



Universidad Nacional Autónoma de México

Universidad Autónoma de Occidente

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Facultad de Medicina- Farmacología Clínica

Tesis para optar por el grado de:

Maestro en investigación clínica experimental en salud

Título: Evaluación de los genes supresores tumorales TP53 y P16 como potenciales biomarcadores del daño epigenético por exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas en trabajadores agrícolas del norte de Sinaloa México.

Presenta: Biol. Masías Ambríz Luis Omar

Comité tutor:

Directora: Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela (facultad de medicina UNAM)

Asesores: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo (Facultad de medicina UNAM)

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez (Facultad de medicina UNAM)

Dra. Ana Bertha Irineo Cabrales (Facultad de medicina UNAM)

Facultad de Medicina (Av. Universidad 3000, C.U., 04510), Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Octubre 2019

Ciudad de México, Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México

Universidad Autónoma de Occidente

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Facultad de Medicina- Farmacología Clínica

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en investigación clínica experimental en salud

Título: Evaluación de los genes supresores tumorales TP53 y P16 como potenciales biomarcadores del daño epigenético por exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas en trabajadores agrícolas del norte de Sinaloa México.

Presenta: Biol. Masías Ambríz Luis Omar

Comité tutor:

Directora: Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela (facultad de medicina UNAM)

Asesores: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo (Facultad de medicina UNAM)

Dra. María del Carmen Jiménez Martínez (Facultad de medicina UNAM)

Dra. Ana Bertha Irineo Cabrales (Facultad de medicina UNAM)

Facultad de Medicina (Av. Universidad 3000, C.U., 04510), Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Octubre 2019

Contenido

Agradecimientos.....	I
Índice de tablas.....	II
Índice de figuras.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
Introducción.....	9
Plaguicidas.....	9
Clasificación.....	11
Tipos de plaguicidas de acuerdo a su grupo químico.....	13
Productos Organoclorados.....	13
Organofosforados.....	14
Carbamatos.....	15
Piretroides y Piretrinas.....	16
Neonicotinoides.....	16
Uso de plaguicidas en Sinaloa.....	20
Exposición a plaguicidas.....	21
Plaguicidas más utilizados en Sinaloa.....	22
Daño Genotóxico.....	22
Epigenética.....	22
Metilación del DNA.....	23
Genes Supresores Tumorales.....	25
TP53.....	27
P16.....	28
Metilación del DNA como biomarcador....	29
Antecedentes.....	31
Planteamiento del problema.....	39
Pregunta de investigación.....	43
Hipótesis.....	43
Objetivos.....	43
General y Específicos.....	44
Materiales y métodos.....	45
Diseño experimental.....	46
Criterios de selección.....	46
Fuentes de Información.....	48
Diseño metodológico.....	48
Diseño Estadístico.....	48
Resultados.....	58
Discusión.....	68
Conclusión.....	69
Perspectivas.....	70
Literatura consultada.....	70

Agradecimientos:

A mi familia por su paciencia y comprensión a lo largo del presente proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo en diversas actividades.

A mi comité tutorial y a la Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela, por su apoyo, consejos y asesorías.

Al Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez y al resto del equipo del laboratorio de Genómica funcional del Centro De Investigación Interdisciplinar y Desarrollo Regional Unidad Guasave (CIIDIR-IPN) por permitirme la utilización de sus instalaciones y por sus asesorías en actividades relacionadas con el presente proyecto.

A la Dra. Eliakim Arámbula Meraz y al resto de su equipo, por las facilidades y asesorías otorgadas en la realización de actividades vinculadas a la estandarización y trabajo experimental.

Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su toxicidad	11
Tabla 2: Clasificación de plaguicidas más utilizados en el norte de Sinaloa	11
Tabla 3: Funciones de los principales genes supresores tumorales	26
Tabla 4: Descripción general de la población	46
Tabla 5: Sintomatología presentada por los participantes de ambos grupos	47
Tabla 6: Análisis comparativo correspondientes a las variables continuas (edad, peso, talla) de los participantes	50
Tabla 7: Análisis de asociación entre la presencia/ausencia de metilaciones y variables categóricas directa o indirectamente vinculadas a la exposición a plaguicidas de los participantes	51
Tablas 8-9: Estimación del riesgo relativo de presentar metilaciones dentro de TP53 vinculado con la preparación de mezclas y la cantidad de horas de exposición semanal	53
Tablas 10-11: Estimación del riesgo relativo de presentar metilaciones dentro de P16 vinculado con la preparación de mezclas y la cantidad de horas de exposición semanal	58

Índice de Figuras

Fig. 1: Clasificación y estructura química de los plaguicidas	18
Fig. 1.2: Formulación de los diferentes plaguicidas neonicotinoides	18
Fig. 2: Relación entre genética, epigenética y exposición ambiental en las enfermedades fenotípicas	22
Fig. 3: Mecanismo de desmetilación del DNA	24
Fig. 4: Actividad del gen TP53 de acuerdo a su interacción con otros genes y dependiendo de un determinado estímulo	27
Fig. 5: Mecanismo de acción del gen P16 dentro del ciclo celular.	29
Fig. 6: Representación de los fragmentos correspondientes a participantes con metilación en ambos genes visualizados en electroforesis	50
Fig. 7: Representación gráfica de la principal sintomatología presentada en los participantes	52
Fig. 8: Valores de sensibilidad y especificidad de la prueba MS-PCR para la presencia/ausencia de metilaciones en TP53 tomando como referencia las horas de exposición semanal a plaguicidas representados dentro de la curva ROC	55
Fig. 9: Gráfica de dispersión de los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba MS-PCR para la presencia/ausencia de metilaciones en TP53	56
Fig. 10: Valores de sensibilidad y especificidad de la prueba MS-PCR para la presencia/ausencia de metilaciones en P16 (curva ROC)	57
Fig. 11: Gráfica de dispersión de los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba MS-PCR para la presencia/ausencia de metilaciones en P16	58

Resumen:

La agricultura es la actividad económica con mayor relevancia en el estado de Sinaloa, debido a esto son utilizadas en promedio 223 toneladas de plaguicidas anualmente y ha desencadenado consecuencias graves en los ecosistemas y en la salud de los trabajadores agrícolas, lo cual se manifiesta en alteraciones epigenéticas como la metilación en genes supresores tumorales, comúnmente asociados en etapas tempranas de cáncer.. Actualmente, el monitoreo de la metilación del DNA ha emergido como una forma novedosa de evaluar su influencia en diversas enfermedades vinculadas con la constante exposición a plaguicidas como Paraquat, glifosato, Malatión, cipermetrina, etc. El objetivo de este estudio es demostrar que la técnica MS-PCR, considerada como el "estándar de oro" para el análisis de metilación presenta los valores pronósticos adecuados para ser considerada como biomarcador del daño por exposición a mezclas de plaguicidas en trabajadores agrícolas del norte de Sinaloa, para lo cual, se utilizó la técnica de PCR-metilación específica, considerada como el estándar de oro para esta finalidad. De acuerdo con los resultados, se evidenciaron bandas correspondientes a 193pb para el gen TP53 y de 150pb para el gen P16, lo cual indica que 27 (65%) de los trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas presentaron metilación en ambos genes evaluados, mientras que 5 participantes sin exposición evaluados (23%) también resultaron con daño epigenético, de acuerdo con las pruebas de Chi cuadrado, las variables referentes a la exposición directa a plaguicidas (horas de exposición, mezcla, etc.) manifestaron una asociación fuertemente significativa a un índice de confianza de 0.05. de igual manera, la prueba MS-PCR mostró una sensibilidad de 0.85 y una especificidad de 0.43 por lo que se considera un valor adecuado para su utilidad como biomarcador. Basados en los resultados de este estudio proponemos la realización de ensayos posteriores enfocados a la búsqueda específica de los nucleótidos metilados dentro de los fragmentos afectados, así como, la búsqueda de polimorfismos vinculados a una mayor o menor susceptibilidad a ser afectados por metilaciones inducidas a causa de los plaguicidas

Abstract

Agriculture is the most important economic activity in the state of Sinaloa, an average of 223 tons of pesticides are used annually and has led to serious consequences on the ecosystems and health of agricultural workers, which is manifested in alterations. Epigenetics such as methylation in tumor suppressor genes, commonly associated in early stages of cancer. Currently, DNA methylation monitoring has emerged as a novel way of assessing its influence on various diseases linked to the constant exposure to pesticides such as Paraquat, glyphosate, malathion, cypermethrin, etc. The objective of this study is to demonstrate that the MS-PCR technique, considered as the "gold standard" for methylation analysis, presents the appropriate prognostic values to be considered as biomarker of damage due to exposure to pesticide mixtures in agricultural workers North of Sinaloa, for which, the specific PCR-methylation technique was used, considered as the gold standard for this purpose. According to the results, bands corresponding to 193 bp for the TP53 gene and 150 bp for the P16 gene were evidenced, which indicates that 27 (65%) of the workers exposed to pesticide mixtures presented methylation in both genes evaluated, while that 5 participants without exposure evaluated (23%) also resulted in epigenetic damage, according to Chi square tests, the variables related to direct exposure to pesticides (hours of exposure, mixing, etc.) showed a strongly significant association with a confidence index of 0.05. Similarly, the MS-PCR test showed a sensitivity of 0.85 and a specificity of 0.43, which is why it is considered an appropriate value for its usefulness as a biomarker. Based on the results of this study, we propose the performance of subsequent tests focused on the specific search of methylated nucleotides within the affected fragments, as well as the search for polymorphisms linked to a greater or lesser susceptibility to be affected by cause-induced methylations of pesticides

1.- Introducción

Plaguicidas

La agricultura es el segundo sector laboral más amplio en el mundo, la cual, ha sido apoyada de forma especial por el uso de plaguicidas para la protección de cosechas y el control de plagas. La agricultura, se considera como una de las ocupaciones más peligrosas, además de diversos accidentes laborales, enfermedades o intoxicaciones que los trabajadores llegan a padecer (International Labour Organization., 2010; Hashemi *et al.*, 2012; Bernieri *et al.*, 2018). Los plaguicidas ocupan una posición especial entre los químicos presentes en el ambiente. los plaguicidas han demostrado toxicidad y debido a su amplio uso en mezclas, falta de acción selectiva y su potencial daño para los seres humanos, han contribuido al desarrollo de enfermedades como el cáncer y/o afectaciones en los sistemas reproductivo, nervioso, inmunitario entre otros (Organización Mundial de la Salud., 2016; Caetani-Machado y Martins, 2018).

De acuerdo Al manual de plaguicidas de la British Crop Production Council edición 17, se reportan 10,400 productos, además de 3100 que han sido descontinuados (BCPC, 2018). Los plaguicidas contienen ingredientes activos, que puede ser encontrarse en presentaciones líquidas, gránulos, pellets, tabletas, además de sustancias coadyuvantes, que juegan un rol importante en la efectividad del plaguicida y muchas ocasiones presentan una toxicidad mayor a la del ingrediente activo declarado (EFSA, 2014). Los trabajadores agrícolas aplican estas sustancias de forma constante como parte de sus labores; además, la mayoría de ellos presenta una falta de conocimientos acerca de su manejo adecuado, causando una mayor susceptibilidad a riesgos laborales e intoxicaciones que tiene una repercusión directa en su salud (Hashemi *et al.*, 2012; Damalas *et al.*, 2006).

Se ha presentado un extenso cuerpo de evidencias que correlacionan la exposición a plaguicidas con el desarrollo de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral, asma, entre otras. Debido a esto, la exposición a plaguicidas se ha convertido en un fenómeno de interés a nivel mundial (Mostafalou y

Abdollahi., 2017). Se ha demostrado experimentalmente que los diversos plaguicidas provocan el incremento de daño al DNA, además, se ha evaluado la toxicidad de su ingrediente activo, así como, de sus adyuvantes (Silva-Kahl *et al.*, 2018).

Muchas mezclas de plaguicidas o los metabolitos de sus componentes individuales, tienen el potencial de afectar el sistema endócrino, debido a que trabajadores expuestos a dichos tóxicos han presentado desordenes del crecimiento, metabolismo, reproducción y comportamiento, así como afectaciones en la regulación neuroendocrina en los ejes tiroideo, gonadal y adrenal (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

El biomonitoreo es considerado como una herramienta de evaluación confiable para medir la exposición a diversos tipos de plaguicidas; partiendo de los datos farmacocinéticos disponibles se puede hacer uso de distintos biomarcadores relevantes en muestras de sangre, orina u otras matrices o fluidos biológicos. Los datos de monitoreo son valiosos en el estudio de los efectos a la salud así como de los riesgos a respuestas adversas, sin embargo, la identificación y validación de parámetros característicos son indicativos de la inducción de disfunción y toxicidad clínica, además del establecimiento de sensibilidad y especificidad para cada biomarcador(Conolly *et al.*, 2018; Hayat *et al.*, 2019).

Clasificación y características de los plaguicidas

A los plaguicidas, se les puede clasificar de diversas formas, las más importantes se refieren a su origen (natural o sintético), por su persistencia o vida media en no persistente, persistente, moderadamente persistente y permanente o por su grupo químico como Organoclorados, organofosforados, piretroides, piretrinas, carbamatos, neonicotinoides, etc. entre otros (SEMARNAT., 2015)

Clasificación de los plaguicidas

Por su Toxicidad (Organización Panamericana de la Salud., 2009)

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud, el criterio principal para determinar esta clasificación es su dosis letal 50 (DL50), como se observa en la tabla 1, se denominan plaguicidas peligrosos a aquellos que provocan efectos letales con una menor concentración del producto

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad

Clasificación toxicológica de los plaguicidas				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación líquida DL50 aguda (oral y dermal)		Formulación sólida DL50 aguda	
Clase 1a Productos sumamente peligrosos	>20	>40	>5	>10
Clase 1b Productos muy peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Productos moderadamente peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
Clase III Productos poco peligrosos	2000-3000	>4000	500 a 2000	>1000
Clase IV Productos que normalmente no ofrecen peligro	>3000		>2000	

Tipos de plaguicidas en base a su grupo químico

Organoclorados: Son plaguicidas resistentes a la degradación biológica, tienen poca solubilidad, se acumulan en plantas, suelo y en la atmósfera; una vez volátiles se dispersan por distintas regiones (Aguilar-Martínez, 2007). Existe evidencia que estas sustancias incluso a una dosis bajas, pueden influir en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la obesidad, decrecimiento de la inmunocompetencia, inmunostimulación inapropiada, debido a la concentración en sangre y tejido adiposo de plaguicidas como lindano, endosulfán, DDT, permetrina, etc. (Dong-Hee et al., 2018).

La mayoría de los compuestos Organoclorados son considerados disruptores químicos del sistema endócrino, en años anteriores eran ampliamente utilizados en agricultura e industria, sin embargo, a partir del convenio de Estocolmo, establecido en 2001, se propuso reducir su uso progresivamente tras ser considerados un peligro para la salud pública global, estos plaguicidas han sido asociados con diversos desordenes metabólicos como la diabetes y disminución de las funciones normales del sistema nervioso (Al-Daghri et al., 2018) y el incremento de la carcinogénesis en hormonas como la tiroideas (Lerro et al., 2018).

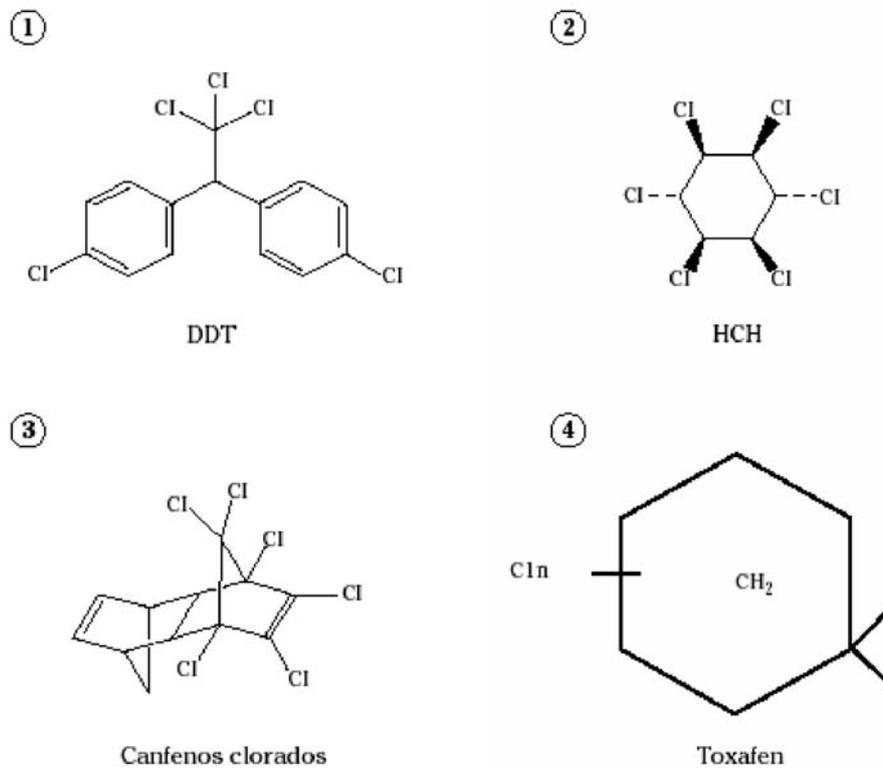


Figura 1. Insecticidas organoclorados.

Organofosforados

Los compuestos organofosforados son sustancias orgánicas derivadas del fósforo, tienen un gran número de aplicaciones y utilidades entre los que destacan: aditivos del petróleo, disolventes, en las industrias de colorantes, barnices, cuero artificial, aislantes eléctricos, impermeabilizantes, ablandadores de plásticos, fungicidas, insecticidas entre otros.

