>Total</i>	141	107,40	22,26	

Al comparar la actividad ArE de dos los periodos del ciclo de fumigación se observan diferencias significativas, según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
ArE (M-1)	104,33	118	22,04	0.016
ArE (M-2)	108,09	118	21,90	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.713 ( $p < 0.001$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control, no se observan diferencias a lo largo del ciclo de fumigación ( $110.8 \text{ kU/l} \pm 19.2$  en M-1 vs.  $107.7 \text{ kU/l} \pm 19.8$  en M-2,  $p = 0.199$ ,  $n = 36$ ). Por el contrario, los individuos expuestos a plaguicidas sí presentan diferencias significativas ( $101.5 \pm 22.7$  en M-1 vs  $108.3 \pm 22.9$  en M-2,  $p < 0.001$ ,  $n = 82$ ), mostrando una actividad ArE un 6.3% más baja en el periodo de mayor exposición a plaguicidas.

La ArE no muestra diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación al comparar por sexo, presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, antecedentes de intoxicación por estos agentes, intoxicación por compuestos anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, utilización de organofosforados o de carbamatos.

Al comparar la ArE por utilización de medidas de protección durante la preparación del caldo se observan indicios de significación estadística en M-2, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t Student**

	Protecc. durante caldo	N	Media	Desv. típ.	P
ArE (M-1)	Sí	37	106,22	21,93	0.323
	No	61	101,51	23,29	
ArE (M-2)	Sí	33	112,82	23,42	0.085
	No	60	104,41	21,61	

Finalmente, al comparar por utilización de medidas de protección durante la fumigación no se observan diferencias significativas.

El análisis de correlación simple muestra que la ArE se asocia de forma directa y significativa con la DZOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Con respecto a las enzimas eritrocitarias muestra una asociación directa con la SOD en M-1 e inversa con la GPx en M-2 (Tablas 3 y 4).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la ArE variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- ArE (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.054,  $p < 0.004$ ,  $n = 131$  individuos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación Parcial
Alelo B (PON1)	-11,981	,004	-,247

- ArE (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.121,  $p < 0.001$ ,  $n = 106$  individuos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-15,947	,000	-,359

Se aprecia que, en los dos periodos del ciclo de fumigación, los individuos portadores del alelo B de la PON1 (esto es, los que presentan fenotipo BB o AB) muestran, respectivamente, 11 y 15 kU/l menos de actividad ArE en comparación a los individuos que no presentan el alelo B (es decir, con fenotipo AA).

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la ArE, se observaron los siguientes resultados:

- ArE (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.129,  $p=0.003$ ,  $n=83$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-12,029	,015	-,268
Alcohol	13,849	,019	,260
Edad	-,590	,030	-,241

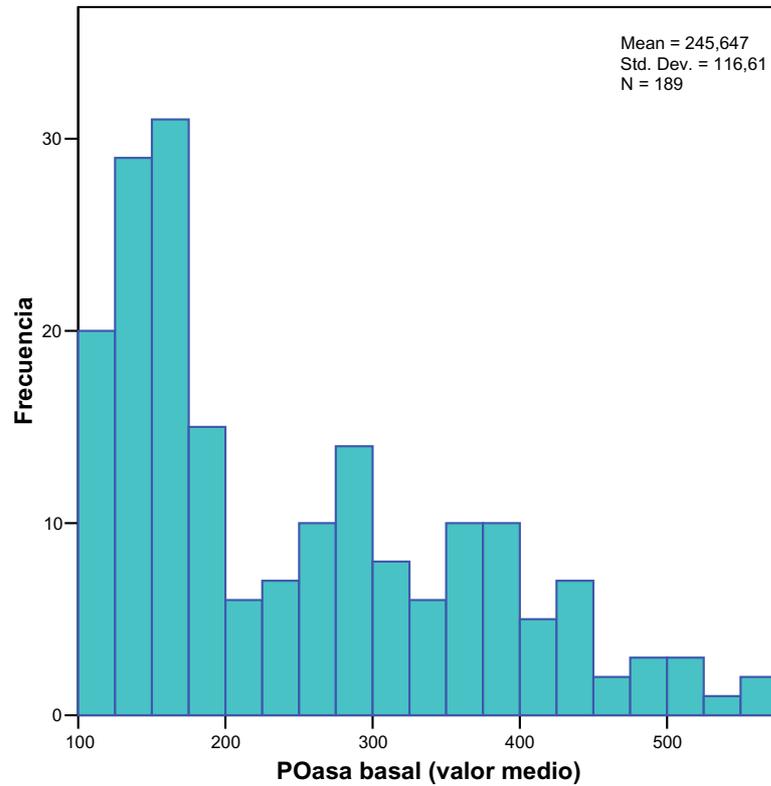
- ArE (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.229,  $p<0.001$ ,  $n=67$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-18,794	,000	-,435
Alcohol	15,561	,007	,327

Se observa que, en los dos periodos del ciclo de fumigación, la ArE se asocia de forma inversa con el alelo B de la PON1 y de forma directa con el consumo de alcohol. Por tanto, los portadores del alelo B de PON1 muestran menos actividad ArE y aquellos que consumen alcohol presentan unas 13 kU/l más con relación a los que no consumen. Por su parte, la edad se asocia de forma inversa con la ArE en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, de manera que por cada año de edad más que se tenga, la actividad ArE disminuye en 0.59 kU/l.

### 3.3. Paraoxonasa basal (POasa)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad POasa basal (U/l) de todos los individuos estudiados:



Al comparar la actividad paraoxonasa de los individuos expuestos con la del grupo control no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (Paraoxonasa, U/I)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
POasa (M-1)	Control	50	262,94	125,57	0.900
	Expuestos	112	260,29	122,75	
POasa (M-2)	Control	39	238,20	114,00	0.319
	Expuestos	102	217,65	107,18	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos, tampoco se observan diferencias significativas.

Al comparar la actividad POasa de los dos periodos del ciclo de fumigación, se observan diferencias significativas ya que la actividad es un 10.7% más alta en el de mayor exposición (M-1), tal y como se puede ver en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
POasa (M-1)	258,591	114	122,8992	< 0.001
POasa (M-2)	221,443	114	109,6960	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.943 ( $p < 0.001$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control, se observan diferencias significativas a lo largo del ciclo de fumigación (270.1 U/l  $\pm$  129.6 en M-1 vs. 239.9 U/l  $\pm$  118.1 en M-2,  $p = 0.002$ ,  $n = 35$ ), mostrando un 11.2% más actividad en M-1. Los individuos expuestos a plaguicidas también presentan diferencias significativas (253.5 U/l  $\pm$  120.3 en M-1 vs. 213.3 U/l  $\pm$  105.5 en M-2,  $p < 0.001$ ,  $n = 79$ ), aunque algo más acentuadas pues su actividad POasa es un 15.8% mayor en M-1.

La POasa no muestra diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación al comparar por sexo, presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, utilización de organofosforados o de carbamatos.

Asimismo, la utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación tampoco muestra diferencias significativas en la POasa.

El análisis de correlación simple muestra una asociación directa entre la POasa y la ssPOasa e inversa con la DZOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tablas 3 y 4).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la POasa como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. Dado que la POasa no sigue una distribución normal, los datos se transformaron logarítmicamente para poder realizar correctamente el análisis multivariante; no obstante, y como los resultados obtenidos eran los mismos que sin transformar, se han dejado finalmente éstos últimos por ser más inteligibles. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- POasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.423,  $p < 0.001$ ,  $n = 131$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	159,8	,000	,654

- POasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.297,  $p < 0.001$ ,  $n = 106$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	120,9	,000	,551

Se puede ver que la única variable asociada a la POasa en los dos periodos del ciclo de fumigación es el ser portador del alelo B de PON1, de manera que aquellos individuos que lo presentan muestran, respectivamente, 159 y 120 U/l de actividad POasa más en comparación a los que no presentan dicho alelo.

En un segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la POasa, se observaron los siguientes resultados:

- POasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.429,  $p < 0.001$ ,  $n = 83$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	153,302	,000	,638
Protección durante caldo	61,869	,004	,312

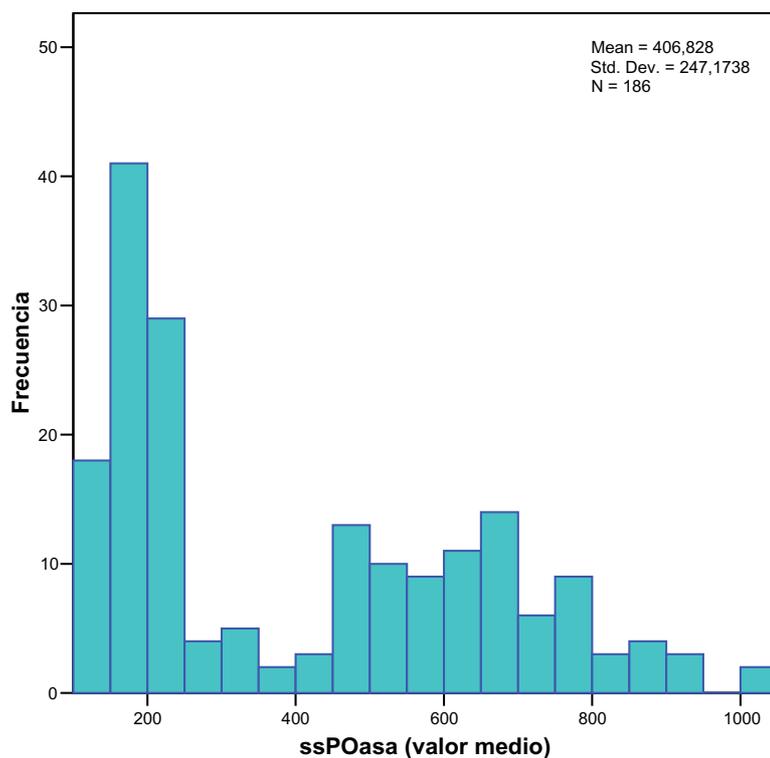
- POasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.267,  $p < 0.001$ ,  $n = 67$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	113,2	,000	,527

Se puede ver que el alelo B de la PON1 predice de forma independiente la actividad POasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, de manera que los individuos portadores del mismo presentan, respectivamente, 153 y 113 U/l más que los que no lo presentan. Además, la utilización de medidas de protección durante la preparación del caldo muestra también una asociación directa con la POasa en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, en el sentido de que aquellos individuos que adoptan tales medidas presentan por término medio 61 U/l más de actividad POasa.

### 3.4. Paraoxonasa salina (ssPOasa)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad POasa salina (U/l) de todos los individuos estudiados:



Al comparar la actividad paraoxonasa salina de los individuos expuestos con la del grupo control no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. A pesar de ello, y al igual que ocurría con la POasa basal, los expuestos (fumigadores) presentan niveles más bajos tal y como se muestra en la siguiente tabla:

#### Prueba t de Student

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
ssPOasa (M-1)	Control	51	435,38	259,54	0.332
	Expuestos	115	393,72	252,09	
ssPOasa (M-2)	Control	39	452,82	273,98	0.174
	Expuestos	99	384,83	226,56	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos, tampoco se observan diferencias significativas.

A diferencia de lo que ocurría con la POasa basal, no se observan diferencias significativas al comparar la ssPOasa de M-1 con la de M-2, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
ssPOasa (M-1)	399,73	118	250,86	0.422
ssPOasa (M-2)	406,56	118	242,89	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.931 ( $p < 0.001$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control y efectuar la comparación a lo largo del ciclo de fumigación no se observan diferencias significativas ( $449.3 \text{ U/l} \pm 263.7$  en M-1 vs.  $460.5 \text{ U/l} \pm 277.6$  en M-2,  $p = 0.556$ ,  $n = 36$ ). Los individuos expuestos a plaguicidas tampoco muestran diferencias significativas ( $378.0 \text{ U/l} \pm 243.5$  en M-1 vs.  $382.9 \text{ U/l} \pm 223.7$  en M-2,  $p = 0.588$ ,  $n = 82$ ), aunque sus valores son claramente más bajos que los del grupo control.

La ssPOasa no muestra diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación al comparar por sexo, presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos (aunque existen indicios de significación en M-1, pues los intoxicados presentan niveles más altos que los no intoxicados  $482.5 \text{ U/l}$  vs.  $380.4$ ,  $p = 0.093$ ,

respectivamente), utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, utilización de organofosforados o de carbamatos.

La utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación tampoco muestra diferencias significativas en la actividad ssPOasa.

Según el análisis de correlación simple, la ssPOasa se asocia de forma directa con la POasa e inversa con la DZOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tablas 3 y 4). No se ha hallado asociación con ninguna de las enzimas eritrocitarias.

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la ssPOasa como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. Dado que la ssPOasa no sigue una distribución normal, los datos se transformaron logarítmicamente para poder realizar correctamente el análisis multivariante; no obstante, y como los resultados obtenidos eran los mismos que sin transformar, se han dejado finalmente éstos últimos por ser más inteligibles. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- ssPOasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.659,  $p < 0.001$ ,  $n = 131$

	B	Sig.	Correlación Parcial
Alelo B (PON1)	413,7	,000	,814

- ssPOasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.554,  $p < 0.001$ ,  $n = 106$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	361,3	,000	,747

Por tanto, la única variable asociada a la ssPOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación es, al igual que ocurría con la POasa, el ser portador del alelo B de PON1. Es decir, los individuos portadores de dicho alelo muestran, respectivamente, 413 y 361 U/l más que los que no lo presentan.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la ssPOasa, se observaron los siguientes resultados:

- ssPOasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.686,  $p < 0.001$ ,  $n = 83$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	413,0	,000	,829
Protección durante caldo	98,0	,003	,327
Intoxicación previa por plaguicidas	78,3	,022	,255

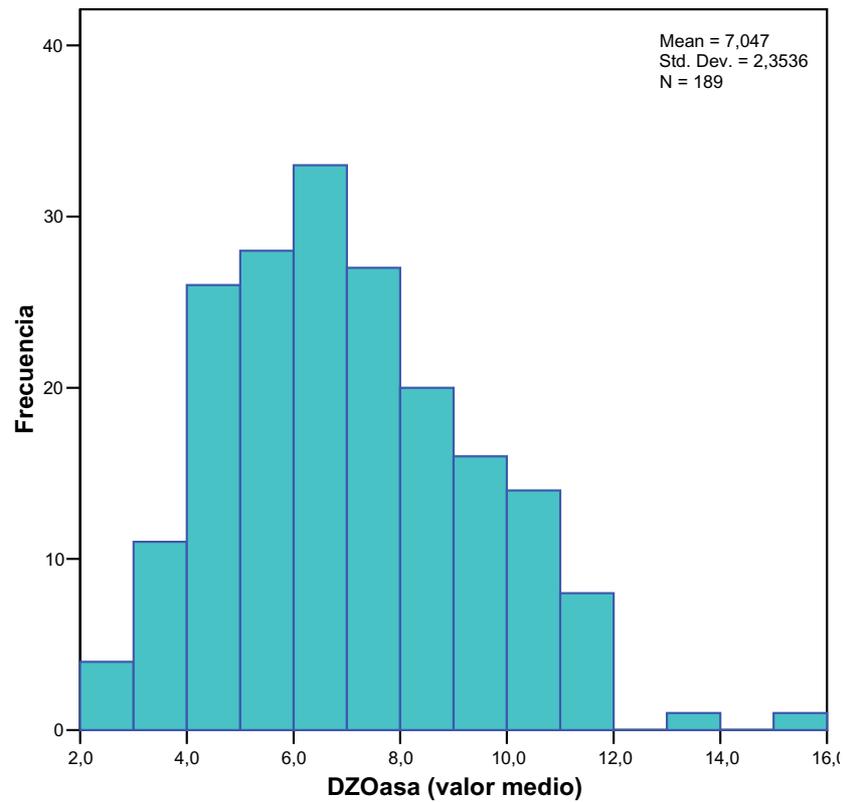
- ssPOasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.600,  $p < 0.001$ ,  $n = 67$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	344,1	,000	,778

El alelo B de la PON1 se asocia de forma directa con la actividad ssPOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, en el sentido de que los portadores del mismo muestran, respectivamente, 413 y 344 U/l más que los que no lo presentan. Además, la adopción de medidas de protección durante la preparación del cado y el haber sufrido una intoxicación previa por plaguicidas se asocian también de forma directa con la ssPOasa en el periodo de mayor exposición (M-1), lo que significa que los individuos que adoptan tales medidas muestran 98 U/l más de actividad ssPOasa con respecto a los que no lo hacen y que aquellos individuos con antecedentes de intoxicación por plaguicidas presentan una ssPOasa 78 U/l mayor que aquellos otros que no han sufrido nunca ninguna intoxicación..

### 3.5. Diazoxonasa (DZOasa)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad DZOasa (U/l) de todos los individuos estudiados:



Al comparar la actividad DZOasa de los individuos expuestos con la del grupo control se observan diferencias significativas en el periodo de menor exposición a plaguicidas, en el sentido de que los expuestos presentan niveles más bajos según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t Student (Diazoxonasa, U/I)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
DZOasa (M-1)	Control	51	7,20	2,38	0.967
	Expuestos	114	7,18	2,65	
DZOasa (M-2)	Control	38	7,44	1,91	0.043
	Expuestos	102	6,62	2,19	

Al comparar la DZOasa por el lugar de procedencia de los individuos, no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos periodos estudiados.

Al efectuar la comparación de la DZOasa en M-1 con la de M-2 no se observan diferencias significativas, según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
DZOasa (M-1)	7,12	116	2,48	0.127
DZOasa (M-2)	6,88	116	2,05	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.739 ( $p < 0.001$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control y comparar su actividad DZOasa de los dos periodos del ciclo de fumigación entre sí, se observan indicios de significación estadística ( $7.08 \text{ U/l} \pm 2.32$  en M-1 vs.  $7.50 \text{ U/l} \pm 1.94$  en M-2,  $p = 0.086$ ,  $n = 35$ ). Los individuos expuestos a plaguicidas, por el contrario, sí presentan diferencias significativas ( $7.13 \text{ U/l} \pm 2.56$  en M-1 vs.  $6.60 \text{ U/l} \pm 2.05$  en M-2,  $p = 0.007$ ,  $n = 81$ ).

La DZOasa no muestra diferencias significativas en ninguno de los dos periodos estudiados al comparar por sexo, presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos o utilización de plaguicidas organofosforados. Sin embargo, se observan diferencias significativas al comparar por utilización de carbamatos y de plaguicidas anticolinesterásicos, en el periodo de menor exposición tal y como se muestra en las siguientes tablas:

**Prueba t de Student**

Utilización de Carbamatos		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
DZOasa (M-1)	No	13	7,36	2,91	0.879
	Sí	88	7,24	2,66	
DZOasa (M-2)	No	14	8,10	2,29	0.016
	Sí	76	6,61	2,05	

**Prueba t de Student**

Usa plaguicida anti-ChE		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
DZOasa (M-1)	No	14	7,27	2,79	0.965
	Sí	90	7,24	2,65	
DZOasa (M-2)	No	15	7,89	2,29	0.038
	Sí	77	6,64	2,06	

La significación obtenida al comparar por utilización de plaguicidas anticolinesterásicos puede explicarse por la existente al comparar por utilización de carbamatos, en el sentido de que los expuestos a estos productos presentan niveles más bajos de DZOasa.

La utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación no muestra diferencias significativas en la DZOasa.

El análisis de correlación simple muestra que la DZOasa se asocia de forma directa con la ArE y de forma inversa con la POasa y ssPOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Respecto a las enzimas eritrocitarias, se ha hallado una asociación inversa con la GR en M-1 y con la GPx en M-2 (Tablas 3 y 4).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la DZOasa como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- DZOasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.205,  $p < 0.001$ ,  $n = 129$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-2,45	,000	-,459

- DZOasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.265,  $p < 0.001$ ,  $n = 105$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-1,94	,000	-,495
Exposición	-1,09	,005	-,275
Alcohol	,91	,017	,236

Al igual que ocurría con la POasa y ssPOasa, la única variable asociada con la DZOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación es el ser portador del alelo B de PON1. Pero en este caso, los individuos portadores del mismo presentan, respectivamente, 2.45 y 1.94 U/l menos de actividad que los no portadores. Además, en M-2 la exposición a plaguicidas predice de forma significativa e independiente una menor actividad DZOasa, de manera que los individuos expuestos (fumigadores) tienen por término medio 1.09 U/l de actividad enzimática con respecto a los controles. Finalmente, el consumo de alcohol se asocia de forma directa con dicha actividad, pues los que lo consumen muestran 0.91 U/l menos de DZOasa que los que no lo hacen.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la DZOasa, se observaron los siguientes resultados:

- DZOasa (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.214,  $p < 0.001$ ,  $n = 82$

	B	Sig.	Correlación Parcial
Alelo B (PON1)	-2,59	,000	-,473

- DZOasa (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.291,  $p < 0.001$ ,  $n = 67$

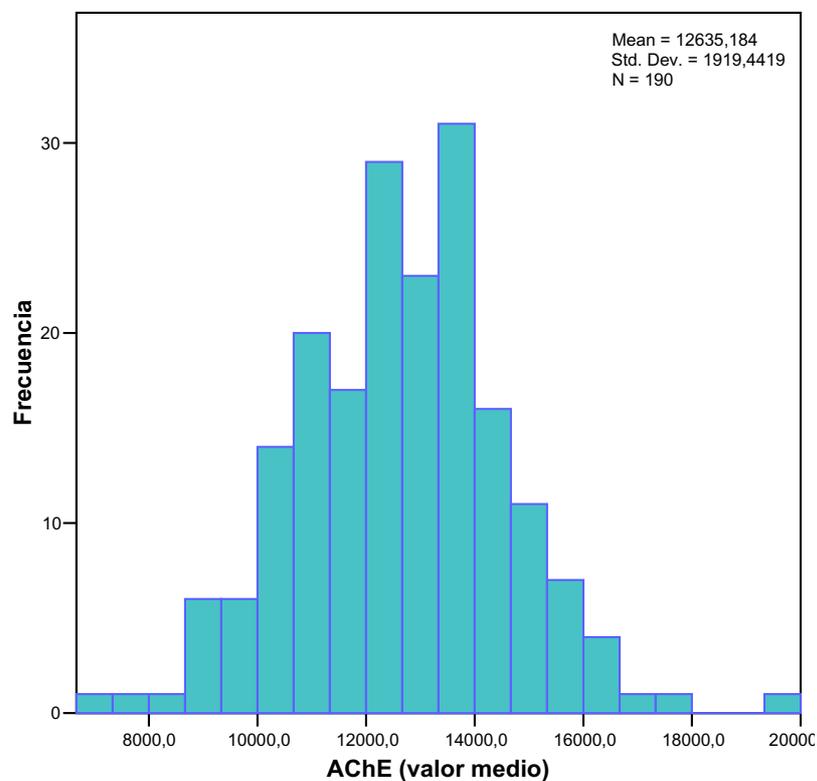
	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Alelo B (PON1)	-2,08	,000	-,524
Alcohol	1,19	,018	,291

El alelo B de la PON1 predice de nuevo una menor actividad DZOasa en los dos periodos del ciclo de fumigación, pues los individuos portadores del mismo muestran, respectivamente, 2.59 y 2.08 U/l menos de actividad enzimática que los que no presentan dicho alelo. Además, el consumo de alcohol se asocia de forma directa con la DZOasa en el periodo de menor exposición a plaguicidas y prácticamente también en el de mayor exposición ( $p = 0.060$ ), lo que significa que los que consumen alcohol tienen 1.19 U/l más de actividad DZOasa que los que no lo hacen.

## 4. ENZIMAS ERITROCITARIAS

### 4.1. Acetilcolinesterasa (AChE).

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad AChE (U/hematocrito) de todos los individuos estudiados:



Se observan diferencias significativas entre controles y expuestos sólo en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (M-1), en el sentido de que los expuestos a estos agentes

presentan niveles de AChE significativamente más bajos que los controles (un 14.5 %), según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (AChE, U/Hematocrito)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	Control	53	13408	2022	< 0.001
	Expuestos	115	11464	2439	
AChE (M-2)	Control	39	13823	2614	0.111
	Expuestos	101	13178	1923	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se detectan diferencias significativas en M-1 e indicios de significación en M-2, según se puede ver en la siguiente tabla:

**Anova 1 (AChE, U/Hematocrito)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	Control	53	13408	2022	0.012
	Granada	62	10001	1409	
	Almería	53	13176	2273	
	<i>Total</i>	168	12077	2481	
AChE (M-2)	Control	39	13823	2614	0.060
	Granada	59	13942	1843	
	Almería	42	12104	1480	
	<i>Total</i>	140	13358	2147	

Los individuos de Granada presentan una AChE significativamente más baja que los de Almería y los controles en el periodo de mayor exposición a plaguicidas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el periodo de menor exposición (M-2) existen indicios de significación pues los fumigadores de Almería presentan una actividad AChE significativamente más baja que los de Granada y los controles ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la AChE de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados se observan diferencias significativas, siendo más baja en el periodo de mayor exposición según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	11760	118	2535	< 0.001
AChE (M-2)	13636	118	2090	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.187 ( $p = 0.043$ ). Al seleccionar sólo los controles y comparar la AChE de M-1 con la de M-2 no se observan diferencias significativas ( $p = 0.724$ ). Por el contrario, al seleccionar sólo los individuos expuestos a plaguicidas la AChE muestra niveles significativamente más bajos en M-1, que es el periodo de mayor exposición a estos compuestos (10764 U/hematocrito  $\pm$  2245, vs. 13560 U/hematocrito  $\pm$  1769;  $p < 0.001$ ,  $n = 81$ ).

Al efectuar la comparación por sexo se observa que los hombres presentan niveles de AChE significativamente más bajos que las mujeres en el periodo de mayor exposición, según se expresa en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	hombre	137	11766	2542	< 0.001
	mujer	30	13385	1581	
AChE (M-2)	hombre	99	13729	2070	0.341
	mujer	21	13252	2097	

No se observan diferencias significativas en la AChE al comparar por presencia de síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas, aunque existen indicios en el periodo de menor exposición:

**Prueba t de Student**

	Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	No	83	11592	2368	0.197
	Sí	27	10894	2623	
AChE (M-2)	No	76	13348	2071	0.056
	Sí	24	12654	1303	

No se observan diferencias significativas en la AChE en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados al comparar por intoxicación previa por plaguicidas, por agentes anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, o utilización de carbamatos. Sin embargo, sí se han detectado diferencias significativas al comparar las AChE por utilización de organofosforados, pues los fumigadores que utilizan estos productos presentan niveles más bajos de AChE en el periodo de mayor exposición (M-1):

**Prueba t de Student**

	Utilización de OPs	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	No	61	12025	2420	< 0.001
	Sí	41	10109	1773	
AChE (M-2)	No	48	13319	1621	0.502
	Sí	41	13567	1845	

Al efectuar la comparación por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo no se observan diferencias significativas en la AChE, pero sí indicios en M-2:

**Prueba t de Student**

	Protecc. durante caldo	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	Sí	37	10983	2132	0.690
	No	61	11178	2448	
AChE (M-2)	Sí	32	13696	1488	0.078
	No	60	13025	2084	

Por el contrario, al comparar por utilización de medidas de protección personal durante la fumigación se observan diferencias en M-2, pues la AChE de los individuos que adoptan dichas medidas es significativamente más baja que la de aquellos que no hacen uso de las mismas, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	Protecc. durante fumig.	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
AChE (M-1)	Sí	74	11232	2409	0.301
	No	24	10708	2037	
AChE (M-2)	Sí	73	13029	1870	0.024
	No	19	14141	1884	

Según el análisis de correlación simple la AChE se asocia de forma directa con la CAT y SOD y de forma inversa con la GPx en el momento de mayor exposición a plaguicidas (M-1). Sin embargo, en M-2 muestra una asociación inversa con la CAT y SOD (tablas 3 y 4). Asimismo, la AChE muestra una asociación inversa con el IMC en M-1 y directa con el IMC y la edad en M-2 (Tabla 5).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la AChE como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- AChE (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.206,  $p < 0.001$ , 136 casos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Exposición	-2636,191	,000	-,455
Edad	-50,773	,021	-,199

- AChE (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.069,  $p = 0.008$ , 110 casos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Tabaco	983,183	,013	,238
Edad	46,752	,049	,189

De forma llamativa se observa que, en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, los individuos expuestos a estos compuestos presentan por término medio 2636 U/hematocrito de AChE menos que los no expuestos (controles). Asimismo, la edad se asocia con la AChE aunque en sentido distinto según el periodo del ciclo de fumigación. En M-1, por cada año de edad la actividad AChE disminuye en 50 U/hematocrito mientras que en M-2 aumenta en 46. También se ha observado que los individuos que consumen tabaco presentan por término medio 983 U/hematocrito más de actividad en M-2 con relación a los que no lo consumen.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la AChE, se observaron los siguientes resultados:

- AChE (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.119,  $p=0.001$ , 83 casos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación Parcial
Utilización de OPs	-1590,9	,001	-,361

Es decir, los fumigadores que utilizan OPs presentan, en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, 1590 U/hematocrito menos de AChE en relación a aquellos otros que no los utilizan. Hay que destacar que la variable síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas ha quedado al borde de ser incluida en el modelo ( $p=0.056$ ). Dicha variable se asocia también de forma inversa a la AChE, lo que significa que los fumigadores que presentan sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas muestran menos actividad AChE que los que no la presentan..

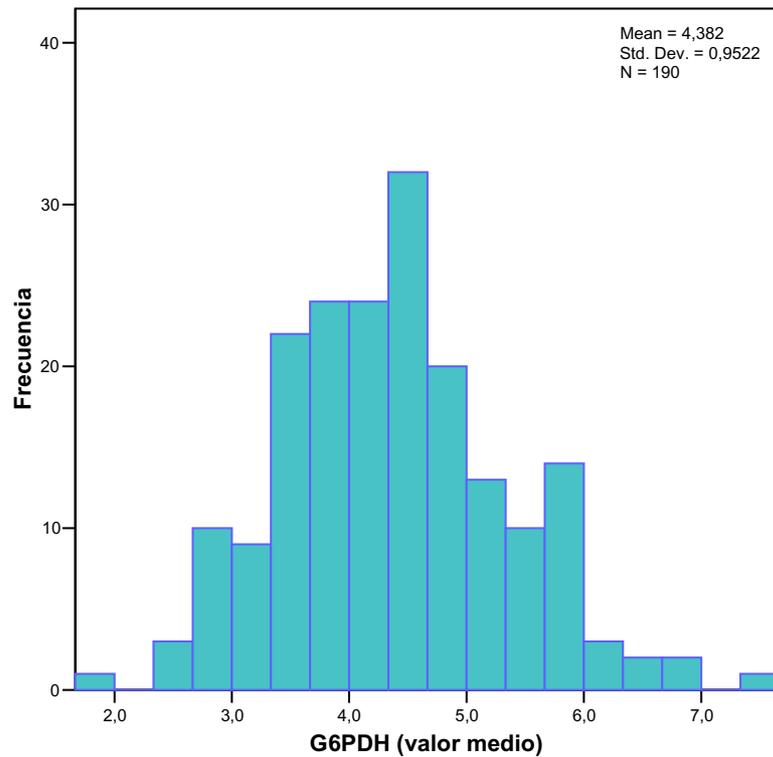
- AChE (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.250,  $p < 0.001$ , 66 casos incluidos en el análisis:

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Tabaco	1359,7	,001	,409
Años profesión	61,4	,004	,358
Alelo B PON1	-890,4	,026	-,278

En este caso, las variables “síntomas relacionados con plaguicidas” y “utilización de OPs” quedaron al borde de ser incluidas en el modelo ( $p = 0.080$  y  $0.077$ , respectivamente), mostrando una asociación inversa con la AChE. Resulta bastante significativo que los individuos portadores del alelo B de PON1 muestran niveles significativamente más bajos de AChE (890 U/hematocrito menos) que los que no presentan dicho alelo y que, por cada año trabajando como aplicador de plaguicidas, la AChE aumenta en algo más de 61 U/hematocrito.

#### 4.2. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad G6PDH (U/g Hb) de todos los individuos estudiados:



Se observan diferencias significativas entre controles y expuestos en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (M-1), pues los expuestos presentan niveles de G6PDH significativamente más altos que los controles (un 14 %), según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (G6PDH, U/g Hb)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
G6PDH (M-1)	Control	53	4,29	1,00	0.001
	Expuestos	115	4,89	1,18	
G6PDH (M-2)	Control	38	3,75	,88	0.107
	Expuestos	102	4,08	1,11	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se observan diferencias significativas en M-1:

**Anova 1 (G6PDH, U/g Hb)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
G6PDH (M-1)	Control	53	4,29	1,00	0.001
	Granada	62	4,68	1,34	
	Almería	53	5,13	,90	
	<i>Total</i>	<i>168</i>	<i>4,70</i>	<i>1,16</i>	
G6PDH (M-2)	Control	38	3,75	,88	0.061
	Granada	60	3,93	1,07	
	Almería	42	4,29	1,14	
	<i>Total</i>	<i>140</i>	<i>3,99</i>	<i>1,06</i>	

Dichas diferencias obedecen a que los fumigadores de Almería presentan niveles de G6PDH significativamente más altos que los de Granada y controles ( $p < 0.05$ ). Los fumigadores de Granada, por su parte, presentan niveles superiores a los de los controles, aunque las diferencias se sitúan al límite de la significación estadística ( $p = 0.062$ ). Por el contrario, en el periodo de menor exposición a plaguicidas, sólo se observan indicios de significación, ya que la G6PDH de los controles es ligeramente inferior a la de los dos grupos de fumigadores ( $p = 0.098$ , test Student-Neuman-Keuls).

Al comparar la actividad G6PDH de los dos periodos del ciclo de fumigación entre sí se observan diferencias significativas, pues es más alta en el periodo de mayor exposición (M-1) según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
G6PDH (M-1)	4,75	118	1,22	< 0.001
G6PDH (M-2)	3,99	118	1,09	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.273 (p= 0.003). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control y comparar la G6PDH a lo largo del ciclo de fumigación, se observan diferencias significativas (4.48 U/g Hb  $\pm$  1.05 en M-1 vs. 3.74 U/g Hb  $\pm$  0.89 en M-2, p= 0.002, n= 34). Los individuos expuestos a plaguicidas también presentan diferencias significativas (4.87 U/g Hb  $\pm$  1.27 en M-1 vs. 4.10 U/g Hb  $\pm$  1.15 en M-2, p< 0.001, n= 82). En ambos casos se observan niveles más altos en el periodo de mayor exposición, un 16.5% en controles y un 15.8% en los expuestos.

En la comparación por sexo se observa que los hombres presentan niveles de G6PDH significativamente más altos que las mujeres en los dos periodos del ciclo de fumigación, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
G6PDH (M-1) hombre	137	4,81	1,18	0.014
mujer	30	4,24	0,96	
G6PDH (M-2) hombre	99	4,13	1,09	0.001
mujer	21	3,32	0,77	

Por el contrario, no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados al comparar la G6PDH por presencia de síntomas

relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, antecedentes de intoxicación previa por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos, utilización de organofosforados o de carbamatos.

Al efectuar la comparación de la G6PDH por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo no se observan diferencias significativas. Sin embargo, sí las hay al comparar por utilización de medidas de protección durante la fumigación en el periodo de mayor exposición, pues los individuos que no se protegen presentan niveles de G6PDH significativamente más bajos con respecto a los que sí lo hacen, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	Protecc. durante fumig.	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
G6PDH (M-1)	Sí	74	5,07	1,27	0.021
	No	24	4,41	0.90	
G6PDH (M-2)	Sí	74	4,12	1,02	0.171
	No	19	3,74	1,26	

El análisis de correlación simple muestra una asociación directa entre la G6PDH y GR, CAT y SOD en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Sin embargo, en M-2 sólo presenta una asociación directa con la SOD (Tablas 3 y 4).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la G6PDH como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenidos los siguientes resultados:

- G6PDH (M-1): No se ha obtenido ningún modelo significativo,  $n = 105$
- G6PDH (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.126,  $p < 0.001$ ,  $n = 105$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Sexo	-,903	,001	-,319
Edad	-2,53E-02	,038	-,204

Se observa que tanto el sexo como la edad se asocian de forma inversa con la actividad G6PDH en el periodo de menor exposición a plaguicidas. Así, las mujeres muestran 0.903 U/g Hb menos que los hombres y por cada año que pasa la actividad disminuye en 0.0253 U/g Hb.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la G6PDH se obtuvieron los siguientes resultados:

- G6PDH (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.037,  $p = 0.045$ ,  $n = 83$

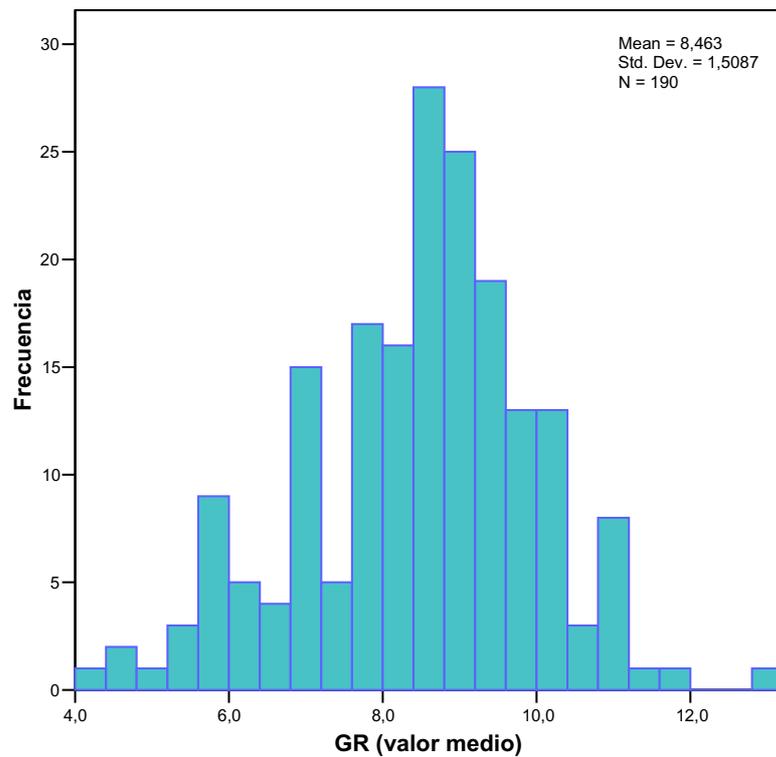
	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Protección durante fumigación	,595	,045	,220

- G6PDH (M-2): No se obtiene ningún modelo significativo,  $n = 67$

El análisis multivariante confirma el resultado preliminar de que aquellos individuos que utilizan medidas de protección durante el proceso de fumigación presentan niveles significativamente más altos de G6PDH (0.595 U/g Hb más con respecto a los que no se protegen) en el periodo de mayor exposición a plaguicidas.

#### **4.3. Glutation reductasa (GR)**

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad GR (U/g Hb) de todos los individuos estudiados:



Se observan diferencias significativas en la actividad GR entre controles y expuestos en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, en el sentido de que los individuos expuestos a plaguicidas presentan niveles significativamente más bajos que los controles según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (GR, U/g Hb)**

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
GR (M-1) Control	53	9,03	2,05	0.046
Expuestos	115	8,41	1,77	
GR (M-2) Control	39	8,93	1,14	0.011
Expuestos	101	8,31	1,33	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se detectan diferencias significativas sólo en el periodo de menor exposición a plaguicidas, según se muestra en la siguiente tabla:

**Anova 1 (GR, U/g Hb)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
GR (M-1)	Control	53	9,03	2,05	0.133
	Granada	62	8,45	1,87	
	Almería	53	8,36	1,65	
	<i>Total</i>	<i>168</i>	<i>8,60</i>	<i>1,88</i>	
GR (M-2)	Control	39	8,93	1,14	0.009
	Granada	59	8,12	1,21	
	Almería	42	8,57	1,45	
	<i>Total</i>	<i>140</i>	<i>8,48</i>	<i>1,30</i>	

En la comparación por subgrupos se observa que los expuestos a plaguicidas (Granada y Almería) presentan niveles más bajos de GR que los controles en M-2 ( $p < 0.05$ , test Student-Neuman-Keuls).