Dado su amplia distribución y uso en diferentes industrias y en la agricultura, es muy frecuente que se presenten intoxicaciones accidentales por estos compuestos; además, han sido empleados en suicidios debido a su fácil acceso (Fernández *et al.* 2010). Su exposición ocupacional se puede dar por vía digestiva, inhalatoria y dérmica. La primera suele considerarse accidentalmente o por alimentos contaminados; por lo

que muchas veces suele perder importancia, mientras que las otras dos tienen mayor relevancia desde el punto de vista ocupacional (Martínez y Martínez, 2008).

Los plaguicidas organofosforados son comúnmente empleados para la protección de cultivos (Malek *et al.*, 2018). Además se caracterizan por la inhibición de la enzima colinesterasa (AChE) en el sistema nervioso a través de la formación de un complejo enzima-tóxico, responsable de la sobre estimulación de las fibras post-ganglionares muscarínicas del sistema nervioso parasimpático, aunado a esto, otros estudios han demostrado la habilidad de estos compuestos para producir efectos detrimentales a nivel reproductivo tales como, disminución en la calidad del semen, desequilibrio hormonal, descenso en el índice de fertilidad y disparidad en el desarrollo embrionario (Hernandez-Cortés *et al.*, 2018).

Los síntomas de una intoxicación aguda por exposición a plaguicidas organofosforados incluyen dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas, vómito, lesiones en la piel, síntomas extrapiramidales, debilidad en piernas y músculos y lesiones en los riñones (Azah 2011: Jensen *et al.*, 2011: Suratman *et al.*, 2015: Reji *et al.*, 2016: Lee *et al.*, 2015). Diversos estudios realizados en adultos y niños han vinculado la aparición de linfomas, leucemias o desordenes neuropsiquiátricos a una exposición prolongada (Salvi *et al.*, 2003).

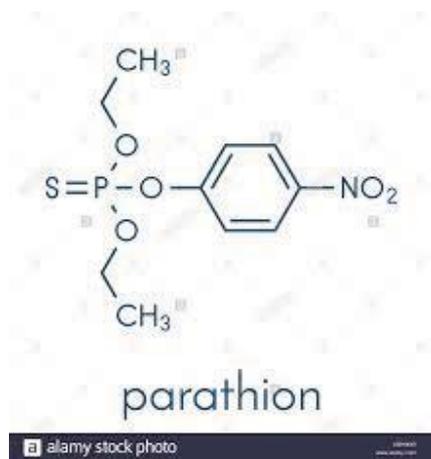


Fig. 1.2: Estructura de los organofosforados

Carbamatos

Los carbamatos son sustancias orgánicas derivados del Ácido carbámico utilizadas mayormente como fungicidas pero que tienen un efecto neurotóxico en el hombre. (Blanco *et al.*, 2013). Se encuentran subdivididos en tres grupos principales: carbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos. Los N-metilcarbamatos son comúnmente utilizados como plaguicidas, tales como bendiocarb, carbaryl, carbofuran, methomyl, oxamyl, propoxur, entre otros. La mayoría de estos compuestos son absorbidos fácilmente por las vías oral, respiratoria y parental, estos plaguicidas tienen una buena distribución tisular al cuerpo. Debido a su carácter lipofílico, se concentran principalmente en el tejido adiposo y cerebro. Son metabolizados en el hígado en compuestos menos tóxicos o no tóxicos, sin embargo, el carbofuradán-fenol, derivado del carbofuradán tienen un impacto toxicológico.

La exposición a este grupo se encuentra asociada con inhibiciones de la acetilcolinesterasa (AChE), en la sinapsis del cerebro y las conjunciones neuromusculares, acumulación de acetil colina en las terminaciones nerviosas y sobre estimulaciones de la actividad eléctrica. Otras asociaciones radican en efectos cardiovasculares, oculares, inmunológicos, reproductivos, estrés oxidativo, apoptosis, disrupción endócrina y carcinogénesis (Gupta., 2014).

Piretroides y piretrinas

Los piretroides son compuestos sintéticos que se utilizan principalmente como insecticidas en hogares, industria y agricultura, la información respecto a su uso es escasa, se han asociado principalmente con problemas en la piel (San Román *et al.*, 2003). Estos compuestos han sido clasificados en dos tipos 1 y 2 de acuerdo a su estructura, la diferencia es la adición de un grupo ciano en el tipo 2. El uso de ambos grupos como plaguicidas es extensivo alrededor del mundo con propósitos agronómicos, veterinarios, domésticos, de salud pública, etc. (Corcellas *et al.*, 2014). Su toxicidad ha sido demostrada en múltiples estudios que reportan su posible influencia en el desarrollo prenatal, distorsión de la función placentaria, endócrina, y la

perturbación en la regulación e inflamación inmune, entre otras. (Ling *et al.*, 2018). Basados en su toxicidad a largo plazo, se destaca la capacidad de los insecticidas piretroides como los principales disruptores neuronales en poblaciones expuestas (Burns and Pastor., 2018). Dichos En modelos animales la exposición a piretroides como bifentrin produce alteración del estado redox, daño neurológico, neuroinflamación en el hipocampo y disparidad cognitiva y de memoria causados por exposición a dosis de piretroides (Gargouri *et al.*, 2018).

Neonicotinoides:

Los insecticidas neonicotinoides, incluyen plaguicidas como imidacloprid, clotianidin, tiametoxam, y tiacloprid. Estos compuestos actúan en firma de neurotoxinas agonistas del receptor nicotínico acetilcolina de los insectos (Cresswell, 2011).

Desde la introducción del imidacloprid en 1990, este tipo de compuestos se han utilizado extensivamente para el control de plagas mediante aspersiones, utilización de semillas de cultivo y aditivos de suelo (Blacquiere *et al.*, 2012). Este plaguicida ha resultado efectivo en insectos resistentes a organofosforados o carbamatos, sin embargo, debido a su actividad sistémica, los residuos de los neonicotinoides quedan en el polen y néctar de diversas plantas, lo cual representa riesgo para insectos polinizadores como las abejas (Schmuck y Lewis., 2016). En 2008, los neonicotinoides constituyeron el 24% del total de agroquímicos en el mercado, reemplazando a los organofosforados y carbamatos, así mismo, en 2015, Douglas y Toocker reportaron en conjunto con el Centro de Seguridad alimentaria de Estados Unidos la aplicación de 4 millones de libras de neonicotinoides a una extensión entre 140-200 acres de cultivo (Douglas y Toocker., 2015; Center for Food Safety., 2014).

La popularidad de los neonicotinoides, es principalmente debida a sus propiedades fisicoquímicas. Estos compuestos han sido considerados de alta efectividad, baja resistencia y especialmente menos dañinos para los mamíferos sin embargo, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado toxicidad reproductiva, neurológica, hepatotoxicidad, hepatocarcinomas, inmunotoxicidad genotoxicidad. Estudios epidemiológicos de los efectos que tienen los neonicotinoides en humanos son

limitados (Han *et al.*, 2018). Plaguicidas como el thiacloprid, ha sido catalogado como ligeramente cancerígeno para seres humanos, esto debido a la observación de tumores tiroideos, uterinos y ováricos en estudios basados en modelos de roedores. Una de las principales vías de ingreso de estos plaguicidas al organismo son alimentos como frutas y verduras, los cuales, presentan concentraciones de compuestos como imidacloprid, thiametoxam, clothinidin, etc.). Otra vía de ingreso de los neonicotinoides es el agua potable, esto debido al carácter hidrofílico de estas sustancias, se ha determinado entre 0.06-4.5µg/l de agua, así como, también pueden presentarse estos residuos en canales de irrigación agrícola. Una tercera vía de absorción para este tipo de plaguicidas es mediante la inhalación de polen contaminado, lo cual, se asocia con afectaciones en el tracto respiratorio y pulmones, debido a su solubilidad en agua (Zhang *et al.*, 2018).

En mamíferos, adicionalmente, se han reportado afectaciones en el neuroreceptor subtipo nAChRs $\alpha 4\beta 2$, el cual, se ubica en altas densidades en el tálamo y se asocia con desordenes severos en el sistema nervioso central, tales como Alzheimer, Parkinson, Esquizofrenia, y depresión así como, en la proliferación, apoptosis, migración, diferenciación de neuronas y la formación de circuitos neuronales (Chen *et al.*, 2014). Se ha reportado que plaguicidas neonicotinoides como el imidacloprid, organofosforados como el clorpyrifos y piretroides sintéticos como la cipermetrina, inducen la aneuploidía cromosómica incluso con dosis bajas, generando desequilibrios genéticos asociados con la tumorigénesis y el desarrollo de cáncer (Muznic *et al.*, 2018).

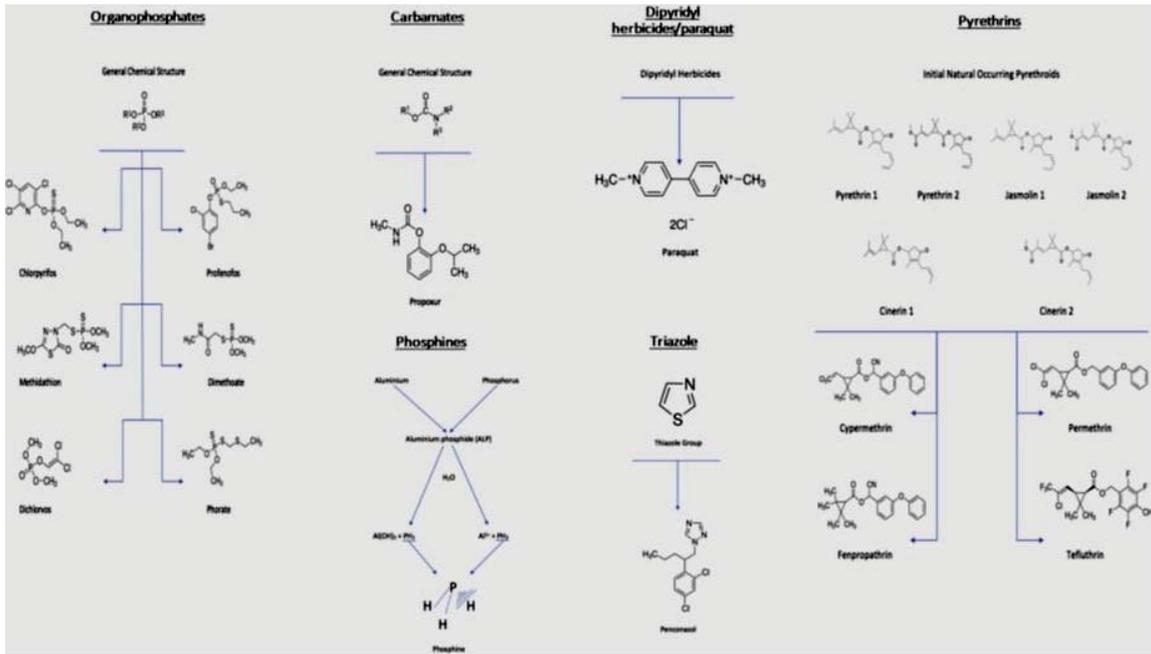


Fig 1.3: Clasificación y estructura de los principales plaguicidas (imagen cortesía de Giorgiadis *Et al.*, 2018)

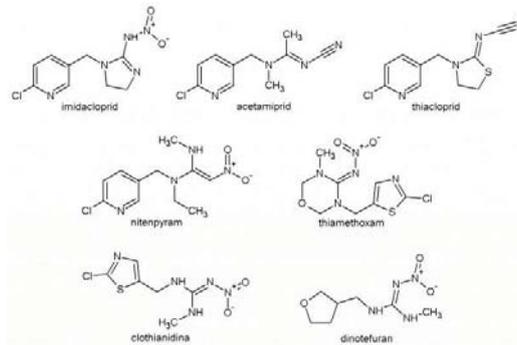
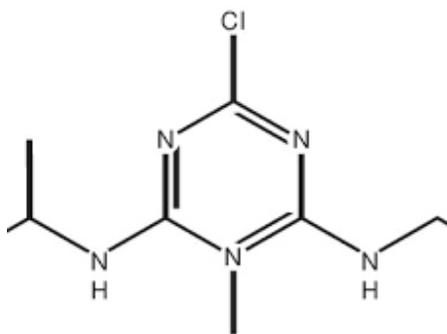


Fig. 1.4: Formulación de los diferentes plaguicidas neonicotinoides (imagen tomada de Forner., 2015)

Triazinas

Las triazinas son uno de los grupos de herbicidas más frecuentemente utilizados en las labores agrícolas. Habitualmente su extracción se realiza mediante métodos líquido-líquido (Santa-Eufemia *et al.*, 2005). El mecanismo de acción del herbicida triazina es la inhibición de la fotosíntesis, esto mediante la unión de la proteína QB al centro de reacción del fotosistema II, bloqueando el flujo de electrones a través de la cadena fotosintética. Estos herbicidas son extensivamente utilizados como parte de una agricultura sustentable debido a la flexibilidad de su aplicación. La evaluación de estos plaguicidas ha revelado que son químicos con bajo potencial tóxico para humanos, sin embargo, existen controversias acerca de esta afirmación, por ejemplo, estudios recientes del perfil toxicológico del herbicida atrazina revelan efectos agudos y crónicos, toxicidad reproductiva y de desarrollo, mutagenicidad e inmunotoxicidad, a su vez, otros estudios reportan que la atrazina y sus componentes asociados tienen efectos en la salud humana, tales como evidencia de carcinogenicidad, toxicidad orgánica, efectos en el sistema inmune y Genotoxicidad. En modelos animales, la atrazina ha demostrado causar efectos graves en el sistema endócrino y sistema nervioso central, además de ser factor en el desarrollo de tumores glandulares, cáncer y linfoma non Hodking (Semren *et al.*, 2018).



Atrazina

Fig. 1.5: Estructura química de las triazinas (atrazina) tomado de Santa-Eufemia *et al.*, 2005

Uso de plaguicidas en Sinaloa

En Sinaloa Durante 2017 se obtuvo una producción de 12 millones 165 mil toneladas de alimentos (CODESIN., 2018). Para lo cual se aplican anualmente un promedio de 223 toneladas de plaguicidas (Leyva *et al.*, 2014). Los cuales, no se quedan en el campo donde se aplican, sino que debido a su filtración y arrastre son llevados hasta las lagunas costeras a través de ríos y del sistema de drenes colindantes (Arellano-Aguilar y Ponce de León Hill, 2016).

Exposición a plaguicidas

Las intoxicaciones con plaguicidas es un problema de salud pública global, estas exposiciones son inevitables debido a la amplia diversidad de formas en que los seres humanos pueden exponerse a estos compuestos (Sabarwal *et al.*, 2018).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud cada año entre 1 a 5 millones de personas se intoxican con plaguicidas, de los cuales mueren entre 5,000 y 20,000. Al menos la mitad de los intoxicados y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto se debe a envenenamientos por consumo de alimentos contaminados. En total entre los dos grupos la mortalidad alcanza la cifra de 220 mil defunciones al año (OMS 2017: Eddleston *et al.* 2002). En México, de acuerdo con la Dirección de Vigilancia Epidemiológica se estiman 2237 casos de intoxicación por plaguicidas hasta Septiembre del 2019 (Dirección General de Epidemiología., 2019). Mientras que para el estado de Sinaloa se reportan 78 casos hacia Septiembre del 2019 (Dirección General de Epidemiología., 2019).

Generalmente los plaguicidas se asperjan en forma aérea y terrestre, lo que expone a los trabajadores de campo a la acción de estas sustancias. Se sabe que aproximadamente un millón de casos de envenenamiento por dichos compuestos es documentado cada año alrededor del mundo, de igual forma se conoce que las vías de ingreso de estas moléculas a los individuos son por contacto dérmico o por inhalación (García 1998).

Los efectos de estas sustancias en las poblaciones expuestas dependen del tipo de molécula, la dosis a la que están sometidas, la forma de ingreso al organismo y el tiempo de exposición así como la susceptibilidad de los individuos, los síntomas pueden ser agudos como vómitos, abortos, cefaleas, somnolencia, o graves alteraciones en el comportamiento, convulsiones, coma e inclusive la muerte y están asociados a accidentes donde una dosis alta es suficiente para provocar alteraciones que se manifiestan tempranamente y también crónicas como el cáncer. De igual manera, se han consignado malformaciones congénitas, neuropatías periféricas y dolores vagos asociados a exposiciones repetidas. Los síntomas aparecen después de un largo período de exposición, lo que dificulta su detección ya que su biotransformación es lenta y provoca efectos acumulados en las personas expuestas (Ferrer y Cabral 1993: Brown y Brix 1998: Pose *et al.* 2000: Potti *et al.* 2003)

Plaguicidas más Utilizados en Sinaloa

De acuerdo a una revisión literaria realizada por García-Hernández y colaboradores en 2018, se encontró que en el valle de Culiacán se aplican por año 223 toneladas promedio de plaguicidas, mientras que en Guasave se aplican 700 toneladas por año, de los cuales se identificaron 59 grupos químicos, siendo los más utilizados los ditiocarbamatos, bupiridilos, organofosforados, organoclorados, ácido benzoico, clorfenoxi, dicamba y 2,4-D (García-Hernández *et al.*, 2018).

En la tabla 3 se enlistan los plaguicidas más utilizados por los trabajadores participantes en el estudio de acuerdo a su clasificación toxicológica, en ella se puede observar que la mayoría de los productos utilizados corresponden a formulaciones de plaguicidas integrantes de las clases Ia, Ib y II, lo que se traduce en una elevada toxicidad en el manejo y aplicación de dichas sustancias.