Al comparar la actividad GR de los dos periodos del ciclo de fumigación entre sí se observan diferencias significativas, siendo más alta en el periodo de mayor exposición a plaguicidas según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
GR (M-1)	8,98	118	1,80	< 0.001
GR (M-2)	8,39	118	1,26	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.388 ( $p < 0.001$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control también se observan diferencias a lo largo del ciclo de fumigación ( $9.85 \text{ U/g Hb} \pm 1.53$  en M-1 vs.  $8.99 \text{ U/g Hb} \pm 1.12$  en M-2,  $p = 0.002$ ,  $n = 37$ ). Los individuos expuestos a plaguicidas, asimismo, presentan diferencias significativas ( $8.58 \text{ U/g Hb} \pm 1.78$  en M-1 vs.  $8.11 \text{ U/g Hb} \pm 1.23$  en M-2,  $p = 0.025$ ,  $n = 81$ ), aunque éstas son menos acusadas (8.7 y 5.5% respectivamente).

Al efectuar la comparación por sexo se observa que los hombres presentan niveles significativamente más bajos que las mujeres en el periodo de menor exposición a plaguicidas según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
GR (M-1)	hombre	137	8,56	1,89	0.617
	mujer	30	8,75	1,84	
GR (M-2)	hombre	99	8,25	1,27	0.017
	mujer	21	8,96	1,00	

Por el contrario, la GR no muestra diferencias significativas al comparar por presencia de síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas, antecedentes de intoxicación por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos o utilización de carbamatos. Sin embargo, sí se han observado diferencias significativas al comparar por utilización de plaguicidas organofosforados en M-2, pues los individuos que manejan estos productos presentan niveles más bajos con respecto a los que no los manejan ( $7.93 \text{ U/g Hb} \pm 1.24$  vs.  $8.54 \text{ U/g Hb} \pm 1.26$ , respectivamente,  $p = 0.025$ ).

Al comparar por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación no se observan diferencias significativas.

El análisis de correlación simple muestra una asociación directa de la GR con la G6PDH, CAT, GPx y SOD; así como una asociación inversa con la DZOasa en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Por el contrario, en el periodo de menor exposición sólo presenta una asociación directa con la GPx e inversa con el IMC (Tablas 3-5).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la GR como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- GR (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.115,  $p < 0.001$ ,  $n = 131$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Exposición	-1,49	,000	-,349

- GR (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.106,  $p < 0.001$ ,  $n = 105$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Exposición	-,93	,000	-,338

Se observa que la exposición a plaguicidas predice de forma independiente niveles más bajos de GR en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, de manera que los individuos expuestos (fumigadores) muestran, respectivamente, 1.49 y 0.93 U/g Hb menos de actividad GR que los controles.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la GR, se obtuvieron los siguientes resultados:

- GR (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.087,  $p=0.010$ ,  $n=83$

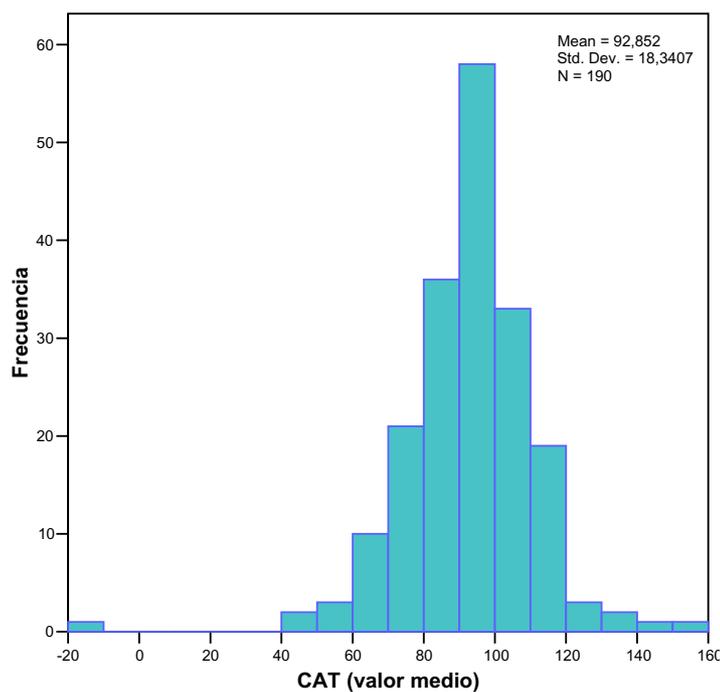
	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Tabaco	-,967	,010	-,282
Alelo B (PON1)	,761	,042	,225

- GR (M-2): No se obtiene ningún modelo significativo,  $n=66$ .

Ahora se observa que los fumigadores que consumen alcohol muestran una actividad enzimática 0.967 U/g Hb menor que los que no fuman y, además, que los fumigadores portadores del alelo B de PON1 muestran mayor actividad GR (0.761 U/g Hb más) con respecto a los que no lo presentan.

#### 4.4. Catalasa (CAT)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad CAT (mU/g Hb) de todos los individuos estudiados:



No se observan diferencias significativas en la actividad CAT entre controles y expuestos en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, aunque los individuos expuestos a plaguicidas presentan niveles ligeramente más elevados que los controles en el periodo de mayor exposición, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (Catalasa, mU/g Hb)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
Catalasa (M-1)	Control	53	85,30	22,60	0.201
	Expuestos	115	89,73	19,92	
Catalasa (M-2)	Control	39	97,56	17,60	0.900
	Expuestos	102	97,18	15,45	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se detectan diferencias significativas en los dos periodos del ciclo de fumigación, según se muestra en la siguiente tabla:

**Anova 1 (Catalasa, mU/g Hb)**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
Catalasa (M-1)	Control	53	85,30	22,60	< 0.001
	Granada	62	78,27	15,45	
	Almería	53	103,13	15,83	
	<i>Total</i>	<i>168</i>	<i>88,33</i>	<i>20,84</i>	
Catalasa (M-2)	Control	39	97,56	17,60	0.023
	Granada	60	93,57	14,98	
	Almería	42	102,34	14,80	
	<i>Total</i>	<i>141</i>	<i>97,29</i>	<i>16,01</i>	

Resulta algo contradictorio que la CAT del grupo control se sitúe entre la de los dos subgrupos de individuos expuestos. En la comparación posterior por subgrupos sólo se observan diferencias significativas en M-1, donde la CAT de los tres subgrupos es estadísticamente diferente entre sí ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la actividad CAT de M-1 con la de M-2 sí se observan diferencias significativas, pues es más baja en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
Catalasa (M-1)	87,92	119	18,34	< 0.001
Catalasa (M-2)	95,53	119	15,22	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.174 ( $p=0.059$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control no se observan diferencias significativas de la CAT a lo largo del ciclo de fumigación ( $93.1 \text{ mU/g Hb} \pm 15.7$  en M-1 vs.  $96.7 \text{ mU/g Hb} \pm 17.7$  en M-2,  $p=0.337$ ,  $n=37$ ). Por el contrario, los individuos expuestos a plaguicidas sí muestran diferencias significativas ya que presentan niveles más bajos de CAT en el periodo de mayor exposición a plaguicidas ( $85.6 \text{ mU/g Hb} \pm 19.1$  m en M-1 vs.  $95.0 \text{ mU/g Hb} \pm 14.1$  en M-2,  $p<0.001$ ,  $n=82$ ).

La CAT no muestra diferencias significativas al comparar por sexo, presencia de síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas, antecedentes de intoxicación por estos agentes, intoxicación previa por compuestos anticolinesterásicos o utilización de carbamatos. Sin embargo, se han observado diferencias significativas al comparar por utilización de plaguicidas anticolinesterásicos en el periodo de mayor exposición (M-1), pues los individuos que manejan estos productos presentan niveles más altos de CAT con respecto a los que no los manejan ( $90.17 \text{ mU/g Hb} \pm 17.93$ ,  $n=91$  vs.  $78.69 \text{ mU/g Hb} \pm 20.04$ , respectivamente;  $n=14$ ;  $p=0.030$ ). También se han observado diferencias significativas, aunque en el sentido opuesto, al comparar por utilización de plaguicidas organofosforados en M-2, pues los individuos que manejan estos productos presentan una actividad CAT más baja ( $92.70 \text{ mU/g Hb} \pm 12.77$ ,  $n=$

41 vs. 99.07 mU/g Hb  $\pm$  15.11; n= 49; p= 0.035).

Al comparar por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo no se observan diferencias significativas. Por el contrario, sí las hay al comparar por la adopción de medidas de protección durante el proceso de fumigación, pues aquellos individuos que hacen uso de ellas presentan niveles más altos de CAT en M-2, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	Protecc. durante fumig.	N	Media	Desv. tip.	P
Catalasa (M-1)	Sí	74	89,72	18,26	0.133
	No	24	82,96	21,10	
Catalasa (M-2)	Sí	74	99,03	15,16	0.007
	No	19	88,34	14,34	

El análisis de correlación simple muestra que la CAT se asocia de forma directa con la AChE, G6PDH, GR y SOD en M-1. Por el contrario, muestra una asociación inversa con la BeChE y AChE y una asociación directa con la SOD en M-2 (Tablas 3 y 4). Asimismo, se ha hallado una asociación inversa con el IMC en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tabla 5).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la CAT como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenido los siguientes resultados:

- CAT (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.126,  $p < 0.001$ ,  $n = 131$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Sexo	13,751	,001	,290
Edad	-,502	,003	-,262

- CAT (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.054,  $p = 0.009$ ,  $n = 106$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-,876	,009	-,252

Se observa que, en M-1, las mujeres muestran 13 mU/g Hb más que los hombres y que por cada año de edad que pasa, la actividad CAT disminuye en 0.502 mU/g Hb. Por el contrario, en M-2, por cada unidad de IMC disminuye la actividad CAT en 0.876 mU/g Hb.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la CAT, se obtuvieron los siguientes resultados:

- CAT (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.037,  $p= 0.046$ ,  $n = 83$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Edad	-,415	,046	-,220

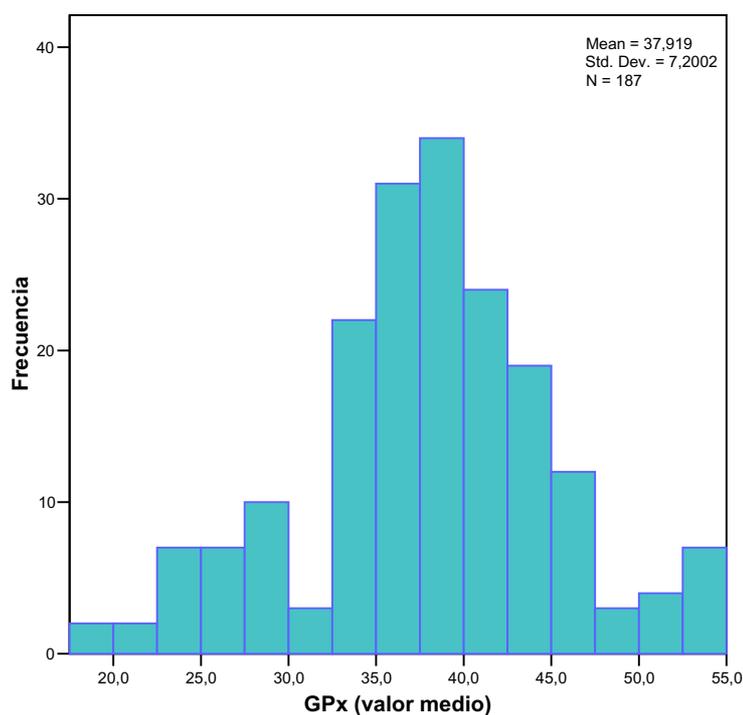
- CAT (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.075,  $p= 0.014$ ,  $n = 67$ .

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	-,948	,014	-,299

Ahora sólo la edad se asocia de forma significativa con la CAT en M-1, de manera que por cada año que pasa la actividad disminuye en 0.415 mU/g Hb. En M-2, por su parte, el IMC sigue manteniendo una asociación inversa con la CAT, de manera que por cada unidad de aumento del mismo la actividad enzimática disminuye en 0.948 mU/g Hb. En cualquier caso, de ninguno de estos modelos parece desprenderse información relevante desde el punto de vista de la toxicidad de plaguicidas.

#### 4.5. Glutation peroxidasa (GPx)

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad GPx (U/g Hb) de todos los individuos estudiados:



Se observan diferencias significativas entre controles y expuestos en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. En ambos casos, los individuos expuestos a plaguicidas presentan niveles significativamente más altos que los controles según se muestra en la siguiente tabla:

Preuba t de Student (GPx, U/g Hb)

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
GPx (M-1) Control	47	32,58	7,61	0.049
Expuestos	109	35,40	8,36	
GPx (M-2) Control	38	41,55	3,42	0.046
Expuestos	102	43,09	5,31	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se detectan diferencias significativas de la GPx en los dos periodos del ciclo de fumigación, según se muestra en la siguiente tabla:

Anova 1 (GPx, U/g Hb)

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>	<i>P</i>
GPx (M-1) Control	47	32,58	7,61	< 0.001
Granada	58	38,27	8,27	
Almería	51	32,14	7,25	
<i>Total</i>	156	34,55	8,22	
GPx (M-2) Control	38	41,55	3,42	< 0.001
Granada	60	41,57	5,03	
Almería	42	45,27	4,99	
<i>Total</i>	140	42,68	4,91	

En la comparación por subgrupos se ha visto que los individuos de Granada presentan niveles significativamente más altos en M-1, mientras que los de Almería los presentan en M-2 ( $p < 0.05$  en ambos casos).

Al comparar la actividad GPx de los dos periodos del ciclo de fumigación entre sí se observan diferencias significativas, siendo más alta en el periodo de menor exposición a

plaguicidas, según se muestra en la siguiente tabla:

**Estadísticos de muestras relacionadas**

	Media	N	Desv. típ.	P
GPx (M-1)	36,38	109	8,21	< 0.001
GPx (M-2)	42,04	109	4,73	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.043 ( $p= 0.660$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control se observan diferencias significativas a lo largo del ciclo de fumigación ( $36.0 \text{ U/g Hb} \pm 6.1$  en M-1 vs.  $41.4 \text{ U/g Hb} \pm 3.4$  en M-2,  $p < 0.001$ ,  $n= 31$ ). Los individuos expuestos a plaguicidas también muestran diferencias significativas de similar magnitud ( $36.5 \text{ U/g Hb} \pm 8.9$  en M-1 vs.  $42.3 \text{ U/g Hb} \pm 5.2$  en M-2,  $p < 0.001$ ,  $n= 78$ ). En ambos casos, los niveles más bajos de GPx se observan en el periodo de mayor exposición a plaguicidas.

Al comparar la GPx por presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas se observan diferencias significativas en M-2, de manera que los individuos que presentan dicha sintomatología tienen niveles más bajos según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

Síntomas relacionados	N	Media	Desv. típ.	P	
GPx (M-1)	No	78	35,84	8,46	0.907
	Sí	26	36,06	6,71	
GPx (M-2)	No	77	43,80	5,42	0.020
	Sí	24	40,92	4,47	

No se observan diferencias significativas al comparar la actividad GPx por sexo, intoxicación previa por plaguicidas, intoxicación previa por agentes anticolinesterásicos,

utilización de plaguicidas anticolinesterásicos o utilización de carbamatos. Sin embargo, sí se han observado diferencias significativas al comparar por utilización de plaguicidas organofosforados, pues los individuos que manejan estos productos presentan niveles más bajos con respecto a los que no los manejan en el periodo de menor exposición ( $41.56 \text{ U/g Hb} \pm 4.12$  vs.  $43.92 \text{ U/g Hb} \pm 6.01$ , respectivamente,  $p= 0.031$ ).

Al comparar por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación no se observan diferencias significativas.

El análisis de correlación simple muestra que la GPx se asocia de forma significativa y directa con la GR y SOD en los dos periodos del ciclo de fumigación (Tablas 3 y 4). También lo hace, aunque de forma inversa, con la AChE en M-1. En M-2, la GPx se asocia de forma inversa con la ArE y DZOasa (Tabla 4). También se ha observado una asociación significativa con la edad en los dos periodos del ciclo de fumigación, siendo directa en M-1 e inversa en M-2 (Tabla 5).

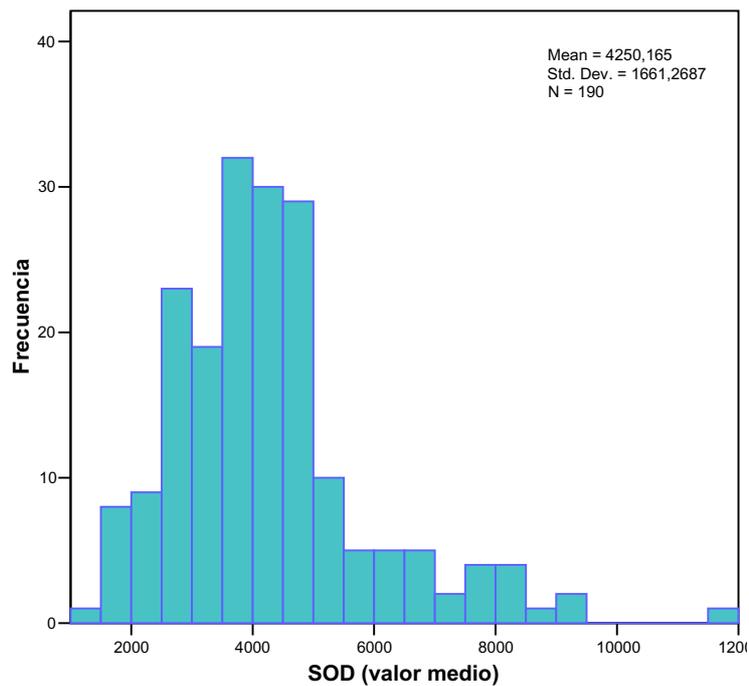
Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la GPx como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables dependientes o predictoras utilizadas. Sin embargo, no se han obtenido modelos significativos en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación.

Posteriormente se realizó un segundo análisis de regresión lineal múltiple, en este caso sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la GPx. Sin embargo, tampoco se

ha obtenido ningún modelo significativo en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

#### 4.6. Superóxido dismutasa (SOD).

En el siguiente histograma de frecuencias se presenta la distribución de los valores medios de la actividad SOD (U/g Hb) de todos los individuos estudiados:



La SOD muestra diferencias significativas entre controles y expuestos en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, en el sentido de que los expuestos presentan

niveles significativamente más bajos que los controles (un 21.8% inferior en M-1 y 20.8 % en M-2), según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student (SOD, U/g Hb)**

	Exposición	N	Media	Desv. típ.	P
SOD (M-1)	Control	53	3322,3	898,8	< 0.001
	Expuestos	115	2597,7	605,9	
SOD (M-2)	Control	39	3342,0	1235,3	0.002
	Expuestos	102	2646,6	878,1	

Al efectuar la comparación por el lugar de procedencia de los individuos se detectan diferencias significativas en los dos periodos del ciclo de fumigación, según se muestra en la siguiente tabla:

**Anova 1 (SOD, U/g Hb)**

		N	Media	Desv. típica	P
SOD (M-1)	Control	53	3322,3	898,8	<0.001
	Granada	62	2456,6	570,9	
	Almería	53	2762,8	609,0	
	Total	168	2826,3	785,0	
SOD (M-2)	Control	39	3342,0	1235,3	0.007
	Granada	60	2580,3	771,7	
	Almería	42	2741,3	1013,4	
	Total	141	2838,9	1033,4	

En la comparación posterior se observan diferencias significativas entre los 3 subgrupos de individuos en el periodo de mayor exposición a plaguicidas y entre los dos subgrupos de expuestos con respecto a los controles en el periodo de menor exposición ( $p < 0.05$ ).