Tabla 3: Clasificación de los plaguicidas más utilizados en el norte de Sinaloa* (de acuerdo a los trabajadores)

Plaguicidas más utilizados en el norte de Sinaloa	Clase Toxicológica de acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud, 2009
Faena	Clase II: Medianamente tóxico
Malatión	Clase III: Ligeramente tóxico
Glifosato	Clases I-II: Toxicidad alta a moderada
Cipermetrina	Clase Ib: Muy peligroso
Permetrina	Clase III: Ligeramente Tóxico
Amina	Clase II: Moderadamente Tóxico
Furadan	Clase Ia: Altamente Tóxico
Fungicidas	Clases II-IV: De poco a moderadamente tóxicos
Herbicidas	Clases I-II: Toxicidad alta a moderada
Tamarón	Clase Ib: Muy tóxico
Insecticidas	Clases I-IV
Security	Clase III: Ligeramente Tóxico

Datos obtenidos por entrevista directa con trabajadores agrícolas

Daño genotóxico

El daño al DNA conduce a perturbaciones en diversos procesos celulares, los cuales tienen como resultado el desarrollo de cáncer, rupturas de una sola cadena (SSB), rupturas de cadena doble (DSB), estrés oxidativo, modificación de las bases y formación de aductos, los metabolitos secundarios de plaguicidas como el clorfirifos se

unen a la estructura del DNA, produciendo la aparición de este tipo de lesiones, las cuales, son de gran relevancia para la seguridad humana y la salud ocupacional (Wozniak *et al.*, 2018).

Epigenética

La epigenética es definida en 1942 por Conrad Waddington como “la capacidad del medio ambiente de moldear al fenotipo; este concepto deriva de la capacidad de explicar cambios en la herencia del fenotipo que no son atribuibles a la secuencia y por la capacidad de generar varios fenotipos a partir de un genotipo. En los últimos años este concepto ha propuesto la existencia de mecanismos modificadores de cromosomas, los cuales, van a incidir sobre la plasticidad de una célula u organismo (Krause *et al.*, 2016).

El ADN puede ser modificado epigenéticamente por la adición de un grupo metilo en la citosina de los dinucleótidos CpG. En mamíferos actúan tres diferentes DNA metiltransferasas, cada una encargada de indicar un patrón *de novo* específico a una cadena nativa (DNMT 3A y DNMT3B) y posteriormente transferirlo a las nuevas cadenas por mediante la replicación (DNMT1). (Milavezt y Balakhrisnan., 2015).

Se ha reportado que algunos plaguicidas generan alteración de mecanismos epigenéticos, tales como, el Glifosfato, Paraquat, arsénico, entre otros (Collota *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010)

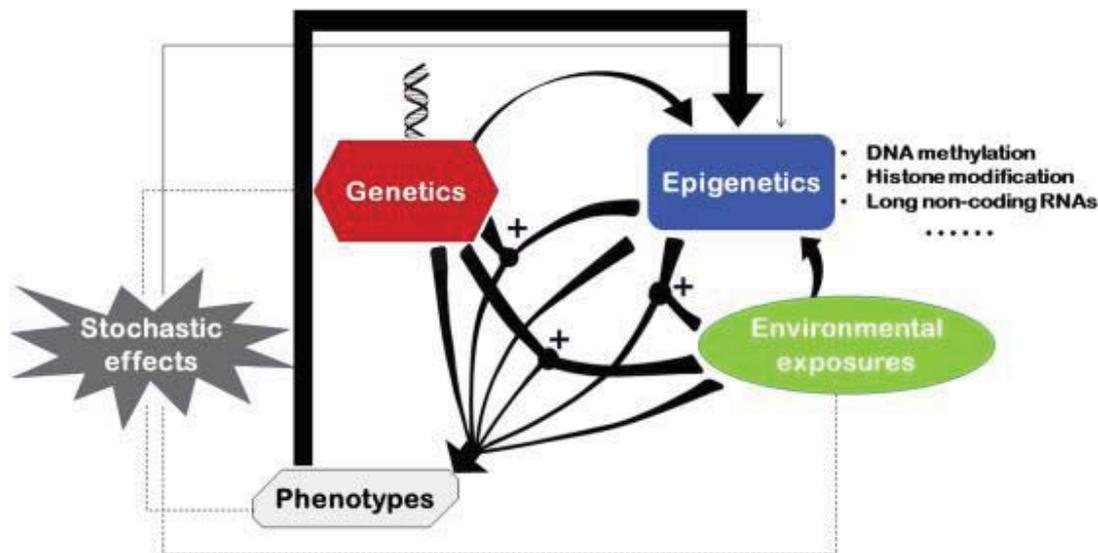


Fig. 2: Relación entre genética, epigenética y exposición ambiental en enfermedades fenotípicas. Imagen tomada de: (Jin y Liu., 2018)

Metilación del ADN

La metilación del DNA ocurre casi siempre dentro de los dinucleótidos Citosina-fosfato-Guanina, este nucleótido puede ser covalentemente modificado por mediante la adición de un grupo metilo al carbono 5' de la citosina, obteniendo como resultado 5-metil-citosina (5mc), este grupo metilo es transferido de la S-adenil-L metionina por medio de DNA metiltransferasas, estos dinucleótidos CpG, se distribuyen cosmopolitamente por el genoma y sus metilaciones se ubican, generalmente en las regiones promotoras (Jaenish and Bird,2003; Mikeska and Craig, 2014). De forma general, la reacción de metilación puede dividirse en tres fases: ciclo de la SAM/ciclo del folato, metilación *de novo* y desmetilación del ADN la cual, a su vez puede ser activa o pasiva.

Como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segunda, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes tumor supresor. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o

simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (Meza-Cornejo., 2006).

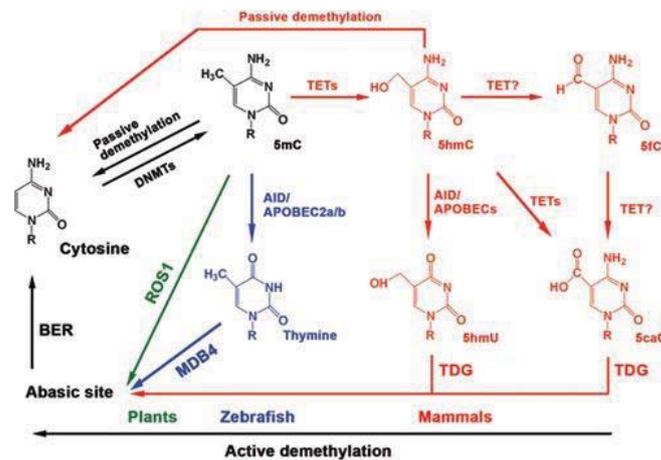


Fig 3: Mecanismo de demetilación del DNA, imagen cortesía de Gong y Zhu., 2011

Los diferentes patrones de metilación son específicos a determinada edad cronológica, se ha reportado que factores ambientales como la exposición a plaguicidas pueden alterar estos patrones haciendo parecer a un individuo más viejo o más joven de lo que en realidad es o provocando que las personas afectadas tengan mayor o menor susceptibilidad a diversas enfermedades, este fenómeno se define como "edad biológica". (Nakamura y Miyako., 2003; Marioni *et al.*, 2016; Marioni *et al.*, 2015; Perna *et al.*, 2016).

A la fecha, una gran variedad de tóxicos ambientales, incluyendo plaguicidas, muestran tener influencia en la metilación del DNA, estos tienen una capacidad para modular los mecanismos de metilación dentro del DNA (Baccarelli y Bollati., 2009; Ruíz-Hernandez *et al.*, 2015). La hipermetilación ha sido identificada en los promotores de genes supresores tumorales en numerosos tipos de cáncer, lo cual, puede conducir a la reducción de su expresión o a su completo silenciamiento. Por otra parte la hipometilación o demetilación de los promotores en protooncogenes puede provocar el incremento en la expresión de esos genes o desbalance en el estatus de metilación de los genes supresores tumorales. Estas alteraciones han

sido reportados en la constante exposición a carcinógenos derivados del tabaco, o compuestos ambientales como cadmio, arsénico y níquel (Russo *et al*, 2018).

Genes supresores tumorales

Los genes supresores tumorales controlan en el individuo sano la proliferación celular, ellos son los encargados de regular el crecimiento, por lo que cuando se encuentran mutados o inactivados, las células dejan de crecer normalmente y adquieren características neoplásicas. La mayoría de los cánceres humanos parece estar acompañada por la pérdida de las funciones de uno o más genes supresores tumorales. Debido a la naturaleza diploide de las células somáticas en mamíferos, es necesario que se inactiven los dos alelos para perder la función oncoprotectora. En la tabla 4 se muestran algunos genes supresores tumorales y su importancia biológica.

Tabla 4: Funciones de los principales genes supresores tumorales.

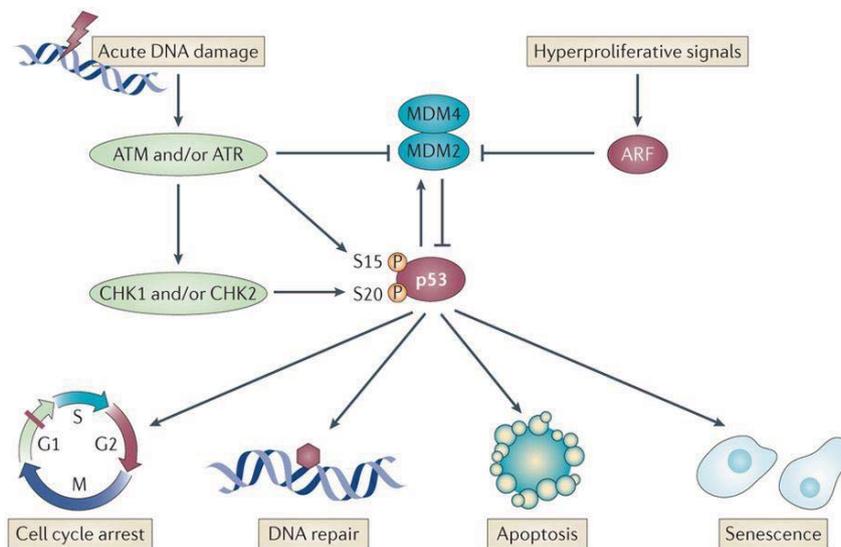
Genes supresores tumorales		
Localización de sus productos	GST	Importancia biológica
Genes para proteínas en citoplasma	APC	Involucrado en cáncer de colon y estómago
	DPC4	Codifica para una molécula de señalización que inhibe la división celular (cáncer pancreático)
	NF-1	Codifica para un inhibidor de la proteína ras, involucrado en cánceres del sistema nervioso y leucemia mieloide
	NF-2	Involucrado en meningioma y ependimoma
Genes para proteínas en el núcleo	MTS1	Codifica para la proteína P16, un componente del reloj del ciclo celular
	Rb	Codifica para la proteína PRb, uno de los principales controles del ciclo celular
	TP53	Codifica para la proteína del mismo nombre que induce a células anormales a matarse entre ellas
	WT1	Involucrado en el tumor de Wilm del riñón
Genes para proteínas sin	BRCA1	Involucrado en cáncer de mama y ovarios

localización específica	BRCA2	Involucrado en cáncer de mama
	VHL	Involucrado en cáncer de células renales

(Brandan *et al.*, 2014).

Gen TP53

El gen TP53, se localiza en el cromosoma 17, contiene 11 exones ubicados en un dominio cromosómico de 20kb, este gen, es el más comúnmente mutado en cáncer humano. A diferencia de otros genes de la misma familia se encuentra involucrado en diversas funciones para mantener la integridad del genoma (Rangel-López *et al.*, 2006).



Nature Reviews | Cancer

Fig. 4: Actividad del gen TP53, de acuerdo a su interacción con otros genes, dependiendo de un determinado estímulo. (Imagen cortesía de: Bieging *et al.*, 2014)

Su proteína, presenta el mismo nombre y actúa como un factor de transcripción que se une al DNA, protegiendo al organismo de la proliferación celular descontrolada, la pérdida de su actividad es observada en diversos tipos de cáncer. Integra múltiples señales de estrés dentro de un programa transcripcional que induce factores y reguladores, actuando en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN o la inducción de la apoptosis (Sammons *et al.*, 2015). Estudios recientes demuestran que el TP53 se une no solo a regiones promotoras, sino que también a factores

potenciadores como el CDKN1A, que se relaciona con el gen promotor proximal e incrementa la respuesta de transcripción (Melo *et al.*,2013).

Dentro del ciclo celular, la TP53 aumenta en respuesta a eventos como el daño al ADN o la activación de oncogenes, esta proteína puede ser inactivada por la unión al antígeno SV40, por la intervención del factor E6, o por una mutación puntual, es fosforilada por los complejos ciclina-CDK de las fases S, G2 y M, y regulada negativamente por su interacción con MDM2 (López-Marure., 2003).

TP53 induce en la expresión de la proteína P21, la cual, actúa como un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) mediante la unión a los complejos ciclina CDK2 o CDK1, que regulan la transición de la fase G1 a S, causando la detención del ciclo celular (Lagunas-Cruz *et al.*, 2014). Esta proteína es activada entre otros factores por daño al ADN. Si este ocurre luego de la replicación del ADN, TP53 detiene el ciclo celular en las fases G2-M, en caso de que sea un daño menor este será reparado por proteínas como P21 y si es irreparable, la célula es conducida a apoptosis mediante los genes BAX, PUMA, FAS o las proteínas Caspasa (Quezada-Ramírez, 2007)

P16

La proteína codificada por el gen CDKN2A, MST, INK4A se encuentra situada en el cromosoma 9 en la posición p21, y actúa como un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas, mediante la desaceleración de la progresión del ciclo celular o la inhibición de los complejos CDK4 y CDK6- ciclina D, que a su vez, promueven la inactivación de la proteína del retino blastoma, la cual, tiene detenido al factor de transcripción E2F, permitiendo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Comino-Delgado *et al.*, 2013).

La pérdida de expresión de las funciones en P16 está relacionada con la detección temprana de anomalías cancerígenas (Lingbao *et al.*, 2003). El producto de INK4A/ARF, P16-ARF detiene el ciclo de proliferación en la etapa de senescencia mediante la inhibición de MDM2, estabilizando TP53 e inhibiendo, de igual forma

otros complejos que promueven el paso de la fase G1-S del ciclo celular (Satyanarayana y Rudolph., 2004).

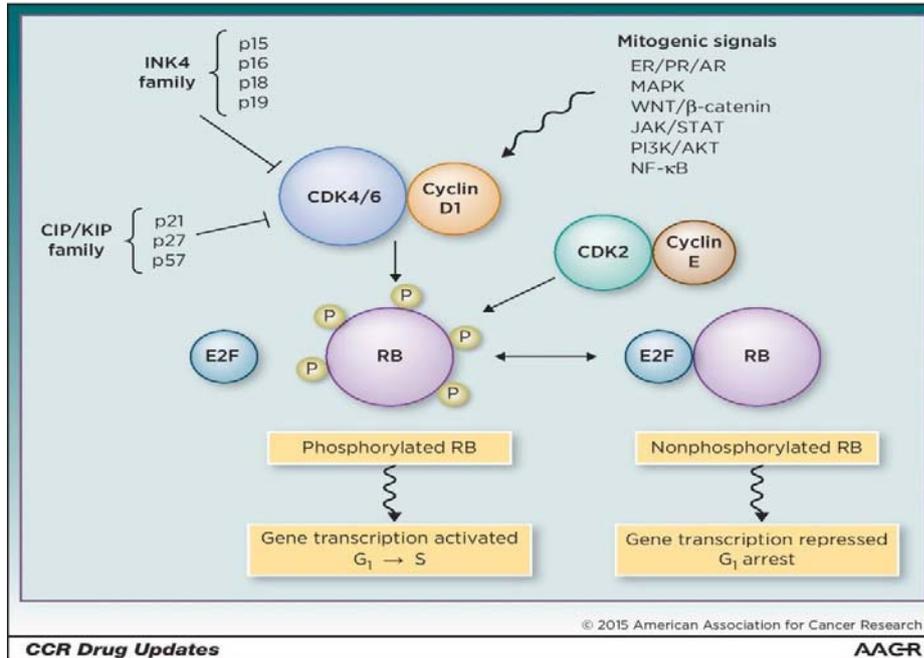


Fig. 5: Mecanismo de acción del gen supresor tumoral P16 dentro del ciclo celular (Imagen tomada de Morikawa y Henry., 2015)

Metilación como biomarcador epigenético

La metilación del ADN es un biomarcador potencial para la implementación clínica de la medicina en cáncer, el ADN es la molécula biológica más estable en el cuerpo y la metilación es una modificación covalente que representa un cambio químico del estado nativo.

La hipermetilación de regiones promotoras ocurre frecuentemente en las etapas tempranas del cáncer en seres humanos, razón por la cual representa un candidato ideal para el diagnóstico temprano de lesiones displásicas pre malignas y carcinomas *in situ*, con particular relevancia en grupos de alto riesgo (Liliglou *et al.*, 2012).

La detección por biomarcadores es una metodología relativamente no invasiva, conveniente y económica utilizada en actividades clínicas para el diagnóstico de

enfermedades, sin embargo, algunos biomarcadores convencionales para diversos tipos de cáncer como el gástrico tienen una sensibilidad y especificidad insuficientes para su adecuada implementación en el diagnóstico temprano de la enfermedad, por lo que es de urgente necesidad el mejoramiento de biomarcadores que permitan un certero diagnóstico molecular, (Sawaki *et al.*, 2018).

El análisis de metilación en genes supresores tumorales específicos aparentemente resulta un método efectivo para distinguir lesiones precursoras y no precursoras de diversas patologías (Rogeri *et al.*, 2018). La búsqueda del genoma, epigenoma y transcriptoma personalizado puede ser de utilidad para identificar nuevos potenciales biomarcadores predictores de la respuesta inter-individual ante una determinada enfermedad (Samblas *et al.*, 2018) y han permitido la identificación de marcadores epigenéticos para consecuencias fenotípicas acumulativas de los cambios ambientales (Hwang *et al.*, 2018).

La identificación de biomarcadores de metilación del DNA ha surgido como uno de los logros más prometedores para la detección de diversos tipos de cáncer y presenta mayores ventajas en comparación a otros marcadores, la hipermetilación anormal en regiones promotoras dentro de genes como P16, MGMT, DAPK, entre otros son consideradas como biomarcadores para la detección, predicción y pronóstico de distintos tipos de cáncer por lo que diversos estudios han investigado la relación entre la metilación y expresión aberrante de determinados genes y su potencial valor predictorio (Zhou *et al.*, 2018).

Los datos obtenidos de diversos análisis de metilación permiten establecer biomarcadores de respuesta a inmunoterapia y a la influencia de los genomas tumorales al microambiente inmunitario (Chakravarthy *et al.*, 2018; Duruisseaux *et al.*, 2018).

2.- Antecedentes:

Referencia	Metilación o daño genotóxico	conclusiones
Saad-Hussein <i>et al.</i> , 2019	Daño genotóxico	Se reportó un incremento en los niveles de TP53, daño en los telómeros y fragmentación del DNA en trabajadores rurales
Gouveia-Prudente <i>et al.</i> , 2018	Daño genotóxico	Reportaron una constante asociación entre la exposición a plaguicidas y disfunciones renales
Hicks <i>et al</i> , 2017	Daño genotóxico	Reportaron una alta asociación entre la exposición a plaguicidas y el retraso neurológico en niños procedentes de familias expuestas
El-Okda <i>et al</i> , 2017	Daño genotóxico	Determinaron que los trabajadores con un alto o moderado nivel de exposición presentaban diferencias en genes de mutación
Rendón von osten y Dzul Caamal, 2017	Daño genotóxico	Identificaron una alta exposición a glifosato en trabajadores de zonas agrícolas de Campeche
Zepeda-Arce <i>et al</i> , 2017	Daño genotóxico	Reportaron que los trabajadores temporales presentaban una mayor exposición a plaguicidas que los trabajadores de planta
Martínez-Valenzuela <i>et al</i> ,	Daño genotóxico	Se concluyó que la aspersión

2017

Blanco-Muñoz *et al*, 2016

Daño genotóxico

aérea causaba un gran daño al DNA incluso en trabajadores con menos de dos años

Confirmaron que los plaguicidas actúan como disruptores de la hormona tiroidea en trabajadores expuestos

Castañeda-Yslas *et al*, 2016

Daño genotóxico

Reportaron los riesgos de la exposición a plaguicidas en trabajadores, mujeres y niños expuestos

Kwiatkowska *et al.*, 2017

Metilación del DNA

Evidenciaron que la exposición a glifosato causaba metilaciones en el gen P16

Lind *et al* ., 2018

Metilación del DNA

Lograron evidenciar que la exposición a plaguicidas organoclorados incrementaba las metilaciones

Ghosh *et al.*, 2017

Metilación del DNA

Reportaron que el plaguicida organoclorado endosulfán modulaba los reguladores epigenéticos celulares y contribuía en procesos oncogénicos

Jamebozorgi *et al*, 2018

Metilación del DNA

Concluyeron que la metilación aberrante de genes como P14 y P15 tiene repercusiones en la metilación de otros genes supresores tumorales

3.- Planteamiento del problema.

Los trabajadores agrícolas son rutinariamente expuestos a varios tipos de agroquímicos, los cuales, han demostrado efectos adversos en la salud y al desarrollo enfermedades que van desde perturbaciones en las vías respiratorias hasta diversos tipos de cáncer que atañen al riesgo por exposición ocupacional, la amenaza real de estos compuestos a la salud pública está ampliamente establecida (Dhananjayan and Ravichandran, 2018).

El Estado de Sinaloa es conocido “ El granero de México” por la gran variedad y calidad de alimentos que produce (CODESIN., 2014). Sin embargo se aplican anualmente un promedio de 223 toneladas de plaguicidas (Leyva *et al.*, 2014).

Los efectos de estos compuestos en las poblaciones expuestas dependen del tipo de molécula, la dosis a la que están sometidas, la forma de ingreso al organismo y el tiempo de exposición así como la susceptibilidad de los individuos. Estos efectos pueden ser agudos (vómitos, abortos, cefaleas, somnolencia, alteraciones en el comportamiento, convulsiones, coma e inclusive la muerte) y también crónicos como el cáncer.

Comúnmente, los plaguicidas han demostrado la capacidad de inducir cambios en la metilación del DNA dentro de 712 genes en líneas celulares cancerígenas utilizadas en estudios *In vitro*, sin embargo, la falta de investigación a nivel epigenoma en seres humanos expuestos hacen que el conocimiento acerca de los efectos de los plaguicidas en las alteraciones de los patrones de metilación del DNA sea muy limitado actualmente (Zhang *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2018).

- ✓ Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis. (Robertson, 2005; Schulz, 2005).

Diversos estudios han demostrado el daño genotóxico de los plaguicidas utilizados en regiones como el valle agrícola del norte de Sinaloa, Sin embargo, en México y más aún, en Sinaloa, es importante abordar el factor de riesgo epigenético que representa la constante exposición a plaguicidas, ya que, con ello se aportan más pistas sobre como el ADN y la regulación de la transcripción génica por mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN contribuye de manera importante en el aumento de enfermedades como el cáncer en la población

El presente estudio buscará identificar la aparente relación entre la exposición a plaguicidas y el incremento de padecimientos genéticos y celulares en trabajadores agrícolas del norte de Sinaloa, para ello, se buscará implementar la metilación presente dentro de los genes supresores tumorales TP53 y P16 como un potencial biomarcador epigenético con la sensibilidad y especificidad suficientes para entregar un diagnóstico adecuado que permita a los pacientes ocupacionalmente expuestos a plaguicidas prevenir enfermedades como el cáncer desde sus primeras etapas, mejorando así sus posibilidades de supervivencia al mismo. De igual manera, se buscará aportar argumentos sólidos para la búsqueda de políticas públicas que cumplan satisfactoriamente con los convenios que atañen a una reducción en el uso de plaguicidas, alternativas sustentables, buenas prácticas agropecuarias, entre otros.

Pregunta de Investigación

¿Será la metilación en los genes TP53 y P16 un biomarcador epigenético adecuado para el diagnóstico de daño por exposición ocupacional a mezclas complejas de plaguicidas en trabajadores agrícolas al ser comparada con personas sin exposición?

4.- Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Los genes supresores tumorales TP53 y P16 son ampliamente estudiados para identificar las alteraciones epigenéticas causadas por exposición a plaguicidas, por lo que una metilación aberrante dentro de sus regiones promotoras será un biomarcador viable para detectar el daño epigenético

Objetivos

General:

Evaluar la eficacia de la metilación dentro de los genes supresores tumorales TP53 y P16 como un biomarcador para diagnosticar daño por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas ocupacionalmente expuestos, mediante su comparación con personas sin exposición a dichos compuestos. Con la finalidad de proponer un instrumento de análisis preventivo que permita a los trabajadores conocer el grado de daño en su DNA y pueda tomar acciones para mejorar su calidad de vida

Específicos:

- 1.- Registrar las variables universales (nombre, edad, sexo, ocupación, etc.) en ambos grupos de estudio.
- 2.- Analizar los niveles de metilación en la región promotora de los genes TP53 y P16 de trabajadores agrícolas ocupacionalmente expuestos a mezclas complejas de plaguicidas
- 3.- Estimar los niveles de metilación dentro de la región promotora de los genes TP53 y P16 en personas sin exposición a estos compuestos (grupo control).
- 4.- comparar los resultados de los niveles de metilación de ambos genes para los dos grupos.
- 5.- Estimar la eficacia diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores de predicción positivos, valores de predicción negativos, razones de verosimilitud positiva y negativa de la metilación en ambos genes)
- 6.- Calcular curva ROC y el área bajo la curva con los resultados de ambos grupos
- 7.- Estimar los valores de riesgo relativo de la presencia de metilaciones en ambos genes supresores tumorales.

5.- Metodología

Diseño experimental

Área de estudio:

El norte de Sinaloa concentra la mayor parte de la producción agrícola en el estado, al tener ubicados los valles del fuerte, el carrizo y Guasave, los cuales, son junto con los valles de Culiacán y Navolato, los sitios con la agricultura más tecnificada del estado.

Tipo de estudio: Se llevó a cabo un estudio de casos y controles con carácter observacional, corte transversal y con un enfoque prospectivo, para el cual se redactaron cuestionarios con finalidad de obtener información que permitiese describir adecuadamente la presencia o ausencia de la variable de interés en la población evaluada

Definición de la población:

Grupo ocupacionalmente expuesto: 50 individuos del sexo masculino con un rango de edad entre del 18 y 40 años, que cuenten con un periodo mínimo de dos años laborando de forma continua en campos agrícolas.

Grupo no expuesto: 50 individuos del sexo masculino de un rango de edad similar al grupo ocupacionalmente expuesto pero que realicen actividades no vinculadas al sector agrícola o que involucren su exposición a sustancias potencialmente tóxicas (gasolinas, diésel, asbestos, etc.).

Determinación estadística del tamaño de muestra:

- Estimación de proporciones.

$$N = \frac{Z\alpha^2 P(1-P)}{d^2}$$

- Correlación para poblaciones finitas.

$$n_a = n[1 + (n/N)]$$

La presente investigación consistió en un estudio piloto para la cual se reclutó una muestra de 50 individuos ocupacionalmente expuestos a mezclas de plaguicidas, pareados por edad y hábitos con 50 individuos no expuestos a mezclas de plaguicidas

Criterios de selección

Criterios de inclusión

Grupo ocupacionalmente expuesto. Individuos del sexo masculino con un rango de edad entre los 18 y 40 años, y un periodo mínimo de 2 años laborando de forma continua en campos agrícolas, que acepten firmar el consentimiento informado, y no presenten comorbilidades (diabetes, hipertensión, etc.), o hayan sido diagnosticados previamente con alguna enfermedad o estén bajo tratamiento además del no consumo de alcohol, cigarro o drogas

Criterios de exclusión:

Individuos menores de edad, personas que no acepten participar en el estudio, o que sus actividades no involucren directamente la manipulación de plaguicidas

Criterios de eliminación:

Individuos con datos faltantes en los formularios o con muestra insuficiente y personas cuya muestra se vea afectada durante el proceso.

Grupo no expuesto o control

Criterios de Inclusión

Individuos del sexo masculino, con un rango de edad similar al grupo ocupacionalmente expuesto, que desarrollen actividades no vinculadas al sector agrícola y no estén vinculados a actividades laborales que impliquen exposición a algún otra sustancia toxica (gasolinas, asbestos, etc.) no presenten alguno de los factores de confusión anteriormente mencionados.

Criterios de exclusión:

Individuos menores de edad, personas que no acepten participar en el estudio y personas con una diferencia de edad mayor o igual a 5 años con respecto a su contraparte en el grupo expuesto.

Criterios de eliminación

Personas con muestra insuficiente o datos incompletos e individuos cuya muestra se vea afectada durante el proceso

Fuentes de información:

A los individuos integrantes de ambos grupos se les solicitó su participación voluntaria mediante un formato de consentimiento informado, previamente aprobado por el comité de bioética y ética en la investigación del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y el comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO). De igual manera, los datos referentes al tiempo laborando, plaguicidas utilizados, tiempo de exposición, etc. fueron obtenidos mediante un cuestionario que les fue aplicado a los integrantes de ambos grupos.

Diseño Metodológico

Registro de las variables universales en ambos grupos de estudio. Los cuestionarios para el registro de las variables universales fueron elaborados de acuerdo a la información que requería el estudio, por lo que se plantearon cuestionamientos acerca del historial clínico reciente, historial laboral, hábitos alimenticios y de estilo de vida, entre otros.

Selección de los sitios propensos a metilación y primers específicos para MS-PCR

Las regiones más propensas a metilación en ambos genes se identificaron en la literatura publicada, la cual, demostró que diversos autores diferían en sitios específicos, pero a su vez, coincidían en que estos sitios correspondían a regiones promotoras dentro de cada gen, a dichas regiones se les determinó su contenido de dinucleótidos CpG mediante las plataformas Meth Primer® y Data Base of Transcriptional Start Sites (DBTSS) ®. Las secuencias primer para las regiones metiladas y no metiladas de ambos genes fueron determinadas de acuerdo a una nueva revisión exhaustiva de publicaciones, a las cuales les fueron evaluados los criterios para el diseño de primers para MS-PCR descritos por Radoslav Davidovicy colaboradores en 2014 (contenido de islas CpG, diferencia mínima de 5°C en las temperaturas de alineamiento y un fragmento de amplificación máximo de 300pb).

Fue realizada una primera estandarización para evaluar los reactivos a utilizar y comprobar la correcta amplificación de los oligos seleccionados, para la cual se colectó 1ml de sangre periférica de seis individuos sanos mediante la técnica de punción venosa en tubos Vacutainer de 2ml con EDTA. Se extrajo el ADN mediante la metodología de Gustincich *et al*, 1991 mediante la solución CTAB al 5%. 300 µl de sangre en un tubo eppendorf fueron adicionados con 600 µl de buffer de lisis, se agitó por inversión 1min, la muestra fue incubada a 68°C 5 min para después añadirse 900µl de cloroformo y centrifugado a 10000 rpm durante 5 min a 25°C. Posteriormente se adicionó 100µl de solución CTAB 5% y 900µl de agua des ionizada, se volvió a centrifugar a 10000 rpm por 5 min a 25°C y posteriormente se realizaron lavados con 200 µl de Nacl 1.2 M, y 750 µl de etanol absoluto y etanol al 70%, enseguida se centrifugó a 10000 rpm a 25°C por lapsos de 5-10 min. Se realizó un secado por inversión mediante 3h y se adicionaron 150 µl de buffer TE 10x para finalmente almacenarse a -20°C, cuantificarse mediante la utilización de nanodrop a una absorbancia de 260/280nm y visualizarse en un gel de agarosa al 1.5% con una tinción de bromuro de etidio. Para realizar la conversión con bisulfito de sodio se solicitó una muestra del kit EZ DNA methylation lighting (ZYMO research, U.S.A.) a la empresa Bioassys, y se siguieron las instrucciones del fabricante. La amplificación PCR fue realizada con base en las condiciones reportadas por Jarzynski y colaboradores en 2016, y se consiguieron alícuotas de primer para los genes TP53 y NOTCH1 en el laboratorio de genómica funcional, CIDIIR-IPN unidad Guasave. Los productos del PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

Reclutamiento de participantes y toma de muestra:

Se reclutaron a trabajadores del campo agrícola "el porvenir" en la comunidad de Zapotillo, Ahome Sinaloa y en la comunidad de 3 Garantías, El Fuerte Sinaloa, con la colaboración del personal responsable, a continuación se procedió a informar a los trabajadores acerca de la relación beneficio-riesgo del estudio y así como de la importancia del resultado que obtendrían, para que de esta manera tuvieran las herramientas necesarias para tomar medidas preventivas. Además se les informó

acerca del consentimiento informado y de la confidencialidad de la información capturada en este y se aclararon las dudas que cada uno exponía.

Al concluir esta breve plática y de la verificación de los criterios de inclusión y exclusión se procedió a la entrega de los cuestionarios, a la vez que a los participantes se les realizaba la técnica de la punción venosa con la colaboración de una enfermera. Este procedimiento se realizó en el grupo control, compuesto por individuos no expuestos, procedentes de la ciudad de Los Mochis Sinaloa. Las muestras fueron transportadas en hieleras a una temperatura de -20°C

Aislamiento y cuantificación del DNA

Se procedió al aislamiento del DNA procedentes de sangre total para lo cual se tomaron $400\mu\text{l}$ de muestra y se procedió al proceso de aislamiento de DNA mediante el kit comercial QUIAmp DNA blood mini kit (QUIAGEN®) siguiendo las indicaciones del fabricante. Al final este DNA fue cuantificado mediante la utilización de nanodrop a una longitud de onda de 260/280 nm

El DNA con la concentración mayor o igual a $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ fue posteriormente tratado mediante bisulfito de sodio, con el fin de detectar las citosinas metiladas y evitar su posterior deaminación en uracilo y en timina, utilizando el kit EZ DNA methylation gold (Zymo Research®), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. Al final de este proceso el DNA está listo para ser amplificado mediante PCR.

Para la amplificación del DNA convertido se realizaron dos reacciones PCR, una correspondiente a la secuencia metilada y otra a la no metilada, y una amplificación de validación utilizando como control el Universal Human DNA methylated (ZYMO research®), se utilizaron los primer de metilación específica para los genes TP53 y P16 previamente consultados en literatura y corroborados en las bases de datos

DBTSS®, con los cuales, se preparó un mix, a una concentración de 10µl que contenía 4µl de master mix Epitect MSP kit (QUIAGEN®), 0.5µl de ambos primer, 2µl de DNA muestra convertido y 3µl de agua libre de RNAsas. Las condiciones del termociclador fueron: temperatura inicial 95°C 15 min, para activar la Taq hotstart Dtech y posteriormente una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 sec., una de alineamiento de 58°C para TP53 metilado, 65°C para P16 metilado, 53°C para TP53 no metilado y 60°C para P16 no metilado durante 40 sec. Y un paso de elongación de 72°C por 1 min, esto con una duración entre los 35-45 ciclos, después se procedió a una elongación final de 72°C por 7 min y una temperatura de almacenamiento a 4°C

. Visualización en geles de electroforesis

Los productos de PCR fueron posteriormente observados en geles de agarosa 2% (TP53) y en poliacrilamida al 5% (P16), para los geles de agarosa se utilizó buffer TBE 1X, buffer de carga azul de bromofenol, ladder de 100pb y SYBR safe, para los geles la cámara de poliacrilamida y se corrieron en las cámaras a un voltaje de 100V por 30-45 minutos (TP53) y entre 200V por 45-60 minutos (P16) y posteriormente ambos geles se visualizaron mediante luz UV

Registro de las variables universales dentro de ambos grupos.

Obtención de los estadísticos descriptivos:

Los datos obtenidos en los cuestionarios fueron trasladados al software estadístico SPSS versión 23®, con los cuales, se construyó una matriz, en la que se variables relacionadas al tiempo laborando, horas continuas de exposición a plaguicidas, hábitos de consumo de sustancias como alcohol, tabaco, etc., estrés, edades, peso, talla, entre otras. Con estos datos se obtuvieron los porcentajes, promedios, desviaciones estándar y la frecuencia en la que se presentan las principales variables en los participantes.