Al comparar la actividad SOD de los dos periodos del ciclo de fumigación entre sí no se observan diferencias significativas entre ellos, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de muestras relacionadas**

	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
SOD (M-1)	2890,2	119	826.9	0.542
SOD (M-2)	2825,3	119	1031,1	

El análisis de correlación de la actividad enzimática entre M-1 y M-2 muestra un coeficiente “r” de 0.237 ( $p = 0.009$ ). Al seleccionar sólo los individuos del grupo control no se observan diferencias significativas a lo largo del ciclo de fumigación (3686.7 U/g Hb  $\pm$  755.4 en M-1 vs. 3302.8 U/g Hb  $\pm$  1213.4 en M-2,  $p = 0.102$ ,  $n = 37$ ). Tampoco se observan diferencias significativas en el subgrupo de expuestos a plaguicidas (2530.8 U/g Hb  $\pm$  567.3 en M-1 vs. 2609.8 U/g Hb  $\pm$  862.2 en M-2,  $p = 0.482$ ,  $n = 82$ ).

Al efectuar la comparación por sexo se observan diferencias significativas en el periodo de mayor exposición a plaguicidas, pues los hombres presentan niveles de SOD más bajos que las mujeres, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

		<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
SOD (M-1)	Hombre	137	2691,9	695,5	< 0.001
	Mujer	30	3441,2	896,3	
SOD (M-2)	Hombre	100	2803,0	1057,4	0.330
	Mujer	21	3049,5	1015,7	

Al comparar la SOD por presencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, se observan indicios de significación en M-2, ya que los individuos con sintomatología presentan niveles más bajos según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	Síntomas relacionados	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
SOD (M-1)	No	83	2674,8	643,9	0.188
	Sí	27	2489,4	397,3	
SOD (M-2)	No	77	2739,4	939,2	0.068
	Sí	24	2365,7	593,8	

No se observan diferencias significativas en la actividad SOD al comparar por antecedentes de intoxicación por plaguicidas, intoxicación previa por agentes anticolinesterásicos, utilización de plaguicidas anticolinesterásicos o utilización de carbamatos. Sin embargo, sí se han observado diferencias significativas al comparar por utilización de plaguicidas OPs, pues los individuos que manejan estos productos presentan una SOD más baja en el periodo de mayor exposición (2476.5 U/g Hb  $\pm$  538.9 vs. 2737.3 U/g Hb  $\pm$  629.0;  $p= 0.032$ ).

Al comparar por utilización de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante el proceso de fumigación no se observan diferencias significativas. Sin embargo, existen indicios de significación en el periodo de mayor exposición, pues los individuos que se protegen durante la fumigación presentan niveles más altos de SOD, según se muestra en la siguiente tabla:

**Prueba t de Student**

	Protecc. durante fumigación	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>P</i>
SOD (M-1)	Sí	74	2663,7	602,5	0.084
	No	24	2419,3	571,3	
SOD (M-2)	Sí	74	2695,6	931,6	0.535
	No	19	2551,4	761,3	

Parece ser que la adopción de medidas de protección durante la fumigación preserva la SOD de sufrir un descenso en su actividad.

El análisis de correlación simple muestra que la SOD se asocia de forma directa con la AChE, G6PDH, GR, CAT, GPx y ArE en M-1 (Tabla 3). Sin embargo, en M-2 mostró una asociación inversa con AChE y directa con G6PDH, CAT y GPx (Tabla 4). Asimismo, también se ha una asociación directa con el IMC en M-1 e inversa con la edad en M-2 (Tabla 5).

Posteriormente se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple utilizando la SOD como variable dependiente en cada uno de los periodos del ciclo de fumigación estudiados. En el apartado correspondiente de Material y Métodos se describen las variables

dependientes o predictoras utilizadas. En el primer modelo se han obtenidos los siguientes resultados:

- SOD (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.378,  $p < 0.001$ ,  $n = 131$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Exposición	-1023,289	,000	-,578
Edad	-12,145	,043	-,179
Tabaco	-222,740	,043	-,179

- SOD (M-2):  $R^2$  ajustada: 0.075,  $p = 0.003$ ,  $n = 106$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Exposición	-642,331	,003	-,290

Se observa cómo la exposición a plaguicidas predice de forma significativa la actividad SOD, mostrando una asociación inversa en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Así, los individuos expuestos (fumigadores) muestran, respectivamente, 1023 y 642 U/g Hb menos que los controles. Además, en M-1 tanto la edad como el consumo de tabaco se asocian de forma inversa a la SOD, lo que significa que por cada año de edad que pasa disminuye la actividad en 12 U/g Hb y que los consumidores de tabaco tienen 222 U/g Hb de SOD menos que los que no lo son.

En el segundo modelo de regresión lineal múltiple, efectuado sólo con los fumigadores para evaluar qué variable o variables predictoras (incluyendo las de tipo ocupacional) estaban significativamente asociadas con la SOD, se obtuvieron los siguientes resultados:

- SOD (M-1):  $R^2$  ajustada: 0.124,  $p= 0.002$ ,  $n = 83$

	B	Sig.	Correlación
			Parcial
Años profesión	-18,642	,006	-,302
Tabaco	-266,979	,040	-,228

- SOD (M-2): No obtiene ningún modelo significativo ( $n= 67$ )

El hallazgo más relevante es que los años de exposición a plaguicidas predicen de forma significativa una menor actividad SOD (es decir, existe una asociación inversa entre ambas variables). Es decir, que por cada año trabajado manejando plaguicidas disminuye la actividad SOD en 18 U/g Hb. Además, los consumidores de tabaco tienen 266 U/g Hb menos de SOD que lo que no fuman. Todo ello en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (M-1).

---

## 5. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE

Se efectuó este análisis con objeto de evaluar qué factores (variables) pueden influir (predecir) la presencia de antecedentes previos de intoxicación por plaguicidas, la existencia de sintomatología relacionada con la exposición a estos agentes y la inhibición de la AChE por encima de un 15% en el periodo de mayor exposición con respecto al periodo basal o de menor exposición.

Tal y como se expuso en el apartado de Material y Métodos, las variables predictoras fueron las siguientes: edad, IMC, consumo de tabaco (1: sí, 0: no), consumo de alcohol (1: sí, 0: no), utilización de compuestos organofosforados (1: sí, 0: no), años de exposición a plaguicidas, utilización de medidas de protección personal durante la preparación de la mezcla de plaguicidas (1: no, 0: sí) y durante la aplicación de los mismos (1: no, 0: sí), ser portador del alelo B de PON1 (1: sí, 0: no), ser portador de un fenotipo inusual de BeChE (1: sí, 0: no).

La presencia de sintomatología relacionada con la exposición a plaguicidas no se asoció con ninguna de las variables predictoras estudiadas. Sin embargo, el antecedente de intoxicación previa por plaguicidas mostró una asociación con el fenotipo plasmático de POasa, de manera que el ser portador del alelo B constituye un factor protector (OR: 0.28, IC 95%: 0.08-0.96,  $p=0.044$ ). Finalmente, las únicas variables que se asociaron con una inhibición de AChE superior a un 15% fueron la utilización de organofosforados (OR: 4.19; IC95%: 0.97-18.12,  $p=0.055$ ) y los años de exposición a plaguicidas (OR: 1.13; IC95%: 1.02-1.24,  $p=0.014$ ). Esto indica que aquellos individuos que utilizan organofosforados tienen un riesgo algo superior a 4 veces de inhibir su AChE por encima de un 15% y que por cada año de antigüedad como aplicador de plaguicidas el riesgo de inhibir la AChE por encima de dicho límite aumenta un 13%.

**DISCUSIÓN**



## 1. PERFIL DE LA MUESTRA

En este trabajo se han estudiado 135 individuos expuestos a plaguicidas, denominados “fumigadores” (edad  $37.4 \pm 9.4$ ) y 55 controles no expuestos (edad  $39.0 \pm 8.4$ ) que actuaron como grupo de referencia. Como indicador del riesgo de exposición a plaguicidas, 41 fumigadores (el 30.6%) tenían el antecedente de una intoxicación previa por el uso de estos compuestos.

No existen diferencias significativas entre ambos grupos de individuos al comparar por edad. Al comparar por sexo se observaron diferencias significativas sólo en el IMC, parámetro que como era previsible era mayor en varones que en mujeres ( $27.3 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$  vs.  $25.0 \pm 3.9 \text{ kg/m}^2$ , respectivamente,  $p= 0.004$ ). Los fumigadores tienen mayor IMC que los no fumigadores ( $27.4 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$  vs.  $25.8 \pm 3.7 \text{ kg/m}^2$ , respectivamente,  $p= 0.023$ ), lo cual se puede explicar porque la mayoría de los fumigadores son varones. Por tanto, el IMC se utilizó como variable de confusión en los análisis multivariantes posteriores.

Al comparar la edad y el IMC de los fumigadores controlando por sintomatología relacionada con los plaguicidas o por el antecedente de una intoxicación previa, no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

## 2. ASPECTOS CLÍNICOS

La prevalencia de episodios de alta exposición a plaguicidas ha sido una variable considerada en el estudio prospectivo de la salud de agricultores norteamericanos (Agricultural Health Study, AHS). Según este estudio, la probabilidad de presentar una alta exposición a plaguicidas en algún momento de la vida profesional de los fumigadores aumenta conforme lo

hace el número acumulado de días que han aplicado plaguicidas (Mage et al, 2000). En la presente tesis se ha estudiado el antecedente de intoxicación previa por plaguicidas, una alteración de la salud sin duda más severa que los episodios de alta exposición a estos compuestos del AHS, ya que los individuos mostraron síntomas clínicos que les impulsó a buscar asistencia médica, siendo a menudo ingresados en hospitales. Sin embargo, ni el número de días al año que se aplican plaguicidas ni los años acumulados de exposición a estos compuestos se asociaron de forma significativa con el antecedente de intoxicación por plaguicidas. Asimismo, ninguna de las variables estudiadas se asoció a la existencia de síntomas relacionados con la exposición crónica a plaguicidas, ni siquiera el ser portador del alelo B de PON1. En un estudio con 100 agricultores sudafricanos se observó que los portadores del alelo Q de PON1 (es decir, los que tenían genotipo QQ o QR) tenían casi 3 veces más riesgo de mostrar dicha sintomatología (Lee et al, 2003). Esta discrepancia puede explicarse por varios motivos:

- por un lado, nosotros no hemos determinado el genotipo sino el fenotipo sérico de PON1 (portadores del alelo B, es decir con fenotipo AB o BB, correspondientes a los genotipos QR o RR);
- en segundo lugar, la definición de sintomatología crónica por plaguicidas no es totalmente superponible, pues estos autores consideraron como tal la presencia de al menos dos de los siguientes síntomas: dolor abdominal, náuseas, rinorrea, vértigo, dolor de cabeza, somnolencia, fatiga, trastornos de la marcha, hormigueo en los miembros, parestesias, dolor de miembros o debilidad en miembros. Por el contrario, nosotros consideramos que había sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas si se reunían al menos tres de los siguientes síntomas compatibles con exposición a compuestos

---

anticolinesterásicos: vértigo, náuseas y/o vómitos, dolor de cabeza, visión borrosa, dolor epigástrico o diarrea.

- En tercer lugar, el tipo de exposición a plaguicidas de los trabajadores sudafricanos (agricultores que cultivan frutales) puede ser bastante distinto del de los fumigadores de nuestro estudio, implicados en actividades de agricultura intensiva de invernadero.

### **3. ESTERASAS SANGUÍNEAS Y EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

#### **3.1. Paraoxonasa (PON1)**

La actividad PON1 se ha estudiado utilizando 3 sustratos diferentes (paraoxón, fenilacetato y diazoxón). Sólo se han observado diferencias significativas entre fumigadores y controles en el caso de la DZOasa, donde los fumigadores presentaban niveles más bajos que los controles en el periodo de menor exposición (Tabla 1). Por su parte, los fumigadores de Granada presentaban una actividad ArE significativamente más baja que los de Almería y los controles en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Al comparar las actividades PON1 de fumigadores y controles entre los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados se observa que la ArE muestra niveles significativamente más bajos en el periodo de mayor exposición mientras que la DZOasa los presenta en el de menor exposición (aunque sólo en el subgrupo de fumigadores, los controles no mostraron dicha variación).

Posteriormente, los datos se agruparon por quintiles de actividad y no se observaron diferencias significativas al comparar por exposición (fumigadores vs. controles), sintomatología relacionada con plaguicidas o intoxicación previa. Sin embargo, si se compara el 5° quintil (mayor actividad) frente al resto de quintiles agrupados (1-4°), se observaron diferencias significativas en la ArE ( $\chi^2= 4.38$ ,  $p= 0.036$ , OR= 2.55, IC 95% 1.04-6.22) y DZOasa ( $\chi^2= 3.88$ ,  $p= 0.049$ , OR= 2.48, IC 95% 0.99-6.21) al comparar por la variable intoxicación previa. Esto significa que los fumigadores con mayor actividad ArE y DZOasa (5° quintil) tienen aproximadamente 2.5 veces más probabilidades de haber sufrido una intoxicación previa por plaguicidas con respecto a aquellos otros con menor actividad (quintiles 1°-4°). Este resultado parece contradictorio con los hallazgos obtenidos por Mackness et al (2003) al estudiar ganaderos implicados en el “baño de la oveja” (*sheep dipping*) en el que aquellos individuos incluidos en el quintil de menor actividad DZOasa tenían más riesgo de presentar sintomatología atribuible a la exposición a plaguicidas. No obstante, ambos estudios no son totalmente comparables, pues en el caso del “baño de la oveja” los individuos sólo estaban expuestos a un plaguicida (diazinón), precisamente el precursor del sustrato que se emplea para determinar la actividad DZOasa. En nuestro caso, además, el análisis multivariante mostró que los fumigadores con antecedentes de intoxicación por plaguicidas tienen una mayor actividad ssPOasa (Tabla 9); lo cual es difícil de explicar. Es posible que ocurra un mecanismo adaptativo de tipo homeostático que dé lugar a una inducción enzimática sostenida en el tiempo, o bien que esos individuos, tras sufrir la intoxicación, adoptan más precauciones en el manejo de los plaguicidas, lo cual impide que descienda la actividad enzimática.

Los trabajadores industriales y agricultores con exposición crónica a plaguicidas son los que presentan un mayor riesgo de toxicidad aguda y crónica (Wu et al, 1989; Levine, 1991). Sin embargo, es difícil establecer los efectos sobre la salud derivados de la exposición combinada o secuencial a diferentes plaguicidas en el curso de las tareas de fumigación, ya

que las manifestaciones tóxicas no son específicas para los diferentes compuestos químicos. El uso combinado de plaguicidas es cada vez más frecuente en las prácticas agrícolas, estando los OPs incluidos en muchas de las mezclas. La fuerte relación inversa entre PON1 y susceptibilidad a intoxicación por OPs es un hecho conocido (Furlong et al, 2000b), de ahí que uno de los objetivos planteados en el presente estudio haya sido evaluar si el fenotipo sérico de PON1 podría ser de utilidad a la hora de identificar qué individuos (de entre los fumigadores) presentaban mayor riesgo para su salud por estar expuestos a plaguicidas de una manera continua. Este planteamiento es de gran importancia, pues las relaciones dosis-respuesta de los OPs son muy pronunciadas (Costa et al, 1990), lo que sugiere que pequeñas diferencias en la actividad PON1 por debajo de un umbral crítico de toxicidad podría explicar grandes diferencias en la toxicidad. En el presente estudio no se ha observado ninguna asociación entre la PON1 (con los diferentes sustratos utilizados) y la utilización de plaguicidas organofosforados; pero sí entre la DZOasa y utilización de carbamatos (y también plaguicidas anticolinesterásicos, que incluyen carbamatos y OPs), de manera que los fumigadores que utilizan este tipo de compuestos presentan menos actividad DZOasa en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. No obstante, este resultado no fue posteriormente confirmado en el análisis multivariante, lo que le resta valor. Por el contrario, estudios previos de nuestro grupo observaron que los individuos expuestos a OPs mostraban una menor actividad ssPOasa (Hernández et al, 2003).

En los análisis multivariantes efectuados se ha observado una asociación constante del alelo B de la paraoxonasa con las diferentes actividades PON1 (Tablas 6 y 8), directa en el caso de la POasa (basal y salina) e inversa con la ArE y DZOasa, lo cual es coherente con estudios previos (La Du et al, 2001; Davies et al, 1996). Un dato interesante es que la exposición a plaguicidas predice de forma independiente una menor actividad DZOasa en el periodo de menor exposición a plaguicidas (Tabla 6). Esto parece indicar que, en el presente estudio, esta actividad enzimática es la que mejor mide el efecto de la exposición a

plaguicidas; en otras palabras, constituye un buen indicador biológico de exposición, aunque su efecto no es inmediato sino algo diferido. Estudios previos de nuestro grupo han mostrado también que los fumigadores presentan niveles más bajos de PON1 con respecto a no fumigadores (trabajadores que no aplicaban plaguicidas pero que estaban indirectamente expuestos a los mismos en su actividad laboral) y ello independientemente del periodo de fumigación estudiado (Hernández et al, 2004).

De forma llamativa se ha observado que la utilización de medidas de protección durante la preparación del caldo predice niveles más altos de POasa y ssPOasa. Esto significa que una protección efectiva frente a dicho insulto tóxico conduce a una mayor actividad PON1 o, en otras palabras, que la falta de protección favorece una mayor absorción de los plaguicidas (en ese momento más concentrados) que terminan afectando la actividad enzimática (Hernández et al, 2003), posiblemente por inactivación de sus grupos sulfhidrilo (Aviram et al, 1999) como consecuencia del estrés oxidativo generado por estos compuestos.

Finalmente, el consumo de alcohol se asocia de forma directa con la ArE en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados y con la DZOasa sólo en el periodo de menor exposición (Tabla 8). Ello, aunque no es un objetivo del presente trabajo, es consistente con el hecho de que la ingesta moderada de alcohol aumenta la actividad PON1 (Van der Gaag et al, 1999).

### **3.2. Acetilcolinesterasa (AChE)**

Se trata de un marcador clásico de exposición a plaguicidas, por lo que ha servido como referencia a la hora de comparar el comportamiento del resto de actividades enzimáticas

---

estudiadas. La AChE se ha utilizado, en principio, como marcador de efecto, ya que la mayoría de los individuos expuestos manejan compuestos anticolinesterásicos (OPs y carbamatos), de ahí que sea interesante valorar hasta qué punto estos individuos experimentan cierto grado de inhibición de la AChE.

Por otro lado, investigaciones recientes han planteado la hipótesis de que los insecticidas OPs, además de actuar como inhibidores de la AChE, interfieren también con el comportamiento alostérico del enzima por interactuar con lípidos de membrana (Domenech et al, 1997). Probablemente los sorprendentes estudios que describen un descenso de AChE eritrocitaria tras la exposición a endosulfán (Naqvi y Vaishnavi, 1993) o a ciertos piretroides, tales como cipermetrina y fenilvalerato (Kale et al, 1999), obedecen a esta razón. De hecho, Kale et al (1999) observaron una correlación significativa entre peroxidación lipídica (incremento de LPO) e inhibición de AChE en eritrocitos, por lo que han propuesto la AChE como biomarcador de la toxicidad de los piretroides. En este mismo sentido, Ranjbar et al (2002) han observado que el descenso de AChE en 45 trabajadores de una industria de formulación de OPs se correlacionaba con el aumento de TBARS y el descenso de la capacidad del plasma de reducir el ion férrico (FRAP), lo que indica que el descenso de AChE puede ser un marcador útil en la biomonitorización de trabajadores expuestos a OPs y que presentan un mayor riesgo de estrés oxidativo.

En nuestro estudio, como era de esperar, los individuos expuestos (fumigadores) presentan una AChE significativamente más baja que la de los controles, pero sólo en M-1 (Tabla 2) por lo que este periodo debe considerarse como el de mayor exposición a plaguicidas. Al clasificar los fumigadores por lugar de procedencia, se observa un comportamiento diferente en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Así, la AChE de los fumigadores de Granada en M-1 es significativamente más baja que la de los de

Almería y controles. Por el contrario, en M-2 la AChE de los fumigadores de Almería es significativamente más baja que la de los de Granada y controles. Este desigual comportamiento parece indicar que las dos zonas geográficas estudiadas presentan un patrón de fumigación distinto, de manera que para los trabajadores de Granada el periodo de mayor exposición sería M-1, mientras que para los de Almería sería M-2. A pesar de todo, las diferencias más acusadas las presentan los de Granada, lo cual indicaría un mayor nivel de exposición a plaguicidas o, alternativamente, una menor protección durante su manejo.