Asociación de las variables, fueron realizadas pruebas de Chi cuadrado mediante el programa SPSS versión 23®, se tomó como referencia un valor de confianza de 0.05 para determinar la asociación estadística entre la presencia o ausencia de metilación en ambos genes y las variables categóricas evaluadas, en el caso de las variables continuas se utilizó la prueba U de Mann Whitney.

Viabilidad como biomarcadores

Para este objetivo se utilizaron los software estadísticos SigmaPlot versión 14®, y SPSS versión 23® y se estimaron los valores de sensibilidad, especificidad, y razones de verisimilitud. Posteriormente se calculó el área bajo la curva ROC utilizando las variables continuas (horas de exposición semanal, años de aplicación, etc.) como variable de estado con un valor máximo de 1 y la presencia o ausencia de metilación como variable de prueba, estos análisis fueron desarrollados en ambos programas, el

riesgo relativo fue determinado con variables como las horas de exposición semanal, para lo cual los datos fueron agrupados en trabajadores con menos de 30 horas de exposición semanal y aquellos con más de 30 horas de exposición, y aquellos que realizaban mezclas de dos o más plaguicidas, en comparación con los que no las realizaban. Estos análisis se llevaron a cabo en el software SPSS versión 23®

6.- Resultados

Definición de la población

Como se observa en la tabla 5, correspondiente a la descripción general de la población La edad de los participantes tuvo una media de 36 años para el grupo expuesto y 31 años en el grupo control, un peso de 78 kg en el primer grupo y 75kg para el segundo la estatura se encontró entre 171.1cm ± 172.4cm, la gran mayoría dijo no padecer ninguna enfermedad al momento de la realización de la toma de muestra, sin embargo, también mencionaron tener antecedentes familiares correspondientes a dos o más enfermedades que les fueron mencionadas en las entrevistas. Solamente, un 37% de los pacientes evaluados presentaba problemas de obesidad, mientras que un 20.6% padecía un ligero sobrepeso, el consumo de tabaco fue muy bajo entre la población, debido a que únicamente el 30% se consideró fumador, no obstante, en el caso del consumo de alcohol, cerca del 37.2% comentó no tener dicho problema en el grupo expuesto, sin embargo, del 62.8% que lo presentaba, la mayoría lo consumía en pocas ocasiones.

Tabla 5: Descripción general de la población evaluada

Variable	Categoría			Grupo expuesto (43)			Grupo control (23)		
	M	F							
Sexo*				81.4%	18.6%		63.6%	36.4%	
Edad*	media	error	desviación	36.21	1.87	12.26	31.4	-	8.5

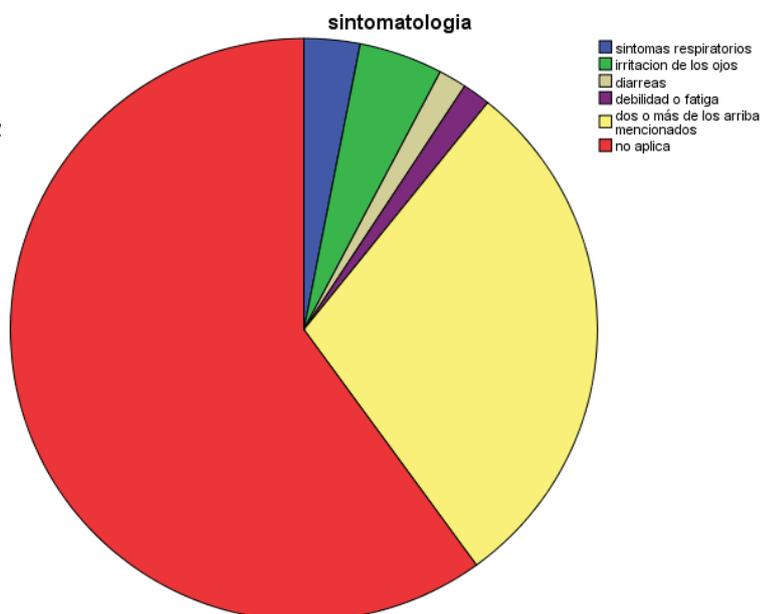
Peso	media	error	desviación	78.07	1.86	12.23	75.2	-	19.7
Talla	media	error	desviación	171.16	1.27	8.33	172.4	-	11.4
Padece enfermedades	si	No		27.9%	72.1%		100%		0%
Antecedentes	si	No		72.1%	27.9%		13.6%		86.4%
Fármacos	si	No		16.3%	86.7%		0%		100%
Obesidad	si	no	Ligero sobrepeso	23.3%	69.8%	7.0%	13.6%	72.7%	13.6%
Fumadores*	si	No		25.6%	74.4%		4.5%		95.5%
Consumo de alcohol*	si	No		62.8%	37.2%		18.2%		81.8%
Frecuencia semanal	poco	moderado	Frecuente	30.2%	18.6%	9.3%	81.8%	4.5%	13.6%
Cercanía a campos	si	No		97.7%	2.3%		13.6%		86.4%
Ocupación laboral*	Jornalero	Otros		79.1%	21.0%		0%		100%
Tiempo laborando	media	error	desviación	12.51	2.42	15.92			
Plaguicidas Frecuentes*	mezcla	glifosato	otros	62.8%	11.6%	2.3%	-	-	-
Ropa especial	si	No		34.9%	65.1%		-		-
Separa la ropa	si	No		55.8%	44.2%		-		-
Horas sem. Aplicando*	media	error	desviación	23.8	3.60	23.61	-	-	-
Años Aplicando*	media	error	desviación	1.74	0.33	0.87	-	-	-
Estrés*	si	No		34.9%	65.1%		0%		100%
Sitio de preparación de mezclas	abierto	cerrado	ambos	53.5%	14.0%	30.2%	-	-	-
Destino final de los envases	contenedores	Al aire libre		30.2%	53.5%		-		-
Metilación TP53*	presente	Ausente		65.1%	34.9%		22.7%		77.3%
Metilación P16*	presente	Ausente		65.1%	34.9%		22.7%		77.3%

*variables estadísticamente

significativas a un IC=0.01

Tabla 6: Porcentaje de Sintomatología presentada en la p expuesta y no expuesta a plaguicidas

Síntomas	Porcentaje
síntomas respiratorios	3.1
irritación de los ojos	4.6
diarreas	1.5
debilidad o fatiga	1.5
dos o más de los arriba mencionados	29.2



	no aplica	60.0
	Total	100.0

Fig. 6: representación gráfica de la sintomatología en la población

De igual manera, para el grupo control, el consumo de alcohol fue más bajo, puesto que el porcentaje se ubicó en 18.2%, la mayoría de los participantes confesó vivir cerca de algún campo agrícola, más sin embargo, no percibían olores o polvos relacionados a la aplicación de los compuestos. El 80% de los evaluados en el grupo expuesto, laboran como jornaleros en campos agrícolas del norte de Sinaloa, con un promedio laboral de 12.5 años \pm 15.9 años y la gran mayoría confesó preparar mezclas de dos o más plaguicidas durante un promedio de 23.8 horas a la semana, durante el último año entre los principales compuestos que se encontraban el glifosato, faena, security, paracuat, tamarón, etc. para las cuales, generalmente no cuentan con un equipo especial y en reiteradas ocasiones no suelen separar su ropa laboral de la del resto de su familia, Además de pasar más de 15 minutos sin tomar una ducha después de aplicar los compuestos, el estrés no fue factor determinante, puesto que los participantes manifestaron no estar sometidos a él. Al momento de aplicar los plaguicidas, los participantes mencionaron haber padecido síntomas de irritación dérmica y ocular, vías respiratorias, fatigas, diarreas, etc. (Tabla 6) de acuerdo al análisis realizado se encontró que el 65% del grupo expuesto presentaba metilaciones para ambos genes, mientras que para el grupo no expuesto la metilación presentada fue del 23%

Búsqueda de los sitios propensos a metilación y ubicación de secuencias primer

Se obtuvieron secuencias procedentes de los sitios -132 y -139pb para el gen TP53y de los sitios 21,974,579- 21,975,306pbpara el gen P16, los cuales, presentaban

fragmentos de amplificación entre las 247 y 150pb y reunían los criterios para ser considerados primer de acuerdo a lo reportado en la literatura internacional.

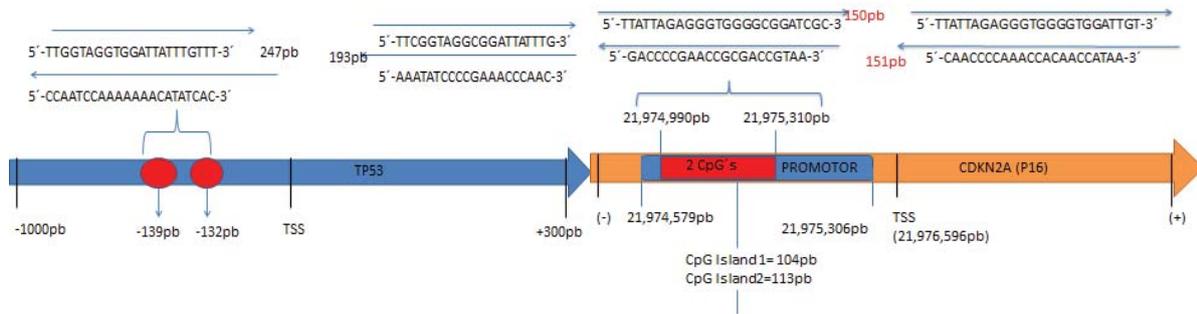


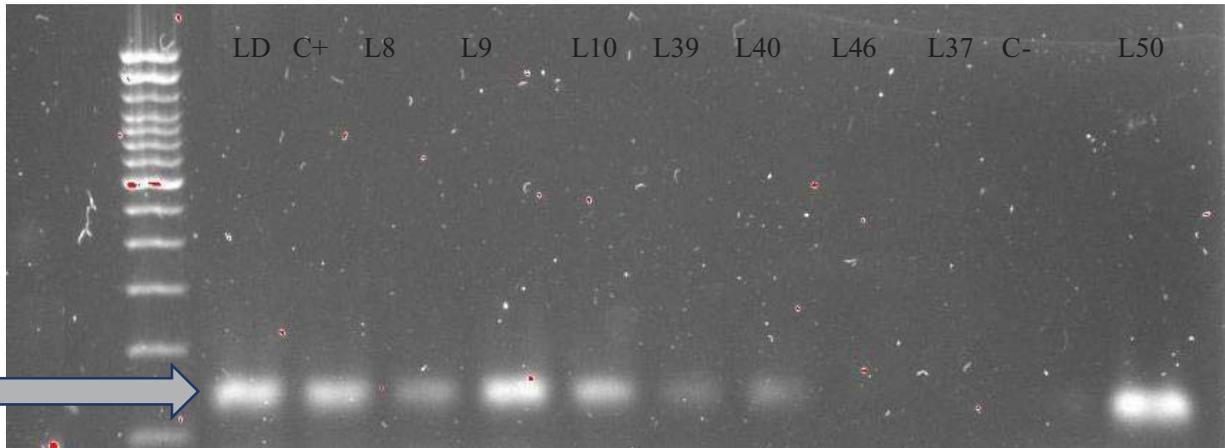
Fig. 7 Ubicación y amplificación de los primers seleccionados en ambos genes

Aislamiento y cuantificación del DNA:

Se obtuvieron muestras de DNA con concentraciones entre 35-89 ng/μl, suspendidas en 200μl de buffer de elución (Quiamp DNA blood) o de buffer TE (Gustincich). Los valores de absorbancia a longitudes de onda de 260/280nm estuvieron en el rango entre 1.7 y 2.0.

La visualización de los gels correspondientes a las secuencias metiladas M para ambos genes y fueron considerados como pacientes con daño epigenético aquellas que presentaban una banda de 193pb para TP53 y 150pb para P16 que coincidía con la marca de las pares de bases descritas en lo amplificado por el respectivo gen. En la imagen posterior se aprecia que el control positivo (DNA metilado comercial) muestra la banda correspondiente, mientras que el control negativo (agua libre de RNAsas) no muestra banda, por lo que no se observó indicios de contaminación, los carriles que muestran amplificación corresponden a participantes que presentaron metilación en ambos genes mientras que los carriles que no mostraron señal corresponden a participantes con ausencia de metilación en ambos genes

A)



B)

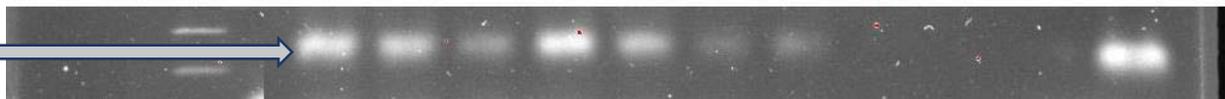


Fig. 8: Visualización de los productos de PCR de los participantes, correspondiente a las secuencias metiladas. A) en geles de agarosa se observaron bandas de 193pb, lo cual corresponde con metilaciones en el gen TP53. B) al igual que en TP53, en los geles de poliacrilamida se consideraron como metilados en P16, aquellos individuos con bandas correspondientes a 150pb. Como control metilado positivo se utilizó DNA comercial (carril 2) y se utilizó agua libre de RNAsas como control negativo para identificar eventuales contaminaciones (carril 11)

Asociación

Como se observa en las tablas 7 y 8, factores como la edad, el peso o la talla de los participantes no mostraron una influencia significativa en la presencia o ausencia de metilaciones en ninguno de los dos genes evaluados

Tabla 7 : Mann-Whitney U Test By variable METP53 Marked tests are significant at p <.05000										
	Rank Sum - 2	Rank Sum - 1	U	Z	p-level	Z - adjust ed	p-level	Valid N - 2	Valid N - 1	2*1sided exact p
ED	547.00	273.000	141.	-	0.42	-	0.42	28	12	0.439436

AD	00	0	000	0.79	552	0.7976	508			
			0	688	1	3	7			
PE	521.50	298.500	115.	-	0.12	-	0.12	28	12	0.122376
SO	00	0	500	1.54	126	1.5530	040			
			0	949	5	6	9			
TAL	537.50	282.500	131.	-	0.28	-	0.27	28	12	0.285680
LA	00	0	500	1.07	136	1.0823	909			
			0	726	3	5	7			

Tabla 8: Mann-Whitney U Test (Datos_Luis M.sta) By variable **MEP16** Marked tests are significant at p <.05000

	Rank Sum - 2	Rank Sum - 1	U	Z	p-level	Z - adjusted	p-level	Valid N - 2	Valid N - 1	2*1sided - exact p
ED	540.500	279.500	162.5	-	0.707	-	0.707	27	13	0.710967
AD	0	0	000	0.375	367	0.3757	105			
				40		5				
PES	515.000	305.000	137.0	-	0.266	-	0.265	27	13	0.276478
O	0	0	000	1.111	248	1.1143	147			
				75		1				
TAL	520.500	299.500	142.5	-	0.340	-	0.338	27	13	0.345259
LA	0	0	000	0.952	628	0.9574	352			
				93		3				

En la tabla 9 se identifica la asociación o influencia estadísticamente significativa entre la presencia o ausencia de metilaciones en ambos genes supresores y las diferentes variables evaluadas, se puede observar una fuerte asociación (IC=0.01) en factores como los plaguicidas frecuentemente utilizados por los trabajadores, el cambio de la ropa de trabajo, el comer, fumar o beber en el área de trabajo, consumo de alcohol, la ocupación, el separar la ropa laboral del resto, la realización de mezclas entre dos o más plaguicidas y las horas de exposición semanal. Factores como tener antecedentes de padecimientos dentro de la familia, utilizar ropa especial o fumar presentaron una significancia estadística menor (IC=0.05). Mientras que factores como el peso, talla, de los participantes, así como el estrés o los años laborando no presentaban asociación estadísticamente significativa con la presencia o ausencia de metilaciones en TP53 y P16. (P value >0.05)

Tabla 9: Asociación de la presencia o ausencia de metilaciones en ambos genes con las diferentes variables, utilizando índices de confianza de 0.05 y 0.01

variable	P Pearson	M-L Chi square
Antecedente fam.	0.042	0.045
Consumo Tabaco	0.038	0.048
Consumo Alcohol	0.010	0.012
Ocupación	0.018	0.014
Plaguicidas frecuentes	0.004	0.003
Ropa Especial	0.024	0.030
Cambio de ropa	0.000	0.000
Separa la ropa	0.015	0.016
Come, bebe o fuma en el trabajo	0.000	0.000
Exposición semanal	0.019	0.023
Mezcla plaguicidas	0.010	0.012

Pruebas de viabilidad como biomarcadores

En la tabla 10 se identifican los valores de sensibilidad, especificidad y los valores de razón positiva y negativa de la prueba MS-PCR, para esto se utilizó como variable de estado las horas de exposición semanal a plaguicidas, posteriormente en la figura 30 y figura 32 se muestra en la curva ROC que el punto de corte del área bajo la curva se ubica en 0.85, por lo que corresponde un valor de sensibilidad de 0.86 y un valor de especificidad de 0.45 con una razón positiva de 1.5964 y una razón negativa de 0.2916, de acuerdo a la literatura consultada, una prueba con un área bajo la curva ROC de 1 se considera excelente para emitir un pronóstico correcto, mientras que las pruebas con 0.5 o inferiores se consideran con una precisión entre regular a inadecuada, por lo que un valor de 0.85 se considera que confiere a la prueba realizada un valor pronóstico adecuado

Tabla 10: Pruebas de sensibilidad, especificidad, y razones de verisimilitud de la relación entre las horas de exposición a plaguicidas y la presencia de metilaciones