Al considerar todos los fumigadores (Granada y Almería conjuntamente), se observa que la AChE es significativamente más baja en el periodo de mayor exposición a plaguicidas con respecto al de menor exposición (10764 U/Hcto vs. 13560, respectivamente,  $p < 0.001$ ,  $n = 81$ ), aunque no existe una correlación significativa entre la AChE de M-1 y M-2 ( $p = 0.604$ ). Esta ausencia de correlación indica que algo está sucediendo en alguno de los dos periodos, muy probablemente puede tratarse del efecto de la exposición a plaguicidas. Por el contrario, la AChE de los controles no muestra diferencias significativas entre ambos periodos (13940 U/Hcto en M-1 y 13803 U/Hcto en M-2,  $p = 0.724$ ), aunque sí existe correlación significativa ( $r = 0.501$ ,  $p = 0.002$ ,  $n = 37$ ). Esta ausencia de diferencias en los controles permite excluir posibles variaciones estacionales o de otro tipo en los resultados obtenidos en la AChE de los individuos expuestos.

Al comparar por sexo se ha observado que los hombres presentan niveles significativamente más bajos de AChE que las mujeres en M-1. Esto puede obedecer a que dicho periodo es el de mayor exposición a plaguicidas y, en la muestra estudiada, la mayoría de los fumigadores eran varones. No obstante, al poder tratarse de una variable de confusión, el sexo se ha utilizado como predictor en los análisis multivariantes.

---

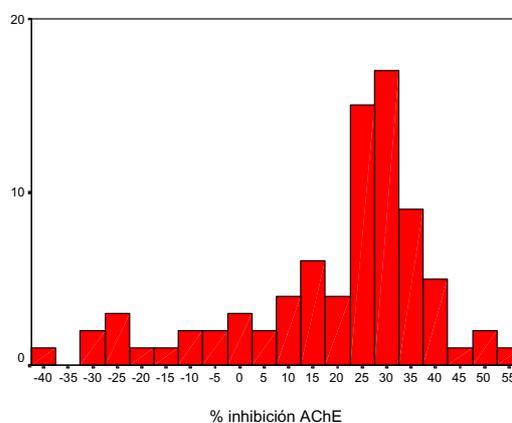
También se ha observado que los fumigadores que utilizan OPs presentan niveles significativamente más bajos de AChE en M-1 (Tabla 9). Esto, además de ser coherente, refuerza aún más la hipótesis de que dicho periodo es el de mayor exposición a plaguicidas. Sin embargo, no se han observado diferencias al comparar por utilización de carbamatos o de plaguicidas anticolinesterásicos (que incluyen carbamatos y OPs). Ello puede ser debido a que el teórico efecto inhibitor de estos compuestos sobre la AChE tiene una duración de unas pocas horas como mucho (Lewalter y Leng, 1999), por lo que en el momento de recoger la muestra de sangre (a primera hora de la mañana, por tanto antes de comenzar las tareas agrícolas) ya ha podido desaparecer dicho efecto. Como el número de individuos que maneja carbamatos es mayor que el que maneja organofosforados, la falta de significación al comparar por la variable “exposición a plaguicidas anticolinesterásicos” puede explicarse por quedar diluido el efecto de los OPs. En cualquier caso, la exposición a OPs se ha utilizado también como predictor en los análisis multivariantes.

En los diferentes análisis de correlación efectuados se ha observado una asociación directa entre la AChE en M-1 y el porcentaje de estimulación salina de POasa, lo cual ha sido documentado previamente (Akgür et al, 1999) aunque en escenarios agrícolas diferentes. Teniendo en cuenta que el porcentaje de estimulación salina de POasa es el criterio que permite diferenciar el fenotipo sérico de PON1 (Eckerson et al, 1983), el hallazgo de una AChE significativamente más alta en los portadores del alelo B (fenotipos AB o BB) en el periodo de mayor exposición a plaguicidas se puede interpretar como que estos individuos serían menos susceptibles a los OPs que aquellos otros con fenotipo AA debido a su mayor actividad AChE (Akgür et al, 1999). Alternativamente se podría pensar que el descenso de AChE es el resultado de la exposición a OPs y que aquellos individuos portadores del alelo B de PON1, al ser teóricamente más efectivos hidrolizando OPs, experimentarían una menor interacción de estos agentes sobre la AChE, por lo que ésta presentaría un valor más alto.

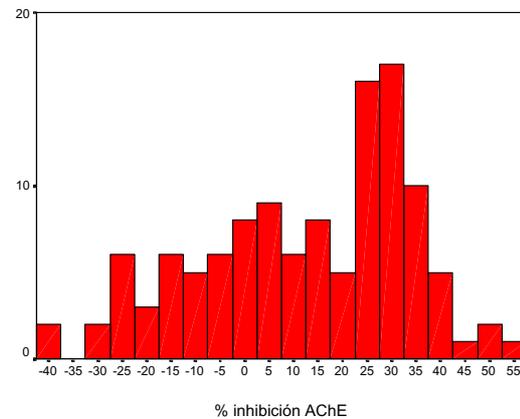
Al realizar el análisis multivariante se ha observado que la exposición a plaguicidas predice de forma significativa e independiente niveles más bajos de AChE en M-1 (2636 U/ Hcto. por término medio en los individuos expuestos). Este resultado no sólo es coherente sino que pone de manifiesto la utilidad de esta actividad enzimática en la monitorización biológica de personas crónicamente expuestas a plaguicidas en el ámbito laboral. Además, se ha observado que la utilización de OPs conlleva niveles más bajos de AChE (unas 1590 U/ Hcto. por término medio). De forma llamativa los portadores del alelo B de PON1 presentan, por término medio, unas 890 U/ Hcto. menos de AChE en el periodo de menor exposición a plaguicidas, sin embargo estos individuos tienen, desde el punto de vista teórico, mayor capacidad catalítica para degradar OPs. Es posible que esta mayor “ventaja fisiológica” conlleve más exposición a estos agentes que determinaría una mayor concentración de los mismos en sangre, situación que conduciría a una mayor inhibición de la AChE antes de ser hidrolizados por la PON1 sérica, de ahí que no entrañe mayor afectación clínica. Un resultado similar, aunque no totalmente comparable es el obtenido con ganaderos encargados de realizar el “*sheep dipping*”, pues los que presentaban manifestaciones clínicas atribuibles a la exposición a plaguicidas tenían más probabilidad de ser portadores de los alelos 192 R y 55L en comparación a los controles (Cherry et al, 2002). En cualquier caso, este hallazgo apunta la posibilidad de considerar este parámetro (fenotipado sérico de PON1 o genotipado) como marcador de susceptibilidad e introducirlo en los exámenes previos de salud de individuos que vayan a manejar plaguicidas.

El hecho de que el consumo de tabaco se asocie de forma directa con la AChE puede obedecer a que los fumadores presentan cierto grado de hipoxemia que determina una mayor poliglobulia y, al tener más eritrocitos, presentan niveles más altos de AChE. Esta interpretación tiene como punto débil el que la AChE se expresa en Unidades por porcentaje de hematocrito, de manera que ese efecto quedaría así neutralizado.

Al igual que en estudios previos de nuestro grupo (Hernández et al, 2004), hemos calculado el porcentaje de inhibición de la AChE entre los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Más que inhibición, lo correcto sería decir disminución de actividad, aunque en aras de una mayor claridad seguiremos utilizando el primer término. Como se ha establecido que el periodo de mayor exposición a plaguicidas es M-1, dicho porcentaje se ha calculado de la siguiente forma:  $(M_2 - M_1 / M_2) * 100$ . El descenso medio de la AChE en los individuos expuestos es del  $19.4 \pm 20.1\%$ , y el correspondiente histograma de frecuencias se representa en la siguiente figura:



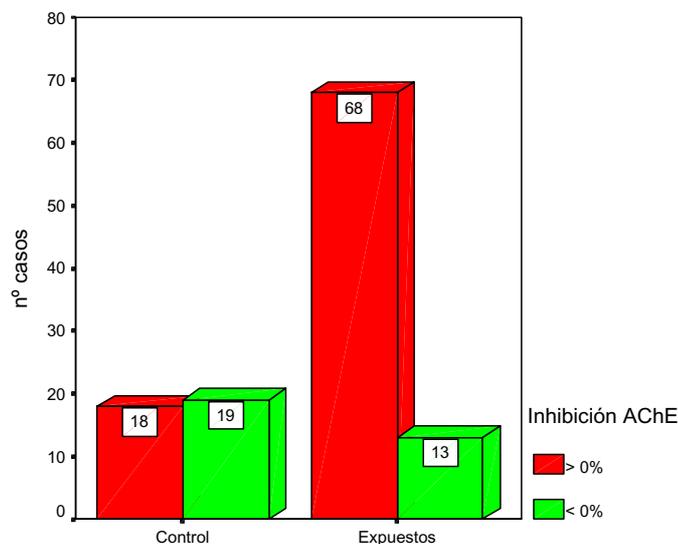
Si, además de los individuos expuestos, se incluyen también los controles, el porcentaje de inhibición baja al  $12.3 \pm 21.3\%$  (n= 118):



Puede llamar la atención que existan individuos con una inhibición negativa, es decir, por debajo del 0%. No hay que olvidar que existen diferencias intraindividuales de la actividad AChE. Pero es más, dicha inhibición negativa la presentan significativamente más los controles. Para demostrarlo, hemos clasificado a todos los individuos en función de si inhiben la AChE por encima o debajo de un 0% y a continuación hemos realizado una  $\chi^2$  ajustando por la variable exposición. Las diferencias han sido altamente significativas ( $p < 0.001$ ; OR: 0.18; IC 95%: 0.08-0.44), lo que indica que los individuos expuestos tienen 5.5 veces más probabilidad de inhibir la AChE  $>0\%$  que los controles (IC 95%: 2.3-13.3):

**Tabla de contingencia Exposición \* Inhibición AChE**

Recuento		Inhibición AChE		Total
		> 0%	< 0%	
Exposición	Control	18	19	37
	Expuestos	68	13	81
Total		86	32	118



Para compensar posibles diferencias intraindividuales de actividad AChE a lo largo del tiempo, se ha escogido un 15% de inhibición de AChE como punto de corte, lo cual permite clasificar los individuos en dos grupos (0: inhibición AChE < 15% y 1: inhibición AChE > 15%). Bajo estas condiciones se ha realizado una regresión logística múltiple (paso a paso) ajustando por las siguiente variables predictoras: edad, sexo (0: varón, 1: mujer), IMC, consumo de tabaco (1: sí, 0: no), consumo de alcohol (1: sí, 0: no), exposición a plaguicidas (0: control, 1: fumigador) y alelo B de la PON1 (0: fenotipo AA, 1: fenotipos AB y BB). Al final se obtuvo el siguiente modelo que incluye 105 individuos:

Variable	OR	IC 95%		p
		Inf.	Sup.	
IMC	1,23	1,07	1,42	0.004
EXPOSICIÓN	24,14	6,13	95,05	<0.001

En él se aprecia que los individuos expuestos (es decir, los fumigadores) tienen 24 veces más probabilidad de inhibir la AChE por encima del 15% que los no expuestos (controles) y ello independientemente de la edad, sexo, tabaco, alcohol o fenotipo sérico de paraoxonasa. De forma interesante, el IMC aumenta el riesgo de inhibición de la AChE, lo cual puede explicarse por el hecho de que los individuos con mayor IMC tienen una mayor superficie corporal y se sabe que la principal vía de absorción de los plaguicidas en el medio laboral es la cutánea (Hernández y Pla, 2003).

Posteriormente se realizó un segundo análisis de regresión logística, incluyendo sólo los individuos expuestos a plaguicidas (es decir, los fumigadores). Las variables predictoras introducidas incluyeron, además de las anteriormente mencionadas, otras de tipo laboral, como: sintomatología relacionada con plaguicidas, intoxicación previa, años de exposición como aplicador, exposición a OPs (1: sí; 0: no), protección durante el caldo (1: sí; 0: no) y durante la fumigación (1: sí; 0: no). Finalmente se ha obtenido el siguiente modelo significativo (el modelo ha incluido 66 casos y ha expulsado la variable sexo por ser constante en todos ellos):

Variable	OR	IC 95%		p
		Inf.	Sup.	
OP	4,19	0,97	18,12	0.055
AÑOS EXP.	1,13	1,02	1,24	0.014

La principal conclusión es que los individuos expuestos a OPs tienen 4 veces más riesgo de inhibir la AChE por encima de un 15% que los no expuestos. Dicha inhibición puede

---

obedecer tanto al conocido efecto directo de los OPs sobre la AChE como a un efecto indirecto, a través de la generación de estrés oxidativo (Ranjbar et al, 2002). Además, cada año de antigüedad como aplicador de plaguicidas supone un 13% más de probabilidad de inhibir la AChE por encima del punto de corte escogido, indicando cierto efecto “acumulativo” o una mayor sensibilidad del enzima con el paso del tiempo.

### 3.3. Benzoilcolinesterasa (BeChE)

Se trata de otro marcador clásico ampliamente utilizado en el seguimiento de individuos expuestos a plaguicidas organofosforados. Desde el punto de vista analítico es más fácil de determinar que la AChE, especialmente porque se efectúa en plasma en lugar de sangre total, por lo que no es preciso una manipulación previa de la muestra. A diferencia de la AChE, la BeChE es más sensible pero menos específica (Podolak y Panasiuk, 1997); sin embargo, ninguna de ellas desempeña un papel fisiopatológico en la intoxicación por agentes anticolinesterásicos, ya que se mide la actividad enzimática en sangre y no en tejido nervioso, por lo que se ha cuestionado su utilidad en la evaluación de riesgos tóxicos derivados de la exposición a plaguicidas (Carlock et al, 1999). En otras palabras, no son propiamente marcadores de efecto sino, en todo caso, de exposición.

En el presente estudio se ha observado que los individuos expuestos (fumigadores) presentaban niveles de BeChE significativamente más bajos que los no expuestos (controles), pero sólo en el periodo de menor exposición a plaguicidas (Tabla 1). Esto contrasta con lo observado en la AChE, cuyos niveles más bajos correspondían al de mayor exposición (Tabla 2). Las discrepancias se clarifican al estratificar los fumigadores por lugar de procedencia, ya que entonces se observa que el subgrupo de Almería que presenta niveles significativamente más bajos de BeChE en M-2 (los del grupo de Granada son prácticamente similares a los del

grupo control).

**Prueba t de Student**

	Procedencia fumigadores	N	Media	Desv. típ.	p
BeChE (M-1)	Granada	62	956	160	0.336
	Almería	44	920	206	
BeChE (M-2)	Granada	58	875	159	0.002
	Almería	42	775	149	

En el caso de la AChE, el subgrupo de Almería presentaba niveles similares a los del grupo control en M-1, pero significativamente más bajos que en M-2. Esto parece indicar que los dos subgrupos de fumigadores presentan patrones de exposición diferentes, posiblemente como consecuencia de modelos agrícolas o de cultivo también distintos. En otras palabras, da la impresión que el periodo de mayor exposición a plaguicidas es M-1 para el subgrupo de Granada y M-2 para el de Almería.

Se han observado, además, diferencias al comparar por sexo (Tabla 6), lo cual es consistente con estudios previos, ya que es conocido que las mujeres presentan niveles de BeChE significativamente más bajos que los hombres, especialmente las de menos de 45 años (Hernández et al, 1999), como es el caso que nos ocupa, donde la media de edad de las mujeres es de 36.7 años (rango 18-50). En nuestro caso estas diferencias se han observado sólo en M-1.

Al considerar únicamente la BeChE de los individuos expuestos, no se han encontrado diferencias significativas al comparar por sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa, utilización de diferentes tipos de plaguicidas, a adopción de medidas de protección personal durante la preparación del caldo o durante la

---

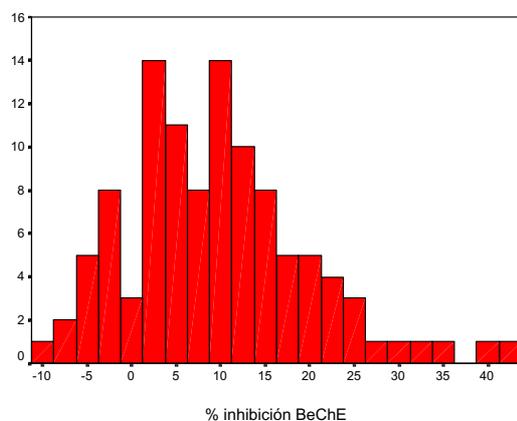
fumigación. En principio este resultado no parece muy coherente, máxime si se tiene en cuenta que en el caso de la AChE sí existían diferencias al comparar por exposición a OPs, ya que los expuestos a estos agentes presentaban niveles significativamente más bajos (Tabla 9). En intoxicaciones agudas por estos productos la BeChE muestra mayor sensibilidad que la AChE; sin embargo, de los resultados de nuestro estudio parece desprenderse que en el caso de individuos con exposición crónica continua y/o intermitente a plaguicidas, la AChE parece ser mejor indicador de exposición que la BeChE (Jaga y Dharmani, 2003).

Es conocido que la exposición continua a bajas dosis de plaguicidas puede descender gradualmente los valores de colinesterasa hasta niveles muy bajos y con escasa sintomatología. En la práctica puede suceder que trabajadores expuestos crónicamente a inhibidores de la colinesterasa y asintomáticos puedan presentar un valor de BeChE normal y una AChE inhibida, debido a las diferentes velocidades de reactivación (por síntesis “de novo” del enzima), más rápida en el caso de la BeChE (Hernández, 2005).

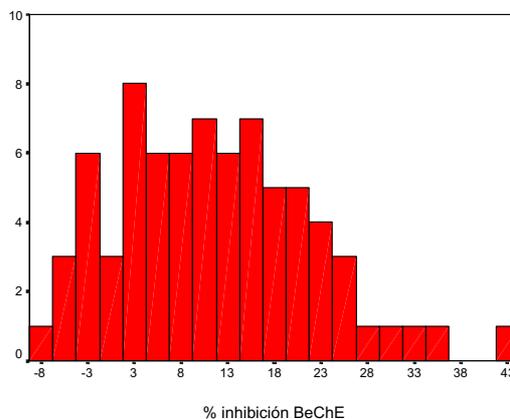
El análisis multivariante efectuado confirma que la BeChE se asocia de forma inversa con la exposición a plaguicidas en M-2 (Tabla 6), de manera que los individuos expuestos (fumigadores) presentan menor actividad BeChE (128 U/l por término medio) que los controles. Se confirma, por tanto, la utilidad de este marcador de exposición en el seguimiento de individuos crónicamente expuestos a plaguicidas (Hernández et al, 2004). Teniendo en cuenta el diferente comportamiento que presenta la BeChE con respecto a la AChE, se puede concluir que es necesario determinar ambas actividades colinesterasas en el seguimiento de estos individuos en lugar de una sola. Por otro lado, también se ha observado de forma consistente una asociación directa entre la BeChE y el IMC (Tablas 6 y 8), lo cual indica que los individuos con mayor volumen corporal presentan niveles más altos de BeChE. Esto podría sugerir que estos individuos estarían mejor protegidos frente a los plaguicidas

anticolinesterásicos en comparación a aquellos otros con menor IMC (a igualdad de exposición, el que tiene mayor IMC alcanzaría menor concentración tisular de plaguicidas). Sin embargo, lo más probable es que los individuos con mayor IMC tengan un hígado más grande y, como la BeChE se sintetiza en dicho órgano, su actividad sería mayor. Como el IMC se expresa en  $\text{kg}/\text{m}^2$  se podría pensar que a mayor IMC existe una menor proporción relativa de superficie corporal, por lo que cabría esperar una menor absorción cutánea de los plaguicidas, de forma también relativa.

A continuación se calculó el porcentaje de inhibición de la BeChE entre los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Como los valores más bajos se observaron en M-2, el cálculo se realizó de la siguiente forma:  $100 \cdot (M_1 - M_2) / M_1$  obteniendo el siguiente porcentaje medio de inhibición:  $9.6 \pm 10.1\%$  ( $n = 107$ ). El correspondiente histograma de frecuencias se representa a continuación:



Si se excluyen los controles, el porcentaje de inhibición aumenta ligeramente hasta  $11.0 \pm 10.3\%$  ( $n = 75$ )



A diferencia de lo que ocurría con la AChE, ahora no parece que los controles presenten inhibiciones negativas de la BeChE. Esto se confirma al realizar el correspondiente  $\chi^2$ , que no arroja diferencias significativas ( $p= 0.728$ ):

Recuento

	Inhib BeChE		Total
	Inhibición < 0%	Inhibición > 0%	
Control	6	26	32
Expuestos	12	63	75
Total	18	89	107

Posteriormente se ha utilizado un 15% como punto de corte para el porcentaje de inhibición de BeChE y se han clasificado los individuos en función de que inhiban por encima o por debajo de dicho valor, siguiendo el criterio empleado en estudios previos de nuestro grupo (Gómez , 2000; Hernández et al, 2004). Esto ha permitido la realización de un análisis de regresión logística de esta nueva variable en el que se han introducido como predictoras la edad, sexo (0: hombre; 1: mujer), IMC, consumo de tabaco y alcohol, alelo B de PON1 y

exposición a plaguicidas (1: expuestos; 0: controles). En total, se incluyen 95 casos y se obtiene el siguiente modelo:

<i>Variable</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>		<i>P</i>
		<i>Inf.</i>	<i>Sup.</i>	
EXPOSICIÓN	12,33	1,57	96,86	0.017

Se observa que los individuos expuestos a plaguicidas tienen unas 12 veces más probabilidades de inhibir la BeChE por encima del 15% que los no expuestos (controles), lo cual es coherente desde el punto de vista biológico.

A continuación se realizó otro análisis de regresión logística múltiple, incluyendo sólo a los fumigadores e introduciendo las siguientes variables predictoras: edad, sexo, IMC, consumo de tabaco y alcohol, alelo B de PON1, sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, exposición a OPs, procedencia geográfica de los fumigadores (0: Granada, 1: Almería), años de exposición, protección durante el caldo y protección durante la fumigación. El modelo paso a paso hacia delante incluye 63 casos y obtiene el siguiente resultado:

<i>Variable</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>		<i>P</i>
		<i>Inf.</i>	<i>Sup.</i>	
ALMERÍA	9,94	2,25	43,86	0.002

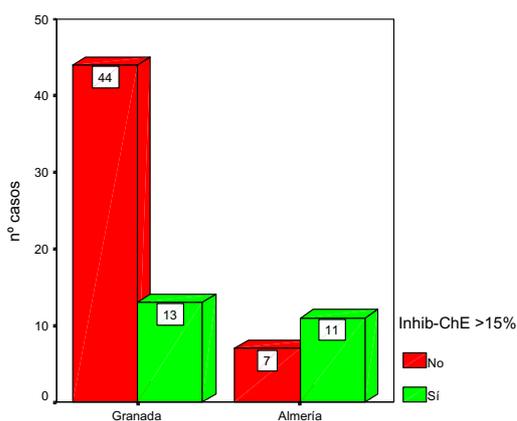
Como se puede ver, los fumigadores de Almería, tienen casi 10 veces más probabilidad

de inhibir la BeChE por encima de un 15% que los de Granada. Este mismo resultado se intuía al realizar el análisis bivariante mediante tablas de contingencia, como se expresa a continuación:

Recuento

		Inhib-ChE >15%		Total
		No	Sí	
Fumigadores	Granada	44	13	57
	Almería	7	11	18
Total		51	24	75

$$\chi^2 = 9.22; p = 0.002; OR: 5.32 \text{ (IC 95\%: 1.72-16.49)}$$



Este hecho, en principio sorprendente, puede reflejar diferencias en el patrón de exposición a plaguicidas entre los fumigadores de Granada y los de Almería, cultivos diferentes que exigirían aplicación de fitosanitarios en distintos momentos, etc.

El análisis de regresión lineal múltiple, utilizando como variable dependiente el porcentaje de inhibición de la BeChE y como predictoras la edad, IMC, tabaco, alcohol, alelo B PON1, sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, años de exposición, exposición a OPs, protección durante el caldo y durante la fumigación no alcanza ningún modelo significativo. Sin embargo, si se introduce como variable predictora adicional el % de inhibición de AChE entre los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados, entonces se obtiene el siguiente modelo:  $R^2$  corregida: 0.065,  $n= 62$ ,  $p= 0.026$ :

	B	Sig.	Correlación Parcial
% Inhibición AChE	-,181	,026	-,283

Se aprecia que los individuos con un mayor porcentaje de inhibición de AChE presentan un menor porcentaje de inhibición de BeChE, que tal y como se ha explicado anteriormente obedece al diferente patrón de exposición a plaguicidas por modelos de cultivo diferentes en las zonas de Granada y Almería.

#### 4. ENZIMAS ANTIOXIDANTES INTRAERITROCITARIAS

Algunos estudios “in vitro” en los que se incubó sangre con diversos plaguicidas han mostrado una inhibición de diversos enzimas intraeritrocitarios (Altuntas et al, 2003; Dowla et al, 1996). Por el contrario, estudios “in vivo” han hallado efectos opuestos, contradictorios. Así, el incremento de actividad enzimática se ha explicado en función de una mayor expresión de la enzima tras ser activado su gen correspondiente por las ERO; es decir, sería una respuesta adaptativa o fisiológica del organismo para defenderse frente a un mayor insulto oxidativo. Por el contrario, los descensos de actividad suelen justificarse como el resultado de una inhibición enzimática, directa o indirecta, por parte de las ERO generadas o, alternativamente, por una lesión de la membrana plasmática que favorecería la liberación al medio extracelular de determinadas enzimas intraeritrocitarias solubles presentes en el citoplasma.

De forma llamativa, existen también estudios en los que otros xenobióticos distintos de los plaguicidas se han relacionado con un mayor estrés oxidativo, destacando especialmente metales pesados como el cadmio (Sarkar et al, 1997) o el plomo (Sandhir et al, 1995). Recientemente también se ha asociado el estrés oxidativo con el consumo de drogas, como p.ej. el éxtasis (Zhou et al, 2003) o la cocaína (Moritz et al, 2003). Así, por ejemplo, el parkinson asociado al consumo crónico de MDMA (Kuniyoshi y Jankovic, 2003; Mintzer et al, 1999) sería el resultado de la generación de estrés oxidativo en la vía nigro-estriada del cerebro, al igual que ocurre con el parkinsonismo asociado experimental y epidemiológicamente al paraquat, herbicida modelo en cuanto a la generación de este tipo de insulto tóxico (Reiter et al, 1997).

#### 4.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

En nuestro estudio se ha observado que la actividad G6PDH de los fumigadores es significativamente más alta que la de los controles en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (Tabla 1). Al clasificar los fumigadores por lugar de procedencia se observó que este efecto se debía sólo al grupo de Almería. El aumento de la actividad G6PDH puede interpretarse como una respuesta adaptativa o fisiológica en el ciclo de defensas enzimáticas antioxidantes derivada de un mayor estrés oxidativo inducido por la exposición a plaguicidas. Su objetivo sería aumentar los niveles intraeritrocitarios de NADPH o, también, normalizar niveles potencialmente bajos de dicho coenzima producidos por una disminución de glucosa con objeto de facilitar la regeneración de GSH a partir de GSSG, reacción catalizada por la GR y que consume NADPH como coenzima.

Como la G6PDH no es susceptible a la inactivación por ERO (Slaughter et al, 2002), la exposición a plaguicidas no origina un descenso de su actividad, por lo que se puede descartar un efecto directo del insulto oxidativo. En cualquier caso, la mayor actividad G6PDH de los individuos expuestos está en línea con el aumento de G6PDH observado por Kiran et al (1990) tras administrar endosulfán a ratas. Por el contrario, se han descrito resultados opuestos en eritrocitos de ratas tratadas con organofosforados (Thapar et al, 2002; Datta et al, 1992), otros organoclorados como HCH (Agrawal et al, 1991) y ácido 4-clorofenoxiacético (Aliciguzel et al, 2001).

La G6PDH ha mostrado también diferencias en función del sexo, ya que las mujeres presentan niveles significativamente más bajos que los hombres en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados. Teniendo en cuenta que la muestra de fumigadores está constituida mayoritariamente por hombres, la mayor actividad G6PDH que presenta dicho grupo podría estar sesgada por el sexo. Si esta explicación fuese cierta, debería observarse el mismo efecto

en el subgrupo de fumigadores de Granada, que está compuesto en su totalidad por hombres. Sin embargo, éste no presenta diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguno de los dos momentos del ciclo de fumigación. Otra interpretación posible es que las mujeres, al tener un valor de hematocrito inferior al de los hombres, pueden presentar menor actividad G6PDH, ya que ésta ha sido determinada en eritrocitos y su actividad expresada en U/g Hb.

No se han observado diferencias en la G6PDH al comparar por sintomatología relacionada con exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa o utilización de diferentes tipos de plaguicidas. La única asociación observada ha sido con la adopción de medidas de protección durante el proceso de fumigación, pues aquellos individuos que se protegen presentan una G6PDH significativamente más alta en el periodo de mayor exposición (M-1). Estos resultados no se pueden explicar según lo comentado anteriormente al hablar del posible efecto de la exposición a plaguicidas sobre la G6PDH. Hay que tener en cuenta que no existen diferencias entre ambos subgrupos de fumigadores (Granada y Almería) en cuanto al nivel de protección durante la fumigación ( $p=0.110$ ); sin embargo, sí las hay al comparar por protección durante la preparación del caldo ( $p=0.014$ ), ya que los fumigadores de Granada se protegen 2.74 veces más que los de Almería (IC 95%: 1.21-6.21).

El análisis multivariante ha mostrado que la exposición a plaguicidas no es predictor de la actividad G6PDH en ninguno de los dos periodos del ciclo de fumigación. Las únicas variables asociadas son el sexo y la edad, que presentan una asociación inversa con la G6PDH en M-2 (Tabla 7). El segundo modelo multivariante, realizado sólo sobre los fumigadores e incorporando variables predictoras de tipo ocupacional ha puesto de manifiesto que el único determinante de la actividad G6PDH es la protección durante el proceso de fumigación en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (Tabla 9), confirmando así el resultado previo.

Según este hallazgo, la exposición a plaguicidas podría modificar indirectamente la actividad G6PDH, en el sentido de que la adopción de medidas de protección por parte de los fumigadores conllevaría una menor absorción de plaguicidas, menor inducción de estrés oxidativo y, por tanto, menor peroxidación lipídica de la membrana plasmática de los eritrocitos. En consecuencia no se verterían enzimas citosólicos (como G6PDH) de forma que sus niveles intraeritrocitarios se mantendrían. No obstante, esta interpretación sería más sólida si se hubiera observado también una asociación directa con la exposición a plaguicidas en el análisis multivariante, cosa que no ha ocurrido.

Posteriormente se calculó el porcentaje de descenso de la actividad G6PDH entre los dos periodos del ciclo de fumigación y se escogió un 15% como punto de corte. Esto permitió realizar el correspondiente análisis de regresión logística, utilizando como variables predictoras la edad, sexo, IMC, tabaco, alcohol, alelo B PON1, exposición, inhibición AChE >15% e inhibición BeChE >15% (n= 93). La única variable asociada es el sexo, pues tal y como se ve a continuación, las mujeres tienen 3.24 veces más probabilidad que los hombres de presentar un descenso de G6PDH por encima de un 15% entre los dos periodos del ciclo de fumigación.

<i>Variable</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>		<i>p</i>
		<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	
SEXO	3,24	0,96	10,95	0.058

Si se introducen variables ocupacionales como predictoras (sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos agentes, años de profesión, exposición a OPs, protección durante el caldo y durante la aplicación), entonces no se alcanza ningún modelo significativo.

---

En definitiva, de nuestro estudio parece desprenderse que la G6PDH no se modifica por la exposición a plaguicidas, aunque es posible que exista un cierto efecto indirecto a tenor de la mayor actividad que presentan los individuos que hacen uso de medidas de protección personal durante el proceso de fumigación.

#### **4.2. Glutathion reductasa (GR)**

En nuestro estudio se ha puesto de manifiesto una disminución de la actividad GR en los individuos expuestos (fumigadores) con respecto a los controles en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tabla 2). Al estratificar por lugar de procedencia de los individuos expuestos se observa que los dos subgrupos de fumigadores (Granada y Almería) presentan niveles más bajos de GR que los controles en los dos periodos del ciclo de fumigación, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Se han observado también diferencias por sexo, pues los hombres presentaban niveles significativamente más bajos que las mujeres en M-2. Como la mayoría de los individuos expuestos son hombres es posible que tales diferencias se deban a la distorsión producida por el sexo. Con respecto a las demás variables estudiadas, especialmente aquellas de índole ocupacional, sólo se ha observado que los fumigadores que utilizan OPs presentan niveles significativamente más bajos de GR en M-2.

Existe, por tanto, cierto paralelismo entre el comportamiento de la GR y el de la AChE (aunque no existe correlación entre ambas, ver Tablas 3 y 4), lo cual parece sugerir que tanto una como otra podrían ser marcadores útiles de la exposición crónica a plaguicidas. Una posible interpretación de este efecto es que la exposición a plaguicidas por parte de los

fumigadores origina cierto grado de estrés oxidativo capaz de desbordar las defensas antioxidantes de los eritrocitos y, por tanto, de producir peroxidación lipídica de la membrana celular. En consecuencia, el deterioro de la misma ocasionaría un vertido o liberación de enzimas citosólicas (como es el caso de la GR), lo que conduciría a una menor actividad intraeritrocitaria de las mismas.

Desde el punto de vista bioquímico, al disminuir la actividad GR se produce una menor tasa de regeneración de glutation reducido (GSH), dando lugar a niveles relativamente bajos del mismo. Quizás por ello se ha observado también un aumento de la G6PDH en los individuos expuestos a plaguicidas, como posible mecanismo de compensación. De todas formas, no parece que esta menor actividad GR en los individuos con mayor exposición a plaguicidas sea lo suficientemente importante en términos cuantitativos como para revestir una especial relevancia toxicológica. Su interés vendría derivado como un posible biomarcador de efecto.

El análisis multivariante ha mostrado que la exposición a plaguicidas es la principal variable predictora de la GR y ello independientemente del sexo, entre otras posibles variables de confusión (Tabla 7); siendo la asociación algo más fuerte en M-1. La interpretación que puede hacerse de este hallazgo, además de la mencionada anteriormente, es que puede ser el resultado de un efecto directo de los plaguicidas sobre la GR o, alternativamente, se trata de una modulación negativa resultante de un posible desajuste en el ciclo de los enzimas antioxidantes. En este sentido, hay que recordar que la exposición a OPs se asociaba a una menor actividad GR.

En cualquier caso, el hallazgo de una menor actividad GR en los fumigadores así como de una asociación inversa con la utilización de OPs, es consistente con estudios

---

experimentales previos en los que se ha observado un descenso de GR en eritrocitos de rata tras la administración de diversos tipos de plaguicidas, como: fosforamidón (Datta et al, 1992), endosulfán (Cereser et al, 2001) o tiram, un fungicida ditiocarbamato (Naqvi y Vaishnavi, 1993), aunque este último caso se trata de un ensayo “in vitro” con cultivos celulares.

Existen otros estudios experimentales en los que, por el contrario, se ha observado el efecto opuesto, es decir, un aumento de la GR tras la administración de diversos OPs, tales como acefato (Thapar et al, 2002) o malatión (Ahmed et al, 2000). Estos resultados contradictorios dificultan la realización de una correcta interpretación de los resultados.

Al someter nuestros datos a otro modelo de regresión en el que se incluyen, además, variables predictoras de tipo ocupacional (Tabla 9), se ha observado una asociación directa con el alelo B de PON1 y una asociación inversa con el consumo de tabaco en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Es interesante destacar que aquellos individuos portadores de dicho alelo B (es decir, los fenotipos de mayor actividad catalítica –BB y AB-) presentan niveles más altos de GR. Asimismo, dichos individuos suelen presentar una menor tasa de hidrólisis de diazoxón (Davies et al, 1996), lo cual puede explicar la correlación inversa que hemos observado entre las actividades GR y DZOasa en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (Tabla 3). Este interesante hallazgo apoya la utilidad del fenotipado sérico de PON1 como marcador de susceptibilidad a plaguicidas OPs en individuos con exposición crónica a los mismos. En cuanto al efecto del consumo de tabaco, es un hecho perfectamente conocido que la combustión del tabaco genera una gran cantidad de sustancias oxidantes, responsables de un mayor estrés oxidativo que puede afectar o interferir la actividad GR (Kim et al, 2003).

Finalmente se ha construido la variable porcentaje de descenso de la actividad GR

entre los dos periodos del ciclo de fumigación y se escogió un 15% como punto de corte. El análisis de regresión logística paso a paso del descenso de GR superior al 15% incluyó las siguientes predictoras: edad, IMC, tabaco, alcohol, alelo B PON1, sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa por estos compuestos, años de exposición, exposición a OP, protección durante el caldo y durante la fumigación, inhibición AChE >15%, inhibición BeChE >15%, mostró el siguiente resultado (n= 61):

<i>Variable</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>		<i>p</i>
		<i>Inf.</i>	<i>Sup.</i>	
Protecc. durante caldo	0,29	0,08	1,03	0.561

Lo que significa que los individuos que utilizan medidas de protección personal durante la preparación del caldo (dilución y mezcla de los plaguicidas) tienen aproximadamente de 3 a 4 veces menos riesgo de sufrir un descenso de la actividad GR superior a un 15%. Esto apoya la observación inicial de una posible afectación de esta actividad enzimática como consecuencia de la exposición a plaguicidas.

### 4.3. Catalasa (CAT)

En el presente estudio no se han observado diferencias en la CAT entre los individuos expuestos a plaguicidas y los controles (Tabla 2). Sin embargo, al clasificarlos por lugar de procedencia, el subgrupo de Granada presenta niveles significativamente más bajos que el de Almería y los controles en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados.

No se han observado diferencias significativas al comparar por sexo, sintomatología

---

relacionada con la exposición crónica a plaguicidas o intoxicación previa por estos compuestos. En cambio, los individuos que utilizan OPs presentan una CAT significativamente más baja en M-2 con respecto a los que no lo hacen. El hecho de que el subgrupo de fumigadores de Granada haga un mayor uso de OPs ( $p < 0.001$ ), puede explicar su menor actividad CAT. Por el contrario, los individuos que utilizan agentes anticolinesterásicos (es decir, carbamatos y/o OPs) presentan niveles de CAT significativamente más altos en M-1, hallazgo que parece contradictorio con lo que se acaba de comentar. También se ha observado que los individuos que utilizan medidas de protección durante el proceso de fumigación presentan una CAT significativamente más alta en M-2 con respecto a los que no las utilizan. Hay que tener en cuenta que el subgrupo de fumigadores de Granada hace más uso de medidas de protección que el de Almería (de forma significativa durante la preparación del caldo). Este hallazgo parece indicar que la adopción de medidas de protección personal impide, en cierta medida, la absorción de plaguicidas disminuyendo así el riesgo de estrés oxidativo. Por tanto, indirectamente se evita el descenso de actividad CAT.

De los resultados del presente estudio parece desprenderse que la exposición crónica a plaguicidas se asocia, de forma indirecta, a un descenso de la CAT sobre todo el subgrupo de fumigadores que hace un mayor uso de OPs. Este resultado es consistente con los hallazgos de Zhou et al (2002) quienes, al igual que nosotros, también encuentran una correlación positiva entre la CAT y AChE; no obstante, el descenso de la CAT observado por estos autores fue en intoxicaciones agudas. Por el contrario, la mayoría de los estudios encuentran un incremento de CAT en eritrocitos humanos, tanto en exposición crónica a diversos plaguicidas (Prakasam et al, 2001) como en intoxicaciones agudas por OP, organoclorados y carbamatos (Banerjee et al, 1999). Es posible que el descenso de la CAT pueda obedecer a un bloqueo de sus grupos sulfhidrilo, que parecen jugar un papel destacado en su actividad catalítica (Morikofe-Zwez et al, 1969). Algunos estudios han indicado que los radicales superóxido pueden inhibir la actividad CAT (Kono y Fridovich, 1982) y el exceso de peróxido de hidrógeno resultante

podría finalmente inhibir también la SOD. Por otro lado, algunos OP (como el fosforamidón) aumentan significativamente la CAT (y también la GPx y SOD) “in vitro”, de manera que protegen la membrana eritrocitaria frente al ataque oxidativo (Datta et al, 1992).