Test Horas							
Cutoff >	Sensitivity	95% CI		Specificity	95% CI	LR +	LR -
0.5	0.8667	0.6928 to 0.9624		0.4571	0.2883 to 0.6335	1.5964	0.2916
1.5	0.8333	0.6528 to 0.9436		0.7429	0.5674 to 0.8751	3.2412	0.2244
2.5	0.8333	0.6528 to 0.9436		0.7714	0.5986 to 0.8958	3.6452	0.2161
3.5	0.8	0.6143 to 0.9229		0.7714	0.5986 to 0.8958	3.4996	0.2593
5	0.8	0.6143 to 0.9229		0.8571	0.6974 to 0.9519	5.5983	0.2333
6.5	0.8	0.6143 to 0.9229		0.8857	0.7326 to 0.9680	6.9991	0.2258
7.5	0.8	0.6143 to 0.9229		0.9143	0.7694 to 0.9820	9.3349	0.2187
11	0.7	0.5060 to 0.8527		0.9714	0.8508 to 0.9993	24.4755	0.3088
14.5	0.6	0.4060 to 0.7734		0.9714	0.8508 to 0.9993	20.979	0.4118
16.5	0.5667	0.3743 to 0.7454		0.9714	0.8508 to 0.9993	19.8147	0.4461
19	0.5333	0.3433 to 0.7166		0.9714	0.8508 to 0.9993	18.6469	0.4804
22	0.5	0.3130 to 0.6870		0.9714	0.8508 to 0.9993	17.4825	0.5147
27	0.4333	0.2546 to 0.6257		0.9714	0.8508 to 0.9993	15.1503	0.5834
33	0.4	0.2266 to 0.5940		0.9714	0.8508 to 0.9993	13.986	0.6177
42	0.2	0.07714 to 0.3857		0.9714	0.8508 to 0.9993	6.993	0.8236
52	0.1333	0.03755 to		0.9714	0.8508 to	4.6608	0.8922

		0.3072		0.9993	
56.5	0.1	0.02112 to 0.2653	1	0.9000 to 1.000	0.9
63.5	0.06667	0.008178 to 0.2207	1	0.9000 to 1.000	0.9333
91	0.03333	0.000844 to 0.1722	1	0.9000 to 1.000	0.9667

ROC Met TP53

ROC Curve

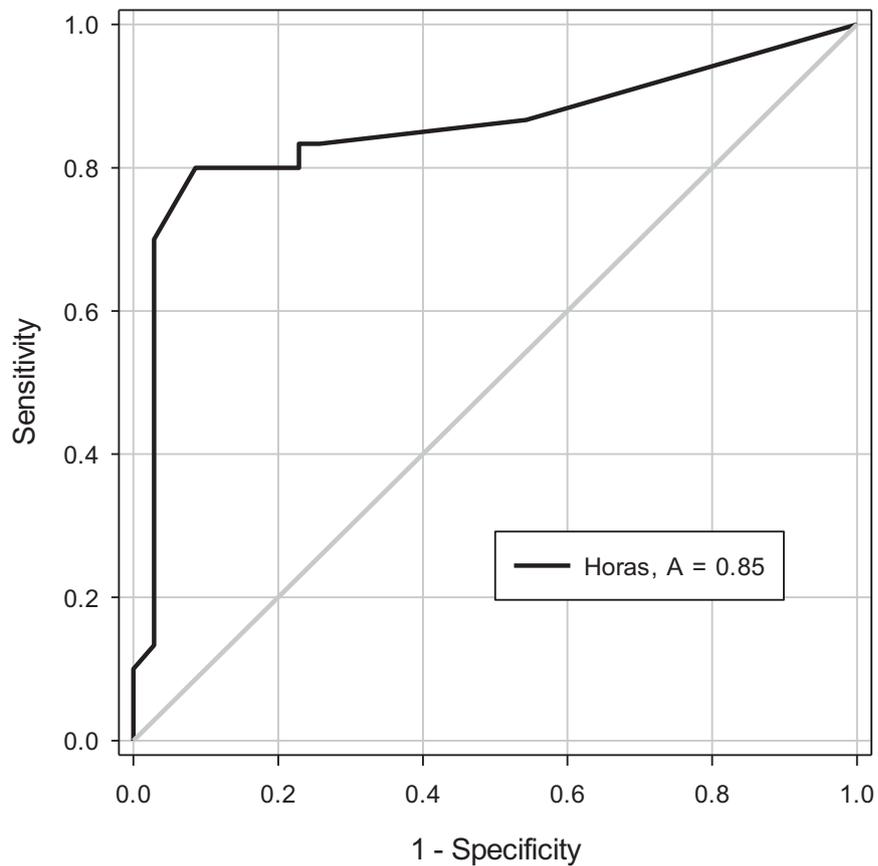


Fig 9: Representación de la curva ROC, el valor del punto de corte corresponde a 0.85 lo que indica que la prueba tiene un valor pronóstico bueno para ser considerada biomarcador

ROC Curve

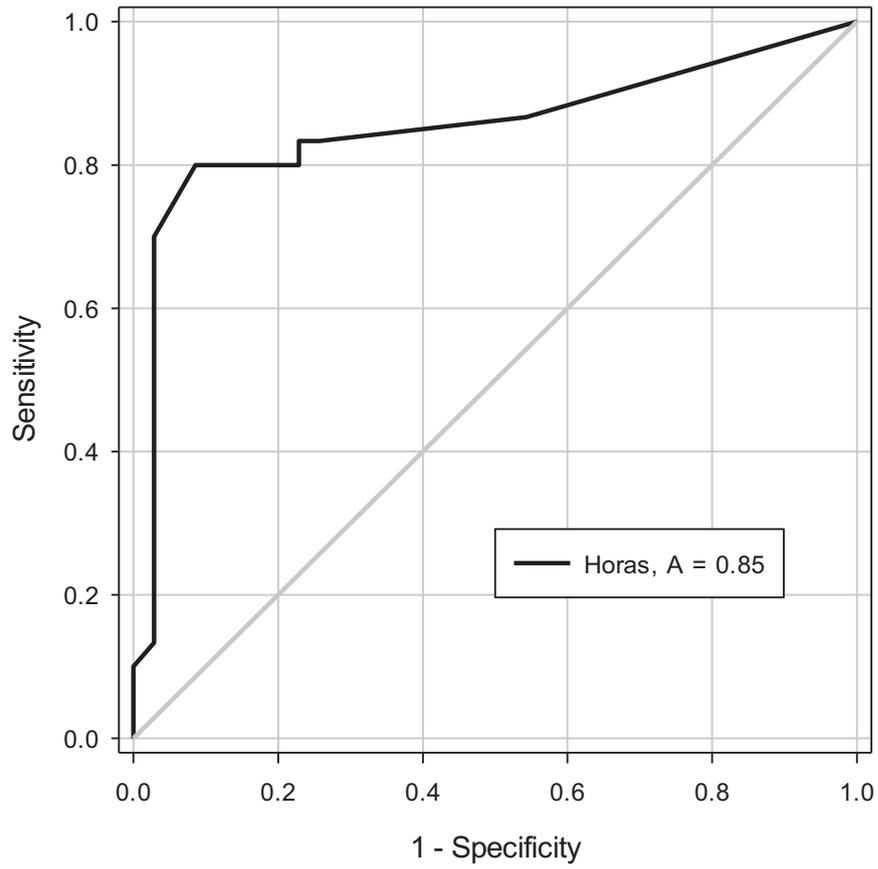


Fig. 11: Curva ROC correspondiente a la asociación entre las horas de exposición semanal a plaguicidas con la presencia de metilaciones en el gen P16

Data

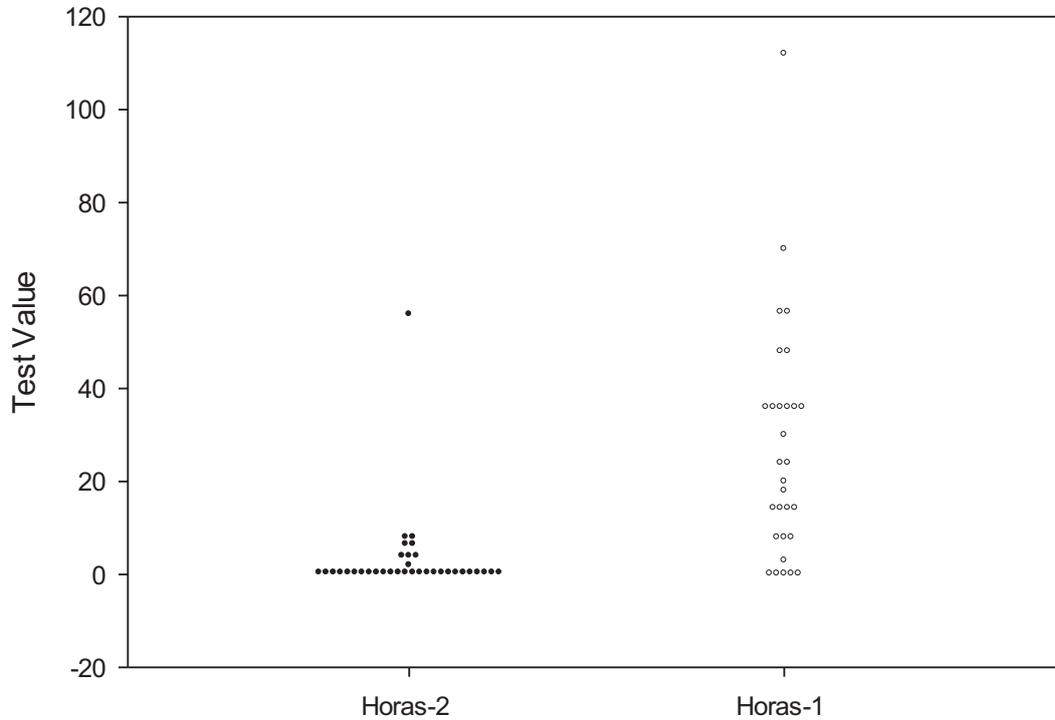


Fig 12: representación de la dispersión en la relación entre las horas de exposición a plaguicidas y la presencia de metilaciones en el gen P16

Estimación de riesgo relativo De acuerdo a las tablas 11-14 correspondientes al análisis de riesgos relativos, las personas que mezclaron dos o más plaguicidas al momento de aplicar tienen 5.1 veces más riesgo de presentar metilaciones en el gen supresor TP53 y 4.6 veces más riesgo de presentar dichas anomalías en el gen P16, la cantidad de horas de exposición semanal representa aparentemente el mismo riesgo ante una exposición baja que ante una exposición elevada debido a que los trabajadores que están expuestos más de 30 horas por semana solo presentan 0.029 veces más riesgo de padecer metilaciones en TP53 y 0.045 veces para el gen P16 en relación con aquellas cuya exposición semanal es menor a 30 h.

Tablas 11-14: estimación de riesgo relativo de presentar metilaciones en ambos genes

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Razón de ventajas para mezcla.dos.mas.plaguicidas (si / no)	5.100	1.656	15.702
Para cohorte metilacion.TP53 = metilado	2.070	1.290	3.321
Para cohorte metilacion.TP53 = metilacion parcial	.406	.197	.837
N de casos válidos	65		

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Razón de ventajas para mezcla.dos.mas.plaguicidas (si / no)	4.604	1.502	14.109
Para cohorte metilación.P16 = metilado	1.940	1.230	3.060
Para cohorte metilacion.P16 = metilación parcial	.421	.204	.872
N de casos válidos	65		

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Razón de ventajas para h/.sem (menos de 30 h/ sem / más de 30 h/ sem)	.045	.011	.185
Para cohorte metilacion.TP53 = metilado	.284	.163	.495
Para cohorte metilación.TP53 = metilación parcial	6.250	2.130	18.340

No de casos válidos	65	
---------------------	----	--

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Razón de ventajas para h/.sem (menos de 30 h semana / más de 30 h semana)	.029	.006	.145
Para cohorte metilacion.P16 = metilado	.272	.157	.471
Para cohorte metilación.P16 = metilación parcial	9.375	2.452	35.850
N de casos válidos	65		

Discusión

Las intoxicaciones con plaguicidas es un problema de salud pública global, estas exposiciones son inevitables debido a la amplia diversidad de formas en que los seres humanos pueden exponerse a estos compuestos (Sabarwal *et al.*, 2018).

Los efectos de estos compuestos en las poblaciones expuestas dependen del tipo de molécula, la dosis a la que están sometidas, la forma de ingreso al organismo y el tiempo de exposición así como la susceptibilidad de los individuos. Estos efectos pueden ser agudos (vómitos, abortos, cefaleas, somnolencia, alteraciones en el comportamiento, convulsiones, coma e inclusive la muerte) y también crónicos como el cáncer (Zhang *et al.*, 2012).

Comúnmente, los plaguicidas han demostrado la capacidad de inducir cambios en la metilación del DNA dentro de 712 genes en líneas celulares cancerígenas utilizadas en estudios *In vitro*, sin embargo, la falta de investigación a nivel epigenoma en seres humanos expuestos hacen que el conocimiento acerca de los efectos de los plaguicidas en las alteraciones de los patrones de metilación del DNA sea muy limitado actualmente (Zhang *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2018). En nuestro estudio se

logró evidenciar un elevado porcentaje de daño genotóxico expresado por medio de patrones aberrantes de metilación en genes supresores tumorales, estos resultados refuerzan lo reportado por Zepeda-Arce *et al.*, 2017 y Martínez Valenzuela *et al.*, 2017 ya que la mayoría de los trabajadores participantes en nuestro estudio que presentaron metilaciones dentro de los genes TP53 y P16 expresaron tener un periodo laboral menor de dos años, así mismo, los participantes en nuestro estudio expresaron padecer varios de los síntomas de intoxicación aguda reportados por Zhang *et al.*, 2012 como vómitos, somnolencia o cefaleas. Nuestros resultados evidenciaron que un 67% de los trabajadores expuestos a plaguicidas presentaron metilaciones en ambos genes evaluados, esto tiene similitud con lo reportado por Silva-Kahl *et al* 2018 puesto que el gen supresor tumoral P16 es uno de los comúnmente utilizados para analizar los patrones de metilación, de igual manera, en ambos estudios los trabajadores participantes expresaron realizar mezclas de plaguicidas, factor que demostró tener una fuerte influencia en la aparición de metilaciones, entre los plaguicidas más utilizados por los trabajadores participantes en nuestro estudio destacan las formulaciones a base de glifosato, plaguicida que, de acuerdo a lo reportado por Kwiatkowska *et al.*, 2017 causaba metilaciones dentro del gen P16, resultado que se pudo reforzar en nuestro estudio. Otros plaguicidas comúnmente utilizados en la región norte del Estado de Sinaloa son los fungicidas o la permetrina, compuesto que pertenece al grupo de los organoclorados, estos plaguicidas han sido asociados con la aparición de metilaciones por Lind *et al.*, 2018; Gosh *et al.*, 2017; y Yin *et al* 2017, dichos resultados fueron reforzados con los obtenidos en nuestro estudio. De acuerdo a la literatura, los metabolitos del plaguicida cipermetrina son capaces de unirse a la estructura del DNA, causando lesiones como aductos o rupturas de cadenas simples o dobles, este efecto también se pudo comprobar con los resultados de nuestro estudio, debido a que los trabajadores expuestos mencionaron utilizar dicho plaguicida en su trabajo y se pudo identificar una fuerte asociación ($P=0.004$ IC=0.01) entre los plaguicidas frecuentemente utilizados y la aparición de metilaciones en los genes supresores analizados. Entre los factores que influyen en la aparición de metilaciones destacan el consumo de alcohol, cigarro o drogas, los cuales, de acuerdo a lo reportado por

Moore *et al.*, 2013 y Mahna *et al.*, 2018 podrían ser utilizados como biomarcadores, sin embargo, aunque en nuestro estudio el consumo de alcohol y cigarro mostró una influencia significativa en la aparición de metilaciones ($P=0.038$, $P=0.010$ IC=0.05) no se pueden catalogar como variables que influyan en el valor pronóstico, debido a que los trabajadores encuestados expresaron no ser fumadores y presentaron una baja frecuencia en el consumo de alcohol. Así mismo, nuestro estudio demuestra que la técnica MS-PCR tiene un valor predictivo adecuado para ser considerada un biomarcador (ROC= 0.85), resultado que refuerza lo reportado por autores como Azuara *et al.*, 2018; Lo nigro *et al.*, 2018 y Pisanic *et al.*, 2018, quienes demostraron que el monitoreo de metilaciones aberrantes en genes supresores tumorales presentaba un valor predictivo excelente para ser considerado como biomarcador (ROC= 1.0). A su vez, nuestros resultados presentan similitud con lo reportado por Ruan *et al.*, 2018 debido a que en ambos estudios se demostró que el análisis de metilación dentro del gen P16 presentaba un valor pronóstico adecuado para su utilidad como biomarcador.

Conclusión

En el estado de Sinaloa se manejan grandes cantidades de plaguicidas anualmente, con la finalidad de obtener mejores resultados a la hora de producir, sin embargo, en muchas ocasiones los trabajadores realizan mezclas complejas de dos o más sustancias, acción que potencializa los efectos adversos de estos compuestos y desencadenan diversos daños como los evidenciados en el presente estudio dentro de los genes supresores tumorales TP53 y P16. Dichas alteraciones en muchas ocasiones representan un punto de partida para graves problemas de salud como el desarrollo de diversos tipos de cáncer, por lo que el presente estudio propone a la técnica MS-PCR como una prueba de biomonitorio confiable para buscar prevenir a tiempo este tipo de lesiones.

Perspectivas:

Con la finalidad de lograr un mejor entendimiento del daño epigenético causado por plaguicidas en trabajadores expuestos y con base en los resultados obtenidos en nuestro estudio se propone la realización de futuros estudios de secuenciación de los individuos metilados en ambos genes supresores tumorales, esto con la intención de conocer más a detalle los nucleótidos afectados por estas alteraciones, de igual forma se propone un estudio para identificar los polimorfismos más susceptibles a presentar estas metilaciones, y finalmente se propone realizar un estudio comparativo entre el daño epigenético detectado mediante la técnica MS-PCR y el daño genotóxico detectado por medio del ensayo de micronúcleos, con el propósito de identificar la prueba con los mejores valores pronósticos.

7.- Literatura Consultada

Aguilar-Martínez J., (2007). Determinación de plaguicidas organoclorados en *Cyprinus carpio*, Linneus 1758 en el lago de Tecocomulo, Hidalgo, tesis, Universidad del estado de Hidalgo, 100

Al- Daghri N., Abd-Alraham S., Wani K., Panigrahy A., McTernan P., Al-Attas O., and Alokaid M. (2018). Biomonitoring and risk assessment of organochlorine pesticides among Saudi adults, Arabian Journal of Chemistry, DOI: 10.1016/j.arabjc.2018.06.007, . 1-17

Alhmdow A., Lindh C., Hagberg J., Graff P., Westberg H., Kraus A., Albin M., Gustavsson P., Tinnerberg H., and Broberg K. (2018). DNA-methylation of the cancer-related genes F2RL3 and AHRR is associated with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, Carcinogenesis, 2, . 1-34

Arellano-Aguilar O and Ponce de León Hill C. (2016). Resultados de plaguicidas en Sinaloa , la huella de los plaguicidas en México, Greenpeace, . 12

Arroyo-Jousse V., García-Díaz D. and Pérez-Bravo F. (2015). Global DNA methylation and homocysteine levels are lower in type 1 diabetes patients, Revista Médica Chile, 143, . 562-568

Azazh A. (2011). Severe organophosphate poisoning with delayed cholinergic crisis, intermediate syndrome and organophosphate induced delayed polyneuropathy on succession. *Ethiop J Health Sci.* 21:203–208.

Azuara D., Aussó S., Rodríguez-Moranta F., Guardiola J., San Juan X., Lobaton T., Boadas J., Piqueras M., Monfort D., Guinó E., Moreno V., Capellá G., and De oca J. (2018). New Methylation Biomarker Panel for Early Diagnosis of Dysplasia or Cancer in High-Risk Inflammatory Bowel Disease Patient, *Inflamm Bowel Dis.*, 00, . 1-10

Baccarelli, A., Bollati, V., (2009) Epigenetics and environmental chemicals. *Curr.Opin. Pediatr.* 21 . 243–251.

Bartoschek, S., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., Geierstanger, B. H. and Griesinger, C., (2001) "N-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO₂ in methanogenic archaea: Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction", *Eur. J. Biochem.*, 267, . 3130-3138

Benlloch-Carrión S. (2008) Metilación y cáncer, Implicaciones clínicas de la investigación básica, 7 . 20-22

Benitez-Trinidad A., Medina-Díaz I., Bernal-Hernández Y., Barrón-Vivanco B., González-Arias C., Herrera-Moreno J., Alvarado-Cruz I., Quintanilla-Vega B., and Rojas-García A. (2018) Relationship between LINE-1 methylation pattern and pesticide exposure in urban sprayers, *Food Chem Toxicol*, 113,. 125-133

Ben-Maamar M. Nilsson E. Sadler-Riggelman I. Beck D. Mc Carrey J. and Skinner M. (2019). Developmental origins of transgenerational sperm DNA methylation epimutations following ancestral DDT exposure, *Developmental Biology*, 445, . 280-293

Bernieri T. Rodríguez D. Barbosa I Ardenghi P. and Basso-Da Silva L. (2018). Occupational exposure to pesticides and thyroid function in Brazilian soybean, *Chemosphere*, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.124, . 1-20

Biegng K. Spano-Mello S. and Attardi L. 2014, Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression, *Nature review cancer*, 14, . 359-370.

- Blacquiere T., Smagghe G., Van Gestel C., and Mommaerts V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment, *Ecotoxicology*, 21, . 973-992
- Blanco L. and Marquina M. (2013) Responses to applications of carbamates in two isolates of rhizobial from Mucuchies, Merida State, Venezuela, Bioagro, online, www.carbdirect.org
- Blanco-Muñoz J, Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, González-Alzaga B, Bassol S, Cebrian ME, López-Carrillo L, and Aguilar-Garduño C. (2016) Association between organochlorine pesticide exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Environ Res.*, 150, . 357-63
- Brandan N., Aguirre M., Todaro J., Stoyanoff T., Heitrich M., and García D. (2014). Protooncogenes y genes supresores de tumores, Universidad Nacional del Noroeste, 2 y 11
- British Crop Production Council (BCPC). (2018). The Pesticide Manual, 17th edition, online, <https://www.bcpc.org/product/the-pesticide-manual-17th-edition>, consultado el 06-08-2018
- Brown M. and Brix R. (1998). Review of health consequences from high intermediate and low level exposure to organophosphorus nerve agents. *J. Appl. Toxicol.* 18, 393–408.
- Burns, C. and Pastor, P. (2018). Pyrethroid epidemiology: A quality-based review. *Crit. Rev. Toxicol.*, 48, 297–311
- Caetani S., and Martins I. (2018). Risk assessment of occupational pesticide exposure: Use of endpoints and surrogates, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 276-283
- Calvert G., Beckman J., Bonnar-Prado J., Bojes H., Schwartz A., Mulay P., Leinenkugel K., Higgins S., Lackovick M., Waltz J., Stover D., and Moraga-McHaley S. (2016). Acute Occupational Pesticide-Related Illness and Injury —United States, 2007–2011, *MMWR*, 53, 11-16
- Casalone E., Allione A., Viberti C., Pardini B., Guarrera S., Betti M., Dianzani I., Aldieri E., and Matullo G. (2018). DNA methylation profiling of asbestos-treated MeT5A cell line reveals novel pathways implicated in asbestos response, *Arch Toxicol*, 92. . 1785-1795

Castañeda-Yslas IJ, Arellano-García ME, García-Zarate MA, Ruíz-Ruíz B, Zavala-Cerna MG, and Torres-Bugarín O. (2016). Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *J Toxicol*, 2016, 1-8

Castillo-Aguilera O., Depreux P., Halby L., Arimondo P. and Goossens L. (2017). DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge, *biomolecules*, 7, págs. 1-21

Center for Food Safety. Heavy Costs: Weighing the Value of Neonicotinoid Insecticides in Agriculture. 2014 http://www.centerforfoodsafety.org/files/neonic-efficacy_digital_29226.pdf [accessed 2 January 2015]

Chakravarthy A., Fuerness A., Joshi K., Ghorani E., Ford K., Ward M., King E., Lechner M., Marafioti T., Quezada S., Thomas G., Feber A., and Fenton T. (2018). Pan-cancer deconvolution of tumour composition using DNA methylation, *Nature Communications*, 9, 1-13

Chen M, Tao L, McLean J, Lu C. 2014. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *J Agric Food Chem* 62 6082 6090, doi:10.1021/jf501397m

Collotta M., Bertazzi P. A., and Bolatti V. (2013). Epigenetics and pesticides, *Toxicology*, 307, . 35–41

Comino-Delgado R., Aguado-Hernández J.J., Sánchez-Del río A. and Ordi-Majá J. (2013). Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino, *Asociación Española de Patología Cervical y Colopscopía*, (online) https://www.seap.es/documents/10157/287128/p16_cribado.pdf consulta: 10-12-17

Conolly A., Basinas I., Jones K., Galea K., Kenny L., Mc Gowan P. and Coggins M. (2018). Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221, págs. 1012-1022

Consejo Para el Desarrollo Económico de Sinaloa CODESIN, (2014) Vamos más allá de la agricultura, online, <http://codesin.mx/news/sinaloa-mas-alla-de-la-agricultura/>, consultado el 21-06-18

Consejo Para el Desarrollo Económico de Sinaloa (CODESIN) (2018) Agricultura en Sinaloa 2017, Sinaloa en números, online, <http://sinaloaennumeros.com/agricultura-en-sinaloa-2017/> consultado el 21-06-18

- Corcellas C., Eljarrat E., and Barceló D. (2014). Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples, *Anal Bioanal Chem*, 407, . 779-786
- Cresswell J. 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees, *Ecotoxicology*, 20, . 149-157
- Damalas C., Georgiou E. and Theodorou M. (2006). Pesticide use and safety practices among Greek tobacco farmers: a survey, *Int J Environ Health Res*, 16, . 339-348
- Davidovic R., Bozovic A., Mandusic V. and Krajnovic M. 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design, *Central European Journal of Biology*, 9, . 1127-1139
- Del Puerto-Rodríguez A., Suarez-Tamayo S., and Palacio-Estrada D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud, *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52, 372-387.
- Dhananjayan V. and Ravichandran B. (2018) Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities, *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 4, 31-37
- Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon, J., Giudice, L., Hauser R., Prins, G., Soto A., Zoeller, R., and Gore, A. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Rev.* 30, 293–342
- Domingues-Rogeri C., Santejo-Silveira H., Lima-Causin R., Lina-Villa L., Degiovani-Stein M., De Carvalho A., Batista-Arantes L., Scapulatempo-Neto C., Possati-Resende J., Antoniazzi M., Longatto-Filho A. and Guerreiro-Fregnani J. (2018). Methylation of the hsa-miR-124, SOX1, TERT, and LMX1A genes as biomarkers for precursor lesions in cervical cancer, *Gynecologic Oncology*, DOI: doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.06.014,. 1-7
- Dong-Hee R., Hee-Tae Y., Se-A K., Yu-Mi L., Seon-Hui H., Young-Ran Y., Dae-Jung K., Hyeon-Chang K., Hyo-Bang M., Eui-Cheol S., and Duk-Hee L. (2018). Is chronic exposure to low-dose organochlorine pesticides a new risk factor of T cell immunosenescence?, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0799, s. 1-26
- Douglas M., and Tooker J. (2015). Large-scale deployment of seed treatments has driven rapid increase in use of neonicotinoid insecticides and preemptive pest management in U.S. field crops. *Environ Sci Technol* 49 8 5088 5097, doi:10.1021/es506141g

- Duruisseaux M., Martínez-Cardús A., Calleja-Cervantes M., Moran S., Castro-deMoura M., Dávalos V., *et al.* (2018). Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis, *Lancet Respir Med*, DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30284-4, . 1-11
- Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B. and Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticide list. *The Lancet* 360, 1163–1167.
- El-Okda ES, Abdel-Hamid MA, and Hamdy AM. (2017). Immunological and genotoxic effects of occupational exposure to α -cypermethrin pesticide. *Int J Occup Med Environ Health*, 30, . 603-615
- European Union Report on pesticides residues in food (EFSA),2014, The 2012 European Union Report on pesticide residues in food, 12 (12),
- Fernández A. D. Md., Mancipe G. L. Md., and Fernández A. D. Md., (2010), Intoxicación por organofosforados, *Revista med*, 18 . 84-92
- Ferrer A. and Cabral R. (1993). Collective poisoning caused by pesticides: mechanism of production, mechanism of prevention. *Rev. Environ. Toxicol.*5, págs.161–201.
- Forner D. 2018. Neonicotinoides y la desaparición de la abejas, online, <https://didacforner.net/neonicotinoides-y-la-desaparicion-de-la-abejas/>, consultado el 02-12-2018
- Fu Y., Wang W., Li X., Liu Y., Niu Y., Zhang B., Nie J., Pan B., Wang R., and Yang J. (2018). LncRNA H19 interacts with S-adenosylhomocysteine hydrolase to regulate LINE-1 Methylation in human lung-derived cells exposed to Benzo[a]pyrene, *Chemosphere*, 207, , 84-90
- García J. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Rev. Panam. Salud Pub.* 4,6–10.
- García-Hernández J., Leyva-Morales J., Martínez-Rodríguez I., Hernández Ochoa M., Aldana-Madrid M., Rojas-García A., Betancourt-Lozano M., Pérez-Herrera N. y Perera-Ríos J.

(2018).ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE PLAGUICIDAS EN MÉXICO, Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 34, . 29-60

Gargouri, B., Yousif, N., Attaai, A., Bouchard, M., Chtourou, Y., Fiebich, B., and Fetoui, H. (2018). Pyrethroid bifenthrin induces oxidative stress, neuroinflammation, and neuronal damage, associated with cognitive and memory impairment in murine hippocampus, Neurochemistry International, doi: 10.1016/j.neuint.2018.08.004, . 1-50

Giorgiadis N., Tsarouhas K., Tsitsimpikou C., Vardavas A., Rezaee R., Germanakis I., Tsatsakis A., Stagos D., and Kouretas D. (2018). Pesticides and cardiotoxicity. Where do we stand, Toxicology and Applied Pharmacology, 353, . 1-14

Ghosh K., Chatterjee B., Jayaprasad A., and Kanade S. (2017). The persistent organochlorine pesticide endosulfan modulates multiple epigenetic regulators with oncogenic potential in MCF-7 cells, Science of the Total Environment, 624, . 1612-1622

Gong Z. and Zhu J. (2011). Active DNA demethylation by oxidation and repair, cell research, 21, . 1649-1651

Gouveia-Prudente I., Lima-Cruz C., Carvalho-Nascimento L., Kaiser C., and Guibara-Guimaraes A. (2018). EVIDENCE OF RISKS OF RENAL FUNCTION REDUCTION DUE TO OCCUPATIONAL EXPOSURE TO AGROCHEMICALS: A SYSTEMATIC REVIEW, Environmental Toxicology and Pharmacology, DOI: 10.1016/j.etap.2018.08.006, 1-22

Gupta R. (2014). Carbamate Pesticides, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) Editorial Elsevier, Murray State University, Kentucky USA, 661-664

Gustincich S., Manfioletti G., Del Sal G., Schneider C. and Carninci P. (1991). A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood, Biotechniques, 11, 298-300

Han W., Tian Y. and Shen X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. Chemosphere, 192, 59–65.

Hashemi S., Hosseini S. and Hashemi M. (2012). Farmer's perceptions of safe use of pesticides: Determinants and training needs," International Archives of Occupational and Environmental Health, vol. 85, . 57–66

Hayat K., Afzal M., Aqueel M., Ali S., Saeed M., Qureshi A. and Damalas C. (2019). Insecticide toxic effects and blood biochemical alterations in occupationally exposed individuals in Punjab, Pakistan, Science of Total Environment, 655, . 102-111

- Hernández-Cortés D., Alvarado-Cruz I., Solís-Heredia M.J., and Quintanilla-Vega B. (2018). Epigenetic modulation of Nrf2 and Ogg1 gene expression in testicular germ cells by methyl parathion exposure, *Toxicology and Applied pharmacology*, DOI: 10.1016/j.taap.2018.03.010, : 1-41
- Hicks SD, Wang M, Fry K, Doraiswamy V, and Wohlford EM (2017). Neurodevelopmental Delay Diagnosis Rates Are Increased in a Region with Aerial Pesticide Application. *Front Pediatr*, 116,
- Hwang J., Lee H., Go M., Jang H., Choi N., Bae J., Castillo-Fernández J., Bell J., Spector T., Lee H. and Kim B. (2018). Genome-wide methylation analysis identifies ELOVL5 as an epigenetic biomarker for the risk of type 2 diabetes mellitus, *Sci Rep*, 8
- Huen K., Solomón O., Kogut K., Eskenazi B., and Holland N. (2018) PON1 DNA methylation and neurobehavior in Mexican-American children with prenatal organophosphate exposure, *Environment International*, 121
- Hutter H., Kundi M., Lemmerer K., Poteser M., Weinstensfelder L., Wallner P., and Moshhammer H. (2018) Subjective Symptoms of Male Workers Linked to Occupational Pesticide Exposure on Coffee Plantations in the Jarabacoa Region, Dominican Republic, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15: 1-10
- Hwang J., Lee H., Go M., Jang H., Choi N., Bae J., Castillo-Fernández J., et al., (2018) Genome-wide methylation analysis identifies ELOVL5 as an epigenetic biomarker for the risk of type 2 diabetes mellitus, *Nature Scientific Reports*, 8: 1-8
- Ikanaka Y., Miyabara Y., Nakayama S., Nimako C., Ishizuka M. and Tohyama C. (2018). EXPOSURES OF CHILDREN TO NEONICOTINOIDS IN PINE WILT DISEASE CONTROL AREAS, *Environ Toxicol Chem*, DOI: 10.1002/etc.4316.: 1-34
- International Labour Organization (2010), "Code of practice on safety and health in agriculture," in Meeting of Experts to Adopt a Code on Safety and Health in Agriculture, Geneva, Switzerland, online http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/—dgreports/—dcomm/—publ/documents/publication/wcms_159457.pdf. Consultado el 20-08-2018
- Jaenish R., and Bird A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature genetics*, 33., 245-254

Jamebozorgi I., Majidizadeh T., Pouryagoub G. and Mahjoubi F. (2018) Aberrant DNA Methylation of Two Tumor Suppressor Genes, p14ARF and p15INK4b, after Chronic Occupational Exposure to Low Level of Benzene, *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 9, . 145-151

Jarzynski A., Papiernik K., and Polz-Dacewicz M. (2016). Analysis of mutation and promoter methylation of TP53 gene in tumors of the head and neck, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 29, . 53-56

Jensen H., Konradsen F., Jørs E., Petersen J., and Dalsgaard A. (2011) Pesticide use and self-reported symptoms of acute pesticide poisoning among aquatic farmers in Phnom Penh, Cambodia. *J Toxicol.* 639814:1–8

Jimenez-Garza O., Guo L., Byun H., Zhong J. and Baccarelli A. (2017). Promoter methylation status in genes related with inflammation, nitrosative stress and xenobiotic metabolism in low-level benzene exposure: Searching for biomarkers of oncogenesis, *Food Chem Toxicol.*, 109, . 669-676

Jin C., Qin T., Craig-Barton M., Jelinek J., and J-Issa J. (2015). Minimal role of base excision repair in TET-induced global DNA demethylation in HEK293T cells, *epigenetics*, 10, 1006-1013

Jin Z. y Liu Y. (2018). DNA methylation in human diseases, *Genes and Diseases*, 5, . 1-8

Kahl V., Dhillon V., Simon D., da Silva F., Salvador M., Branco C., Cappetta M., Martínez-López W., Thiesen F., Dias J., Souza C., Fenech M., and Da Silva J. (2018). Chronic occupational exposure endured by tobacco farmers from Brazil and association with DNA damage, *Mutagenesis*, 13, . 119-128

Kettunen E., Hernandez-Vargas H., Cros M., Durand G., Le Calvez-Kelm F., Stuopelyte K., Jarmalaite S., Salmenkivi K., Anttila S., Wolff H., Herceg Z., and Husgafvel-Pursiainen K. (2017). Asbestos-associated genome-wide DNA methylation changes in lung cancer, *Int J Cancer*, 141, . 2014-2029

Kim K. Y., Kim D. S., Lee S. K., Lee I.K., Kang J.H., Chang Y.S., Jacobs Jr. D.R., Steffes M., and Lee D.H. (2010). Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans. *Environmental Health Perspectives*, 118, . 370–374

Korbes D., Silveira A., Hyppolito M. and Munaro G. (2010) Organophosphate-related ototoxicity: Description of the vestibulocochlear system ultrastructural aspects of guinea pigs, *Braz J Otorhinolaryngol*, 76, . 238-244

Krause B., Castro-Rodriguez J., Uauy R y Casanello P. (2016). Conceptos generales de epigenética: proyecciones en pediatría, *Revista Chilena de Pediatría*, 87, 4-10

Kwiatkowska M., Reszka E., Wozniak K., Jablonska E., Michalowick J., and Bukowska B. (2017). DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study), *Food Chem Toxicol*, 105, . 93-98

Lagunas-Cruz M.C., Valle-Mendiola A. and Soto-Cruz I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación, *Revista especializada en ciencias de la salud*, 17, . 98-107

Laird P. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Genet*. 3, 253-266.