Sin embargo, el análisis multivariante realizado en nuestro estudio no confirma el posible descenso de la CAT, pues la variable exposición no es un determinante significativo de la misma. Las únicas variables que se asocian significativamente a la CAT son la edad y el sexo en M-1 y el IMC en M-2 (Tabla 7). En cambio, otros estudios no han encontrado relación con la edad (Kasapoglu y Ozben, 2001).

Al incluir en un nuevo modelo multivariante variables predictoras de tipo ocupacional, tal y como se ha hecho de forma sistemática en este estudio, no se obtiene información adicional de interés, pues las únicas variables que predicen la CAT son la edad en M-1 y el IMC en M-2, estando ambas asociadas de forma inversa (Tabla 9). Si en el modelo se incluyen indicadores indirectos de la exposición, tales como inhibición de AChE >15% y de BeChE >15%, se observa que además del IMC el alelo B de PON1 se asocia también de forma inversa a la CAT mientras que la adopción de medidas de protección durante la fumigación muestra una asociación directa (modelo en M-2:  $R^2$  corregida = 0.168,  $p=0.003$ ,  $n=62$ ). De todo ello resulta especialmente llamativo que los portadores del alelo B de PON1 (fenotipos BB y AB) presentan una menor actividad CAT. Este hallazgo no es consistente con el aumento de CAT observado en portadores del alelo B de PON1, aunque en este caso la actividad enzimática se determinó en suero no en eritrocitos (Sozmen et al, 2001).

Si se construye como nueva variable el porcentaje de descenso de la actividad CAT entre los dos periodos del ciclo de fumigación ( $[M_2-M_1/M_2]*100$ ), y posteriormente se utiliza un límite de corte del 15% y se hace una regresión logística múltiple no se obtiene ningún

---

modelo significativo.

#### 4.4. Glutation peroxidasa (GPx)

Se ha observado que la actividad GPx de los fumigadores es significativamente mayor que la de los controles (Tabla 2). Al clasificar por lugar de procedencia, los individuos de Granada presentan niveles significativamente más altos en M-1 y los de Almería en M-2. Esto apunta a que la GPx aumenta en los periodos de mayor exposición a plaguicidas para cada subgrupo de fumigadores (M-1 para el de Granada y M-2 para el de Almería según se dedujo de los resultados de la AChE, parámetro tomado como referencia). En principio, este resultado es consistente con el de otros estudios “in vivo” realizados también en fumigadores con exposición crónica a plaguicidas (Prakasam et al, 2001) e individuos con intoxicación aguda por diversos plaguicidas (Banerjee et al, 1999). Sin embargo, desde el punto de vista molecular, los radicales superóxido son capaces de inhibir la GPx (Blum y Fridovich, 1985), aunque diversos OPs, como por ejemplo el clorpirifós-etil, pueden activar dicha actividad enzimática “in vitro” y, a la vez, inhibirla por generar estrés oxidativo (radicales superóxido), aunque predomina lo primero (Gultekin et al, 2001). Probablemente el aumento de GPx constituya un intento de proteger la membrana de los eritrocitos frente al insulto oxidativo.

No se han observado diferencias de la GPx al comparar por sexo o por intoxicación previa por plaguicidas. Sin embargo, los fumigadores que presentan sintomatología relacionada con la exposición crónica a estos agentes muestran niveles significativamente más bajos de GPx en M-2. Asimismo, los individuos que utilizan OPs presentan niveles significativamente más bajos de GPx, lo cual es consistente con estudios previos en los que se administraban estos agentes a ratas (Datta et al, 1992; Altuntas et al 2002 y 2003). Por otro lado, la utilización de medidas de protección durante la preparación del caldo o la fumigación

no modifica la actividad GPx.

El análisis de correlación mostró una asociación inversa de la GR con la AChE en el periodo de mayor exposición a plaguicidas (Tabla 3), lo cual se ha descrito previamente en intoxicaciones agudas por OPs (Zhou et al, 2002), aunque la asociación hallada por estos autores es directa.

Los análisis multivariantes realizados no confirman ninguno de estos hallazgos, pues no se ha alcanzado ningún modelo significativo en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tablas 7 y 9). Ni siquiera al introducir en los modelos los porcentajes de inhibición de AChE o BeChE superior al 15% como marcadores indirectos de exposición se obtiene asociación significativa.

Posteriormente se ha construido la variable “porcentaje de descenso de la actividad GPx entre los dos periodos del ciclo de fumigación” (calculado de la siguiente forma:  $100 \cdot [M_2 - M_1] / M_2$ ) y se ha escogido un 15% como límite de corte. Esto ha permitido realizar un análisis de regresión logística con esta nueva variable, utilizando como predictores la edad, IMC, consumo de tabaco, consumo de alcohol, alelo B de PON1, sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas, intoxicación previa, años de exposición, utilización de OP, protección durante el caldo y durante la fumigación, inhibición AChE >15% e inhibición BeChE >15%, muestra el siguiente resultado (n= 58):

---

<i>Variable</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>		<i>p</i>
		<i>Inf.</i>	<i>Sup.</i>	
Alcohol	0,25	0,07	0,93	0.039

Como se puede ver, los individuos que consumen alcohol tienen 4 veces menos riesgo de disminuir la GPx por debajo de un 15%. No obstante, este hallazgo carece asimismo de relevancia de cara a los objetivos del presente estudio. Estudios previos han hallado que el consumo importante de alcohol, tanto en duración como en cantidad, disminuye la actividad GPx eritrocitaria (Zhou y Chen, 2001).

En definitiva, de la valoración de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que la GPx no experimenta ninguna modificación relevante como consecuencia de la exposición a plaguicidas.

#### **4.5. Superóxido dismutasa (SOD)**

En el presente estudio se ha observado que los fumigadores presentaban niveles significativamente más bajos de SOD que los controles en los dos periodos del ciclo de fumigación estudiados (Tabla 2). Dentro de los fumigadores, la actividad más baja corresponde al subgrupo de Granada. Estos datos sugieren que la exposición a plaguicidas modifica la actividad SOD, lo cual es consistente con estudios previos tanto “in vitro” (Dowla et al, 1996) como “in vivo” (Panemangalore et al, 1999). No obstante, existen otros estudios donde se ha observado el efecto opuesto, es decir, un aumento de la SOD en fumigadores con más de 5 años de exposición a plaguicidas (Prakasam et al, 2001).

El descenso de la SOD puede explicarse como consecuencia del estrés oxidativo

inducido por los plaguicidas (Gultekin et al, 2001). Estudios previos indican que los radicales superóxido pueden inhibir la actividad CAT (Kono y Fridovich, 1982) y GPx (Blum y Fridovich, 1985) y que el consiguiente aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría inhibir finalmente la actividad SOD. En consecuencia, se acumularía más O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, de manera que se cerraría así un círculo pernicioso. Pero además, la SOD y CAT pueden ser inhibidas también por el oxígeno singlete y radicales peróxidos (Escobar et al, 1996).

La inhibición de SOD conduce a la acumulación de radicales libres en eritrocitos y en otros tejidos. El acúmulo intra y extracelular de radicales libres produce lesión tisular por medio de diferentes procesos, entre ellos: incremento de los procesos inflamatorios, lesión secundaria a isquemia-reperfusión, inhibición de la función mitocondrial con el consiguiente descenso de la producción de ATP (energía celular) y peroxidación lipídica de la membrana eritrocitaria (Dowla et al, 1996).

La oxidación de moléculas celulares que contienen grupos tiólicos podría tener una gran importancia en la citotoxicidad de los plaguicidas. Estos, al interactuar con numerosas proteínas y enzimas que ejercen un papel clave en la función celular, pueden dar lugar a lesión y posterior muerte celular.

En nuestro estudio se ha observado que la SOD de los hombres es menor que la de las mujeres, diferencia que es significativa en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Teniendo en cuenta que la mayoría de los fumigadores de nuestro estudio son hombres, el sexo podría actuar como variable de confusión sobre la exposición.

Hemos observado también que los fumigadores que presentan sintomatología

---

relacionada con la exposición crónica a plaguicidas tienen niveles más bajos de SOD en M-2 (diferencias al borde de la significación estadística). Por otro lado, se han observado niveles significativamente más bajos en los individuos que utilizan OPs y más altos (al borde de la significación estadística) en aquellos que utilizan medidas de protección durante la fumigación en M-1. Esto último indica que la adopción de tales medidas preserva la SOD de sufrir un descenso en su actividad. Todos estos datos refuerzan la hipótesis de que la exposición a plaguicidas (especialmente a OPs) conduce a un descenso de la actividad SOD.

Hemos observado también una correlación directa entre la SOD y la AChE en M-1 (Tabla 3), lo cual ha sido documentado previamente (Zhou et al, 2002), y puede ser reflejo del efecto de la exposición, pues ambas actividades enzimáticas experimentan un descenso en el periodo de mayor exposición a plaguicidas. Por el contrario, en el de menor exposición presentan una asociación inversa (Tabla 4). Además, la SOD muestra también una correlación directa con el resto de enzimas eritrocitarias estudiadas.

El análisis multivariante confirma que la exposición a plaguicidas da lugar a un descenso de la actividad SOD (Tabla 7), tal y como se ha señalado previamente en escenarios similares (Panemangalore et al, 1999). Por tanto, este indicador bioquímico de estrés oxidativo podría ser útil como marcador de efecto en individuos con exposición laboral a plaguicidas. En M-1 se constata también que la edad y el consumo de tabaco predicen de forma significativa una menor actividad SOD, hecho que también ha sido observado previamente (Ozbay y Dulger, 2002). Esta relación que podría explicarse por la mayor generación de estrés oxidativo en ambas situaciones, lo que da lugar a una disminución de la actividad SOD como se ha comentado previamente.

Cuando el análisis multivariante se realizó introduciendo en el modelo variables

predictoras de tipo ocupacional (Tabla 9), el hallazgo más relevante es que los años de profesión como fumigador se asocian de forma inversa con la SOD, indicando en cierta forma que la exposición continuada a plaguicidas podría ejercer un efecto acumulativo sobre la SOD, disminuyendo gradualmente su actividad. Si en este mismo modelo multivariante se introducen, además, como variables predictoras la inhibición AChE >15% y de BeChE >15%, que reflejan de forma indirecta la exposición, se obtiene el siguiente modelo significativo en M-1: ( $R^2$  corregida = 0.146,  $p = 0.001$ ,  $n = 62$ ):

	B	Sig.	Correlación Parcial
Inhibición AChE>15%	-557,636	,001	-,400

Es decir, que la inhibición de la AChE por encima de un 15% predice de forma significativa niveles más bajos de SOD. Ello apoya en cierta forma un efecto indirecto de la exposición a plaguicidas, sobre todo OPs, sobre la actividad SOD.

En el caso de la SOD, al no existir diferencias significativas de su actividad entre M-1 y M-2 (ni de forma global, ni tampoco al comparar sólo controles o sólo expuestos) no se ha podido construir la variable “porcentaje de disminución de la actividad SOD entre los dos momentos del ciclo de fumigación”.

Finalmente, no hemos observado asociación entre el fenotipo PON1 y la SOD, lo cual es consistente con estudios previos (Sozmen et al, 2001).

**CONCLUSIONES**



1. En el análisis bivalente de las diferentes actividades enzimáticas estudiadas, tanto plasmáticas como eritrocitarias, se han observado diferencias estadísticamente significativas en la BeChE, DZOasa, AChE, G6PDH, GR, GPx y SOD al comparar los individuos expuestos a plaguicidas (fumigadores con respecto a los controles). Concretamente se ha hallado que los fumigadores presentan niveles significativamente más bajos de BeChE, DZOasa, AChE, GR y SOD que los controles. Por el contrario, presentan niveles más altos de G6PDH y GPx.
2. No se han observado diferencias significativas en el fenotipo plasmático de PON1 al comparar los fumigadores con los controles. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al fenotipo de BeChE, pues los fumigadores tienen 5.43 veces más probabilidad de presentar un fenotipo usual (UU) que los controles, lo cual puede indicar cierta presión ocupacional.
3. De acuerdo con la exploración clínica y la anamnesis, el 22.3% de la muestra de fumigadores estudiadas presentaba síntomas compatibles con exposición crónica a plaguicidas y el 30.6% tenía el antecedente de, al menos, una intoxicación por plaguicidas. Si sólo se consideran los compuestos anticolinesterásicos (OPs y carbamatos) ese porcentaje desciende hasta el 13.2% de los fumigadores.
4. El alelo B de PON1 (es decir, aquellos con fenotipo BB y AB) está asociado con las actividades POasa basal y salina, ArE, DZOasa, AChE y GR. Además, constituye un factor protector de la intoxicación por plaguicidas, pues aquellos fumigadores portadores de dicho alelo tienen unas 3 veces menos probabilidad de haber sufrido una intoxicación por estos agentes.

5. Se ha encontrado asociación entre diversas variables de tipo ocupacional y algunas actividades enzimáticas. Así, los fumigadores con intoxicación previa por plaguicidas presentan una mayor actividad POasa salina; los que utilizan OPs tienen una menor actividad AChE; los que adoptan medidas de protección personal están protegidos frente al descenso de POasa y G6PDH; y aquellos con más años de exposición profesional a plaguicidas muestran mayor AChE y menor SOD. Es difícil encontrar una explicación satisfactoria para alguna de estas asociaciones.
6. De forma general, este estudio confirma que la exposición crónica a plaguicidas en un entorno de agricultura intensiva origina estrés oxidativo que se manifiesta mediante un descenso de las actividades GR y SOD. Estos resultados apoyan la implicación del mismo en el mecanismo de acción de los plaguicidas.
7. En definitiva, de los datos del presente estudio se desprende que ambas colinesterasas (BeChE y AChE) son marcadores de exposición importantes y complementarios. La PON1 (utilizando el diazoxón como sustrato, actividad DZOasa) ha mostrado también ser un biomarcador de exposición y el alelo B de PON1 un biomarcador de susceptibilidad a plaguicidas. En cuanto a los enzimas eritrocitarios de estrés oxidativo, la GR y, sobre todo, la SOD parecen constituir importantes biomarcadores de efecto en el contexto de la exposición crónica a plaguicidas.
8. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se confirma la necesidad de determinar las dos colinesterasas (plasmática y eritrocitaria) en la vigilancia de

la salud de trabajadores expuestos a plaguicidas y se pone de manifiesto la conveniencia de incluir también el alelo B de PON1. Respecto a la SOD y GR consideramos que, de momento, no sería recomendable su inclusión en tales protocolos debido a su falta de especificidad, las dificultades metodológicas para su determinación y la necesidad de más estudios para su validación como marcadores de exposición y/o efecto.



## **BIBLIOGRAFÍA**



---

Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN.). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993; 52:598-608.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105: 121-126.

Agrawal D, Sultana P, Gupta GS. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Food Chem Toxicol* 1991; 29: 459-462.

Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 443-450.

Akgur SA, Ozturk P, Sozmen EY, Delen Y, Tanyalcin T, Ege B. Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in humans exposed to organophosphorous compounds. *J Toxicol Environ Health A* 1999; 58: 469-474.

Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 205-211.

Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health* 2004; 25: 155-97.

---

Aliciguzel Y, Ozdem S, Demir AY, Unal F, Kumbul D, Ozdem SS, Perry G, Smith MA. Effect of the herbicide 4-CPA on human erythrocyte antioxidant enzymes in vitro. *Redox Rep* 2001; 6: 153-154.

Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 681-685.

Altuntas I, Delibas N, Doguc DK, Ozmen S, Gultekin F. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2003; 17: 153-157.

Álvarez E, Aurrekoetxea JJ, Santa Marina L, Marzana I. Exposición a plaguicidas organofosforados en trabajadores de invernaderos del país Vasco. *Med Clin (Barc)* 1993; 101: 681-683

Andersen H, Nielsen J, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative Enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997, 43: 562-568.

Anwar WA. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ Health Perspect* 1997; 801-806.

Apra C, Sciarra G, Sartorelli P, Mancini R, Di Luca V. Environmental and biological monitoring of exposure to mancozeb, ethylenethiourea, and dimethoate during industrial

---

formulation. *J Toxicol Environ Health* 1998; 53: 263-281

Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 892-904

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 1995; 104: 129-140

Ballantyne B, Marrs CT. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. London, Butterworth Heinemann, 1992

Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health* 2001; 16: 1-40.

Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999; 107: 33-47.

Bebe FN, Panemangalore M. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J Environ Sci Health B* 2003; 38: 349-363.

---

Bhatnagar VK, Saigal S, Singh SP, Khemani LD, Malviya AN. Survey amongst workers in pesticide factories. *Toxicol Lett* 1982; 10: 129-132

Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems: a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 45: 371-385

Blum J y Fridovich I, Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 500-8

Bukowska B, Chajdys A, Duda W, Duchnowicz P. Catalase activity in human erythrocytes: effect of phenoxyherbicides and their metabolites. *Cell Biol Int* 2000; 24: 705-711

Cabello T. Utilización de pesticidas en cultivos de invernaderos del sur de España y análisis de los riesgos tóxicos y medio ambientales. *Phytoma* 1996; 75: 11-19

Carlock LL, Chen WL, Gordon EB, Killeen JC, Manley A, Meyer LS, Mullin LS, Pendino KJ, Percy A, Sargent DE, Seaman LR, Svanborg NK, Stanton RH, Tellone CI, Van Goethem DL. Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. *J Toxicol Environ Health* 1999; 2: 105-160

Castillo C, Benedito JL, Lopez-Alonso M, Miranda M, Hernández J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet* 2001; 33: 5-20

---

Cereser C, Boget S, Parvaz P, Revol A. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology* 2001; 163: 153-162.

Cherry N, Mackness M, Durrington P, Povey A, Dippnall M, Smith T, Mackness B. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet* 2002; 359: 763-764.

Choi SM, Yoo SD, Lee BM. Toxicological characteristics of endocrine disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J Toxicol Environ Health B* 2004; 7: 1-32.

Ciesielski S, Loomism DP, Mims SR, Auer A. Pesticide exposures, cholinesterase depression, and symptoms among North Caroline migrant farmworkers. *Am J Public Health* 1994; 84: 446-451

Clarke EE, Levy LS, Spurgeon A, Calvert IA. The problems associated with pesticide use by irrigation workers in Ghana. *Occup Med (Lond)* 1997; 47: 301-308

Costa LG, McDonald BE, Murphy SD, Omenn GS, Richter RJ, Motulsky AG, Furlong CE. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 103: 66-76

---

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 541-550.

Datta C, Gupta J, Sarkar A, Sengupta D. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian J Exp Biol* 1992; 30: 65-67

Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996; 14: 334-336.

Delgado-Rodríguez, M. *Efectos crónicos de los fitosanitarios*. En: Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas. Guillén J, Serrano JL (eds). Consejería de Salud de la Junta Andalucía, Sevilla, 2003, pp 87-96

Desi I, Palotas M, Vetro G, Csolle, Nehez M, Zimanyi M, Ferke A, Huszta E, Nagymajtenyi L. Biological monitoring and health surveillance of a group of greenhouse pesticide sprayers. *Toxicol Lett* 1986; 33: 91-105

Deutsch SI, Mohs RC, Levy MI, Rothpearl AB, Stockton D, Horvath T, Coco A, Davis KL. Acetylcholinesterase activity in CSF in schizophrenia, depression, Alzheimer's disease and normals. *Biol Psychiatry* 1983; 18: 1363-1373

Domenech CE, Machado de Domenech EE, Balegno HF, de Mendoza D, Farias RN. Pesticide

---

action and membrane fluidity. Allosteric behavior of rat erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase in the presence of organophosphorus compounds. *FEBS Lett* 1977; 74: 243-246

Dossing M. Non-invasive assessment of microsomal enzyme activity in occupational medicine: present state of knowledge and future perspectives. *Int Arch Occup Environ Health* 1984; 53: 205-218.

Dowla HA, Panemangalore M, Byers ME. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996; 31: 107-114.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-33442

Dwivedi PD, Das M, Khanna SK. Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 437-444

Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 214-227.

Ellman GL, Courtney DK, Andres V Jr, Featherstone RM. A New rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.

---

Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA. Sod and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 285-290

FAO. *Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas*. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación, 1986

Fernández Soriano MA. *Estudio epidemiológico y analítico sobre la exposición ambiental a pesticidas y su repercusión materno-fetal durante el embarazo y parto*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 1995.

Furlong CE, Li WF, Costa LG, Richter RJ, Shih DM, Lulis AJ. Genetically determined susceptibility to organophosphorus insecticides and nerve agents: developing a mouse model for the human PON1 polymorphism. *Neurotoxicology* 1998; 19: 645-650

Furlong CE, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lulis AJ, Alleva E, Costa LG. Genetic and temporal determinants of pesticide sensitivity: role of paraoxonase (PON1). *Neurotoxicology* 2000a; 21: 91-100

Furlong CE, Li WF, Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Shih DM, Lulis AJ, Costa LG. The PON1 gene and detoxication. *Neurotoxicology* 2000b; 21: 581-587

Gabbianelli R, Falcioni G, Nasuti C, Cantalamessa F. Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology* 2002; 175: 91-101

---

Gallo MA, Lawryk NJ. *Organic phosphorus pesticides*. En: Hayes WJ Jr, Laws ER Jr (eds) *Handbook of Pesticide Toxicology*. London, Academic Press, 1991; 2: 917-1123.

Garry VF, Kelly JT, Sprafka JM, Edwards S, Griffith J. Survey of health and use characterization of pesticide applicators in Minnesota. *Arch Environ Health* 1994; 49: 337-343

Geldmacher-Von Mallinckrodt M, Diepgen TL. 1988. The human serum paraoxonase polymorphism and specificity. *Toxicol Environ Chem* 1988; 18: 79-196

Giray B, Gurbay A, Hincal F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett* 2001; 118: 139-146

Goldberg DM, Spooner RJ. *Glutathione reductase*. En: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßi M (eds), Verlag Chemie, Weinheim, 1984, vol. III, pp.258-265

Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Weisman RS, Howland MA. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. Prentice-Hall International Inc, London. 1990

Gomes J, Lloyd O, Revitt DM, Norman JN. Erythrocyte cholinesterase activity levels in desert farm workers. *Occup Med (Oxf)* 1997; 47: 90-94

Gomes J, Lloyd O, Revitt MD, Basha M. Morbidity among farm workers in a desert country

in relation to long-term exposure to pesticides. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24: 213-219

Gomes J, Lloyd OL, Revitt DM. The influence of personal protection, environmental hygiene and exposure to pesticides on the health of immigrant farm workers in a desert country. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 40-45.

Gómez Vidal MA. *Riesgos sobre la salud derivados de la exposición crónica a plaguicidas: importancia de los marcadores bioquímicos*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2000

Guillén-Enriquez, Serrano JL, Candau A, Camino F, Parrón T, Marín P, Gómez C. *Programa de vigilancia epidemiológica de los efectos agudos en la Salud del uso de sustancias plaguicidas en Andalucía*. En: Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas. Guillén J, Serrano JL (eds). Consejería de Salud de la Junta Andalucía, Sevilla, 2003, pp 29-54

Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 2001; 75: 88-96

Gupta A, Gupta A, Shukla GS. Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain. *J Appl Toxicol* 1998; 18: 71-77

Gutteridge JMC. Oxygen radicals, transition metals and ageing. *Advances in age pigments*

---

research. *New York: Pergamon Press*; 1994: 22.

Guzelian PS, Vranian G, Boyland JJ, Chon WJ, Blaak RV. Liver structure and function in patients poisoned with chlordecone. *Gastroenterology* 1980; 78: 206-213.

Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157: 227-233

Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed, Clarendon Press, Oxford, 1999

He F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65 (1 Suppl): S69-S76

Hernandez AF, Gomez MA, Pena G, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *J Toxicol Environ Health A* 2004; 67: 1095-1108

Hernandez AF, Gonzalvo MC, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in a Spanish population. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120:201-209

---

Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, Lopez O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parron T, Serrano JL, Mackness MI. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22: 565-574

Hernández AF, Pla A, Villanueva E. *Incidencia de las intoxicaciones agudas por pesticidas en la zona sur-oriental de España. Aspectos toxicológicos*. En: Actes des IX Journées Internationales Méditerranéennes de Médecine Légale. Umani G, Giordano P (eds). Collana di studi di Medicina Legale science criminologiche e sociali, n° 6. Ed. Colosseum, Roma, 1990, pp 390-400

Hernández AF. *Plaguicidas*. En: Medicina del Trabajo. Gil F (ed), Masson, Barcelona, 2005 (en prensa).

Hernández A, Pla A. *Toxicidad de los plaguicidas* En: Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas. Guillén J, Serrano JL (eds). Consejería de Salud de la Junta Andalucía, Sevilla, 2003, pp 7-27

Hodgson E, Levi PE. Pesticides: An important but underused model for the environmental health sciences. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 97-106

Hotopf M, Mackness MI, Nikolaou V, Collier DA, Curtis C, David A, Durrington P, Hull L, Ismail K, Peakman M, Unwin C, Wessely S, Mackness B. Paraoxonase in Persian Gulf War veterans. *J Occup Environ Med* 2003; 45: 668-675

---

Hruska AJ, Corriols M. The impact of training in integrated pest management among Nicaraguan maize farmers: increased net returns and reduced health risk. *Int J Occup Environ Health* 2002; 8: 191-200

Hsu CH, Chi BC, Liu MY, Li JH, Chen CJ, Chen RY. Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. *Toxicology* 2002; 179: 1-8

Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993; 3: 73-76

Hunt C, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Kapp-Herr CV, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 1998; 58: 3986-3992

Jaga K, Dharmani C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14: 171-185

Jarvik GP, Jampsa R, Richter RJ, Carlson CS, Rieder MJ, Nickerson DA, Furlong CE. Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 291-295

Jensen FS, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J. Identification of human plasma cholinesterase variants in 6.688 individuals using biochemical analysis. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 157-62

---

John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 500-504

Jonhson MK. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potencial. *Arch Toxicol* 1977; 37: 113-115

Junge W, Klees H. *Arylesterase*. En: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßi M (eds), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, vol. IV, pp. 8-14

Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 1999; 105: 197-205

Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, Taki K, Saito I, Wang H, Itohara S, Yamada T, Ichihara G, Shibata E, Nakajima T, Takeuchi Y. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J Occup Health* 2004; 46: 109-118

Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol*. 2001; 36: 209-220

Kashyap SK, Jani JP, Saiyed HN, Gupta SK. Clinical effects and cholinesterase activity changes in workers exposed to phorate (Thimet). *J Environ Sci Health B* 1984; 19: 479-489

---

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48

Keifer MC. Effectiveness of interventions in reducing pesticide overexposure and poisonings. *Am J Prev Med* 2000; 18 (4 Suppl): 80-89

Kim SH, Kim JS, Shin HS, Keen CL. Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea. *Nutrition* 2003; 19: 240-243

Kiran R, Varma MN. Age related toxic effects of endosulfan on certain enzymes of rat erythrocytes. *Indian J Exp Biol* 1990; 28: 694-696

Koner BC, Banerjee BD, Ray A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J Exp Biol* 1998; 36: 395-398

Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982; 257: 5751-5754

Kossmann S, Magner-Krezel Z, Sobieraj R, Szwed Z. The assessment of nephrotoxic effect of organophosphorus pesticides based on the determination of the activity of some selected enzymes in urine. *Przegl Lek* 1997a; 54: 707-711

Kossmann S, Cierpka E, Szwed Z. Biochemical evaluation of the liver function in workers employed at the production of chlorfenvinphos. *Przegl Lek* 1997b; 54: 712-715

---

Kow YW. Oxidative stress, DNA damage and human diseases. *Dojindo Newsletter* 1999; 2: 4-13

Kreiss K, Zack MM, Kimbrough RD. Cross-sectional study of a community with exceptional exposure to DDT. *JAMA* 1981; 245: 1926-1930

Krieger RI, Ross JH, Thongsinthusak T. Assessing human exposures to pesticides. *Rev Environ Contam Toxicol* 1992; 128P: 1-15

Kuniyoshi SM, Jankovic J. MDMA and Parkinsonism. *N Engl J Med* 2003; 349: 96-97

La Du BN, Billecke S, Hsu C, Haley RW, Broomfield CA. Serum paraoxonase (PON1) isozymes: the quantitative analysis of isozymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 566-569

Lakew K, Mekonnen Y. The health status of northern Omo State Farm workers exposed to chlorpyrifos and profenofos. *Ethiop Med J* 1998; 36: 175-184

Lander F, Hinke K. Indoor application of anti-cholinesterase agents and the influence of personal protection on uptake. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 22: 163-166

Lander F, Pike E, Hinke K, Nielsen JB. Anti-cholinesterase agents uptake during cultivation of greenhouse flowers. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 22: 159-162

---

Lee BW, London L, Paulauskis J, Myers J, Christiani DC. Association between human paraoxonase gene polymorphism and chronic symptoms in pesticide-exposed workers. *J Occup Environ Med* 2003; 45: 118-122

Legaspi JA, Lenz C. *Occupational health aspects of pesticides*. En: Occupational Medicine. Lenz C (ed), 3<sup>rd</sup> ed., Mosby, St. Louis, 1994, pp. 617-653

Levine R. *Recognized and possible effects of pesticides in humans*. En: Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes WJ, Laws ER (eds), Academic Press, San Diego, 1991; 275-360

Lewalter J, Leng G. Consideration of individual susceptibility in adverse pesticide effects. *Toxicol Lett* 1999; 107: 131-144

Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lulis AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 767-779

Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, Creus A, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 2000; 464: 255-262

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-154

---

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian Gulf War Veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 729-733

Mackness B, Durrington P, Povey A, Thomson S, Dippnall M, Mackness M, Smith T, Cherry N. Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 81-88

Mage DT, Alavanja MCR, Sandler DP, McDonnell CJ, Kross B, Rowland A, Blair A. A model for predicting the frequency of high pesticide exposure events in the agricultural health study. *Environ Res Section A* 2000; 83: 67-71

Marín I. Intoxicaciones agudas por el uso de plaguicidas en los cultivos de la costa granadina (1990). *Centro de Salud* 1994; 5: 419-422

Maroni M, Fait A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. *Toxicology* 1993; 78: 1-180

Maroni M, Jarvisalo J, La Ferla F. The WHO-UNDP epidemiological study on the health effects of exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol Lett* 33; 1986: 115-123

Martín Rubí JC, Yélamos F, Laynez F, Córdoba J, Díez F, Lardelli A, Blanco JL, Vicente Rull JR. Intoxicaciones por insecticidas organofosforados. Estudio de 506 casos. *Rev Clín Esp* 1996; 196: 145-149

---

Martínez–Cayuela M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 1998; 39; 5-18

Martínez-Yélamos S, Calopa M, Aguilar M. Radicales libres y envejecimiento. *Jano* 1997; 52: 64-1164-1166

Mason HJ. The recovery of plasma cholinesterase and erythrocyte acetylcholinesterase activity in workers after over-exposure to dichlorvos. *Occup Med (Lond)* 2000; 50: 343-347

Matchaba-Hove RB, Siziya S. Organophosphate exposure in pesticide formulation and packaging factories in Harare, Zimbabwe. *Cent Afr J Med* 1995; 41: 40-44

Matés J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83–104

Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem* 1999; 32, 595–603

Mintzer S, Hickenbottom S, Gilman S. Parkinsonism after taking ecstasy. *N Engl J Med* 1999; 340: 1443.

Misra UK, Nag D, Bhushan V, Ray PK. Clinical and biochemical changes in chronically exposed organophosphate workers. *Toxicol Lett* 24; 1985: 187-193

---

More PR, Vadlamudi VP, Degloorkar NM, Rajurkar SR. Health monitoring of farm labourers engaged in MIPC 50 WP field sprays. *J Environ Biol* 2003; 24: 205-209

Morikofer-Zwez S, Cantz M, Kaufmann H, von Wartburg JP, Aebi H. Heterogeneity of erythrocyte catalase. Correlations between sulfhydryl group content, chromatographic and electrophoretic properties. *Eur J Biochem* 1969; 11: 49-57

Moritz F, Monteil C, Isabelle M, Bauer F, Renet S, Mulder P, Richard V, Thuillez C. Role of reactive oxygen species in cocaine-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 834-843

Mutch E, Blain PG, Williams FM. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Hum Exp Toxicol* 1992; 11: 109-116

Nakagawa M, Kobayashi H, Katsuya M. Effect of organophosphates pesticides on the activities of lecithin-cholesterol acyltransferase and cholinesterase in rat serum. *Chem Pharm Bull* 1982; 30: 214-218

Naqvi SM, Vaishnavi C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp Biochem Physiol C* 1993; 105: 347-361

Ngowi AV, Maeda DN, Partanen TJ, Sanga MP, Mbise G. Acute health effects of organophosphorus pesticides on Tanzanian small-scale coffee growers. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; 11: 335-339

---

O'Malley M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet* 1997; 349: 1161-1166

Ohayo-Mitoko GJ, Kromhout H, Simwa JM, Boleij JS, Heederik D. Self reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers. *Occup Environ Med* 2000; 57:195-200

Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, da Costa Mattos RC, Moreira JC. Influence of socioeconomic factors on the pesticides poisoning, Brazil. *Rev Saude Publica* 2001; 35: 130-135

Ozbay B, Dulger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med* 2002; 197: 119-124

Panemangalore M, Dowla HA, Byers ME. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 84-88

Parrón T, Hernández AF, Pla A, Villanueva E. Clinical and biochemical changes in greenhouse sprayers chronically exposed to pesticides. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 957-963

Parrón T. *Efectos nocivos de la exposición continuada a plaguicidas con especial incidencia en la depresión y el suicidio en la zona del poniente almeriense*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 1994

---

Paz-y-Mino C, Bustamante G, Sanchez ME, Leone PE. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1077-1080

Pedrosa RC, De Bem AF, Locatelli C, Pedrosa RC, Geremias R, Wilhelm Filho D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep* 2001; 6: 265-270

Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, Gillham R, Hansen S, Kidd M, Hurley JF, Soutar CA. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occup Environ Med* 2001; 58: 702-710

Plagia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169

Podolak M, Panasiuk L. Biological indicators for the assessment of human exposure to organophosphorus compounds. *Przegl Lek* 1997; 54: 719-722

Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 107-112

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507

- 
- Ramón JR. *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. IDEPSA. España. 1993
- Ranjbar A, Pasalar P, Sedighi A, Abdollahi M. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicol Lett* 2002; 131: 191-194
- Reiner E, Radic Z. Method for measuring human plasma paraoxonase activity. Course on analytical procedures for assessment of exposure to organophosphorus pesticides. Cremona Italia. *Manual of Analytical Methods*, 1985, pp 62-70
- Reiner E, Simeon-Rudolf V, Skrinjaric-Spoljar M. Catalytic properties and distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in human sera, *Toxicol Lett* 1995; 82/83: 447-452
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372
- Richter ED, Chuwers P, Levy Y, Gordon M, Grauer F, Marzouk J, Levy S, Barron S, Gruener N. Health effects from exposure to organophosphate pesticides in workers and residents in Israel. *Isr J Med Sci* 1992; 28: 584-598
- Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745-753

---

Rivera JA, Rivera M. Organophosphates poisoning. *Bol Asoc Med P R* 1990; 82: 419-422

Rosenmann KD, Guss PS. Prevalence of congenital deficiency in serum cholinesterase. *Arch Environ Health* 1997; 52: 42-44

Ruiz A. *Toxicidad crónica por plaguicidas en trabajadores de invernadero de la zona básica de salud de Níjar (Almería)*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 1997

Sahoo A, Samanta L, Chainy GB. Mediation of oxidative stress in HCH-induced neurotoxicity in rat. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000; 39: 7-12

Sandhir R, Gill KD. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol Trace Elem Res* 1995; 48: 91-97

Sarkar S, Yadav P, Bhatnagar D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants. *J Trace Elem Med Biol* 1997; 11: 8-13

Saiyed HN, Sadhu HG, Bhatnagar VK, Dewan A, Venkaiah K, Kashyap SK. Cardiac toxicity following short-term exposure to methomyl in spraymen and rabbits. *Hum Exp toxicol* 1992; 11: 93-97

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295

---

Simeon-Rudolf V, Kovarik Z, Skrinjaric-Spoljar M, Evans RT. An explanation for the different inhibitory characteristics of human serum butyrylcholinesterase phenotypes deriving from inhibition of atypical heterozygotes. *Chem-Biol Interact* 1999; 119-120: 159-164

Slaughter MR, Thakkar H, O'Brien PJ. Effect of diquat on the antioxidant system and cell growth in human neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 178: 63-70

Soares W, Almeida RM, Moro S. Rural work and risk factors associated with pesticide use in Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Publica* 2003; 19: 1117-1127

Sozmen EY, Sozmen B, Delen Y, Onat T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Arch Med Res* 2001; 32: 283-287

Srivastava AK, Gupta BN, Mathur AK, Mathur N, Mahendra PN, Bharti RS. The clinical and biochemical study of pesticide sprayers. *Human Exp Toxicol* 1991; 10: 279-283

Srivastava AK, Gupta BN, Bihari V, Mathur N, Srivastava LP, Pangtey BS, Bharti RS, Kumar P. Clinical, biochemical and neurobehavioural studies of workers engaged in the manufacture of quinalphos. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 65-69

Thapar A, Sandhir R, Kiran R. Acephate induced oxidative damage in erythrocytes. *Indian J Exp Biol* 2002; 40: 963-996

---

Tinoco-Ojanguren R, Halperin DC. Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* 1998; 53: 29-35

Triskow-Drost G. Radicales libres en Biología y Medicina, una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 1996; 1: 44-57

Turner JM; Hall RA, Whittaker M, Holder RL, Kricka LJ. Application of stepwise discriminant analysis in the phenotyping of plasma cholinesterase variants. *Ann Clin Biochem* 1985; 22:175-178

Ueda T, Kosaka M, Yoshida M, Endo Y, Hashimoto M, Goto H, Hara I. Health effects and personal protection in pest control workers using organophosphorus insecticides. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 1992; 39: 147-152

Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147: 405-410

Wang CL, Chuang HY, Chang CY, Liu ST, Wu MT, Ho CK. An unusual case of organophosphate intoxication of a worker in a plastic bottle recycling plant: an important reminder. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 1103-1105

Webster NR, Jun JP. Molecular structure of free radicals and their importance in biological

---

reactions. *Br J Anaesth* 1998; 60: 98-108

Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia* 1980; 35:174-97

Whittaker M. *Cholinesterases*. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßi M (eds), Verlag Chemie, Weinheim, 1984, vol. IV, pp. 52-74

Whittaker M. *Monographs in Human Genetics*, Vol 11, Cholinesterase. London, Karger, 1986

Williams FM, Mutch E, Blain PG. Paraoxonase distribution in Caucasian males. *Chem Biol Interact.* 1993; 87: 155-160

Wu YQ, Wang JD, Chen JS, Chung SC, Hwang SY. Occupational risk of decreased plasma cholinesterase among pesticide production workers in Taiwan. *Am J Ind Med* 1989; 16: 659-666

Yarsan E, Bilgili A, Kanbur M, Celik S. Effects of deltamethrin on lipid peroxidation in mice. *Vet Hum Toxicol* 2002; 44: 73-75

Yeary RA, Eaton J, Gilmore E, North B, Singell J. A multiyear study of blood cholinesterase activity in urban pesticide applicators. *J Toxicol Environ Health* 1993; 39: 11-25

Yélamos F, Díez F, Martín C, Blanco JL, García MJ, Lardelli A, Peña JF. Intoxicaciones agudas por insecticidas organofosforados en la provincia de Almería. Estudio de 187 casos. *Med Clín* 1992; 98: 681-684

Zhou JF, Chen P. Studies on the oxidative stress in alcohol abusers in China. *Biomed Environ Sci* 2001; 14: 180-188

Zhou JF, Xu GB, Fang WJ. Relationship between acute organophosphorus pesticide poisoning and damages induced by free radicals. *Biomed Environ Sci* 2002; 15: 177-186

Zhou JF, Zhou YH, Zhang L, Chen HH, Cai D. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) abuse markedly inhibits acetylcholinesterase activity and induces severe oxidative damage and liperoxidative damage. *Biomed Environ Sci* 2003; 16: 53-61

**ANEXO**