Lee F., Chen W., Lin C., Lai C., Wu Y., Lin I., and Kao C. (2015). Organophosphate poisoning and subsequent acute kidney injury risk: a nationwide population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 94, e2107.

Lee M., Xu C., Carnes M., Nichols C., Ward J, The BIOS Consortium, Kwon S., Kim S., Kim W. and London S. (2019). Genome-wide DNA methylation and long-term ambient air pollution exposure in Korean adults, *Clinical Epigenetics*, 11, 1-12

Lerro C., Jones R., Langseth H., Grimsrud T., Engel L., Sjodin A., Choo-Wosoba H., Albert P., and Ward M. (2018). A nested case-control study of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and thyroid cancer in the Janus Serum Bank cohort, *Environmental Research*, 165, . 125-132

Leyva-Morales J., García de la Parra L., Bastidas-Bastidas P., Astorga-Rodríguez J., Bejarano-Trujillo J., Cruz-Hernández A., Martínez-Rodríguez I., y Betancourt-Lozano M. (2014). Uso de

plaguicidas en un valle agrícola tecnificado en el noroeste de México, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30, . 247-261

Liloglou T., Bediaga N., Brown B., Field J., and Davies M.(2012). Epigenetic biomarkers in lung cancer, *cancer letters*, 342,. 200-212

Linbago A.I., Stephenson K., Ling W., Zhuo C., Mukunyadzi P., James y Suen., Hanna E., and Fan C. (2003). The p16 (CDKN2a/INK4a) Tumor-Suppressor Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Promoter Methylation and Protein Expression Study in 100 Cases, *Modern Pathology, Nature*, 16,. 944-950

Lind M., Salidhovic S., and Lind L. (2018).High plasma organochlorine pesticide levels are related to increasedbiological age as calculated by DNA methylation analysis, *Enviroment International*, 113, 109-113

Ling C., Liew Z., von Ehrenstein O., Heck H., Park A., Cui X., Cockburn M., Wu J., and Ritz B. (2018). Prenatal Exposure to Ambient Pesticides and Preterm Birth and Term Low Birthweight in Agricultural Regions of California, *Toxics*, 21, . 1-18

Lo nigro C., Vivenza D., Denaro N., Lattanzio L., Fortunato M., Crook T and Carlo-Merlano M. (2018). DUSP2 methylation is a candidate biomarker of outcome in head and neck cancer, *Ann Transl Med*, 6, . 1-10

López-Marure R. (2003). LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y EL CÁNCER, *Revista especializada en ciencias de la salud*, 6, . 40-44

Lu Y., Qu H., Qi D., Xu W., Liu S., Jin X and Quan C. (2019). OCT4 maintains self-renewal and reverses senescence in human hair follicle mesenchymal stem cells through the downregulation of p21 by DNA methyltransferases, *Stem Cell Research & Therapy*, 10, . 10-28

Mahna D., Puri S., and Sharma S. (2018). DNA methylation signatures: Biomarkers of drug and alcohol abuse, *Mutation Research Reviews in mutation research*, DOI: 10.1016/j.mrrev.2018.06.002, . 1-44

- Malek S., Nodeh H., and Arkbari-Adergani B. (2018). Silica-based magnetic hybrid nano-composite for the extraction and preconcentration of some organophosphorus pesticides before gas chromatography, *Journal of separation science*, DOI 10.1002/jssc.201800090 . 1-27
- Marioni R., Shah S., McRae, A., Chen, B., Colicino, E., Harris, S., Gibson, J., Henders, A., Redmond, P., *et al* (2015). DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life., *Genome Biol*, 16, . 1-12
- Marioni R., Harris S., Shah S., McRae A., Von Zglinicki T., Martín-Ruíz C., Wray N., Visscher P., and Deary I. (2016). The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality, *Int. J. Epidemiol*, 47, . 424-432
- Martínez-Valenzuela C., Rodríguez-Quintana A., Meza E., Waliszewski S., Amador-Muñoz O., Mora-Romero A., Calderón-Segura M., Félix-Gastélum R., Rodríguez-Romero I., y Caba M., (2015). Cytogenetic biomonitoring of occupationally exposed workers to ashes from burning of sugar cane in Ahome, Sinaloa, México. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 397–401
- Martínez Gutiérrez R., y Martínez González M., (2008). Alteraciones neurológicas, cognitivas y del afecto secundarias a la exposición ocupacional prolongada a plaguicidas organofosforados en trabajadores del sector agrícola, tesis, pontificia Universidad Javeriana, . 20
- Melo A., Artigas C., Muñoz S., Brebi P., Hoffstetter R. and Roa J. (2013). Detection of Hypermethylation in Tumor Suppressor Genes APAF1, ASSP1, p73 and FHIT in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *International Journal of Morphology*, 31, . 973-979
- Meza-Cornejo V., Barros-Nuñez P., Medina-Solano C. (2006). Metilacion del ADN: un marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer, *gaceta médica de México*, 142, 81-82
- Mikeska T and Craig J. (2014). DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond, *genes*, 5, 821-864

Milavezt B. and Balakhrisnan L. (2015). Viral Epigenetics, *Methods Mol. Biol.*, 1238, 569-596

Moore L., Le T., and Fan G. (2013). DNA methylation and its basic function., *Neuropsychopharmacology*, 38, . 23-38

Morikawa A. y Henry N. (2015). Palbociclib for the Treatment of Estrogen Receptor–Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer, *Clin Cancer Res*, 21, págs. 3591-3596

Mostafalou S. and Abdollahi M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity, *Archives of Toxicology*, 91, . 549-599

Muzinic V., Ramic S., Zeljezic D. (2018). Chromosome Missegregation and Aneuploidy Induction in Human Peripheral Blood Lymphocytes *In vitro* by Low Concentrations of Chlorpyrifos, Imidacloprid and α -Cypermethrin, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, DOI: 10.1002/em, 1-13

Nagami H, Suenaga T, and Nakazaki M. (2017). Pesticide exposure and subjective symptoms of cut-flower farmers, *J Rural Med.*, 12, . 7-11

Nakamura E., and Miyao K. (2003). Further evaluation of the basic nature of the human biological aging process based on a factor analysis of age related physiological variables, *J gerontol A. bio. Sci. med. Sci.*, 58, 196-204

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016). Residuos de plaguicidas en los alimentos, preguntas frecuentes, online, <http://www.who.int/features/qa/87/es/>, consultado el 20-06-18

Organización Mundial de la Salud OMS (2017). Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Organización Panamericana de la Salud (2009). Herramientas de capacitación para el manejo responsable de los plaguicidas, efectos sobre la salud y prevención de la exposición, segunda edición, ISBN 978-950-710-118-2

- Patnaik D., Estéve P., and Pradhan S. (2018). Targeting the SET and RING-associated (SRA) domain of ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1 (UHRF1) for anti-cancer drug development, *oncotarget*, 9, . 26246-26258
- Paul K., Chuang Y., Cockburn M., Bronstein J., Horvath S., and Ritz B. (2018). Organophosphate pesticide exposure and differential genome-wide DNA methylation, *Science of the total environment*, 645, . 1135-1143
- Perna L., Zhang Y., Mons U., Holleczeck B., Saum K., and Brenner H. (2016). Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort, *Clinical Epigenetics*, 8, 1-7
- Pisanic T., Cope L., Lin S., Yen T., Athamanolab P., Asaka R., Nakayama K., Fader A., Wang T., Shih I., and Wang T. (2018). Methyloomic analysis of ovarian cancers identifies tumor-specific alterations readily detectable in early precursor lesions, *AACR journals*, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1199, 1-40
- Pose D., De Ben S., Delfino N. and Burger M. (2000). Intoxicación aguda por organofosforados. Factores de riesgo. *Rev. Med. Uruguay* 16, 5–13.
- Potti A., Panwalkar A. and Langness E. (2003). Prevalence of pesticides exposure in young males with adenocarcinoma of the prostate. *J. Carcinogenesis* 2, . 4– 5
- Quezada-Ramírez M.A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias, UAM, (online) <http://www.izt.uam.mx/>, /contactos/anterior/n65ne/celula.pdf, consulta: 10-12-17
- Rangel-López A., Piña-Sánchez P. And Salcedo M. (2006). Genetic variations of the tumor suppressor TP53: outstanding and strategies of analysis, *Rev Invest Clin*, 58, . 254-264.
- Raza M., Mahjabeen I., Fahim M., Malik W., Khan A., Kayani M., Khan A. and Akram Z. (2018) Redox balance and DNA fragmentation in arsenic-exposed occupational workers from different industries of Pakistan, *Environ Sci Pollut Res Int*, DOI: 10.1007/s11356-018-3274-6, 1-10

Red de Acción en Plaguicidas PAN-Internacional (2018) Acerca de PAN, online, <http://pan-international.org/es/acerca-de-pan-2/>, consultado el 21-06-18

Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para Latino América RAP-AL (2018) Lista actualizada de plaguicidas altamente peligrosos, online, <https://rap-al.org/red-global-pan-lanza-lista-actualizada-de-plaguicidas-altamente-peligrosos/>, consultado el 21-06-18

Reji K., Mathew V., Zachariah A., Patil A., Hansdak S., Ralph R., and Peter J. (2016). Extrapramidal effects of acute organophosphate poisoning. *Clin Toxicol.*, 54, 259–265.

Rendon-von Osten J, and Dzul-Caamal R. (2017). Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*. 14, págs 1-13

Ribi S., Baumhoer D., Lee K., Edison, Teo A., Madan B., Zhang K., Kolmann W., Yao F., Lee W., *et al.* (2015). TP53 intron 1 hotspot rearrangements are specific to sporadic osteosarcoma and can cause Li-Fraumeni síndrome, *Oncotarget*, 6, . 7727-7740

Robertson K. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet.*, 6, págs 597–610.

Rogeri C., Silveira H., Causin R., Villa L., Stein M., De Carvalho A., Arantes L., Scapulatempo-Neto C., *et al* (2018). Methylation of the hsa-miR-124, SOX1, TERT, and LMX1A genes as biomarkers for precursor lesions in cervical cancer, *Gynecol Oncol*, 150, . 545-551

Rota F., Conti A., Campo L., Favero C., Cantone L., Motta V., Polledri E., Mercadante R., Dieci G., Bollati V., and Fustinoni S. (2018). Epigenetic and Transcriptional Modifications in Repetitive Elements in Petrol Station Workers Exposed to Benzene and MTBE, *Int J Environ Res Public Health.*, 15, . 1-14

Ruan J., Xu P., Fan W., Deng Q., and Yu M. (2018) Quantitative assessment of aberrant P16INK4a

Methylation in ovarian cancer: a meta-analysis based on literature and TCGA datasets, *Cancer Management and Research*, 10, 3033-3046

- Ruiz-Hernandez, A., Kuo, C., Rentero-Garrido, P., Tang, W. and Redon, J., (2015). Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Clin. Epigenetics* 7, . 55
- Rusiecki J., Beane Freeman L., Bonner M., Alexander M., Chen L., Andreotti G., Barry K., Moore L., Byun H., Kamel F., Alavanja M., Hoppin J., and Baccarelli A. (2017). High pesticide exposure events and DNA methylation among pesticide applicators in the agricultural health study, *Environ Mol Mutagen*, 58, . 19-29
- Russo D., Merolla F., Varricchio S., Salzano G., Zarrilli G., Mascolo M., Strazzullo V., Di Crescenzo R., Celetti A. and Ilardi G. (2018) Epigenetics of oral and oropharyngeal cancers, *Biomedical Reports*, 9, . 275-283
- Saad-Hussein A., Beshir S., Taha M., Shahy E., Shaheen W., Ebtesam A., and Thabet E. (2019). Early prediction of liver carcinogenicity due to occupational exposure to pesticides, *Mutation research*, 838, . 46-53
- Sabarwal A, Kumar K, Singh RP, (2018), Hazardous Effects of Chemical Pesticides on Human Health- Cancer and Other Associated Disorders, *Environmental Toxicology and Pharmacology* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Salozhin S., Prokhorchuk E. and Georgiev G. (2005). Methylation of DNA--one of the major epigenetic markers, *Biochemistry*, 70, 525-532
- Salvi, R.; Lara, D.; Ghisolfi, E.; Portela, L.; Dias, R.; and Souza O. (2003) Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Sci.* 72, 267–271
- Samblas M., Mansego M., Zulet M., Milagro F. and Martínez J. (2018). An integrated transcriptomic and epigenomic analysis identifies CD44 gene as a potential biomarker for weight loss within an energy-restricted program, *European Journal of Nutrition*, doi.org/10.1007/s00394-018-1750-x, 1-10
- Sammons M., Zhu J., Drake A., and Berger S. (2015). TP53 engagement with the genome occurs in distinct local chromatin environments via pioneer factor activity, *Genome Research*, 25, . 179-188

San Roman M., Herranz J.L., and Arteaga R., (2003), Intoxicación por piretrinas: una causa singular de convulsiones en el lactante, caso clínico, *bol. Pedriac.* 43: 284-289

Santa-Eufemia M., García M., Cepeda A. y Melgar M. (2005) Puesta a punto del método de extracción por diálisis difásica para el análisis de triazinas en leches maternizadas, *Revista de Toxicología*, 23, 7-10

Satyanarayana A, y Rudolph K. (2004). P16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest.*, 114, 1237–40

Sawaki K., Kanda M. and Kodera Y (2018). Review of recent efforts to discover biomarkers for early detection, monitoring, prognosis, and prediction of treatment responses of patients with gastric cancer, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*,

Schmuck R. y Lewis G. 2016. Review of field and monitoring studies investigating the role of nitro-substituted neonicotinoid insecticides in the reported losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*), *Ecotoxicology*, 25, . 1617-1629

Schulz W.(2005) Qualified Promised: DNA methylation assays for the detection and classification of human cancers. *J. Biomed Biotechnol.* 3, . 227–229

Secretaria del medio ambiente y recursos naturales (SEMARNAT)., 2015 Online <http://tramites.semarnat.gob.mx/Doctos/DGGIMAR/Guia/07-015AD/clasificaciones.pdf>
20-10-2015

Secretaria de Salud (2019). Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, online, <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>, consultado el 05-08-18

Semren T., Zunec S., y Pizent A. (2018) Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69, 109-125

- Shen M., He Z., Zhang X, Duan H., Niu Y., Bin P, Ye M., Meng T., Dai Y., Yu S., Chen W, and Zheng Y. (2017). Associations of etheno-DNA adduct and DNA methylation level among workers exposed to diesel engine exhaust, *Chinense Journal of Preventive Medicine*, 51, 556-561
- Silva-Kahl V., Dhillon V., Fenech M., De Souza M., Nitzke- Da Silva F., Possa-Marroni N., Arusiewicz-Nune E., *et al.* (2018). Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability, *Oxid Med Cell Longev*, DOI: 10.1155/2018/7017423, . 1-13
- Suemizu H., Kawai K., Murayama N., Nakamura M., and Yamazaki H. (2018) Chimeric mice with humanized liver as a model for testing organophosphate and carbamate pesticide exposure, *Pest Manag Sci*, 74, . 1424-1430
- Suratman S., Edwards J., and Babina K. (2015). Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects, *Rev Environ Health*, 30, 65–79
- The Encyclopedia of DNA elements ENCODE consortium (2018). About the ENCODE consortium, online www.encodeproject.org/about/contributors/, consultado el 20-08-2018.
- Van der Plaat D., De Jong K., De Vries M., Van Diemen C., Nedeljković I., Amin N., Kromhout H., *et al* (2018). Occupational exposure to pesticides is associated with differential DNA methylation, *Occup Environ Med*, 75, . 427-435
- Van Meter R., Glinsky D., Purucker T., and Henderson W. (2018). Influence of exposure to pesticide mixtures on the metabolomic profile in post-metamorphic green frogs (*Lithobates clamitans*), *Science of the Total Environment*, 624, . 1348-1359
- Weisenberger D. and Brown P (2016). Networks and Consortia for Epigenetic Drug Discovery, *Drugs Discovery in Cancer Epigenetics*, Elsevier Academic Press, 1st edition, . 143-166
- Woźniak, E., Sicińska, P., Michałowicz, J., Woźniak, K., Reszka, E., Huras, Bogumił., Zakrzewski, J., and Bukowska, Boż, (2018) The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment, *Food and Chemical Toxicology*, DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.035, 1-42

- Wurl O., and Obbard J., (2005). Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyls ethers in Singapore's coastal sediments, *Chemosphere*, 58: págs. 925-933
- Yin J., Zhu F., Hao W., Xu Q., Chang J., Wang H., Guo B. (2017). Acylamino acid chiral fungicides on toxic epigenetics in lambda DNA methylation, *Food and Chemical Toxicology*, 109, 735-745.
- Yu L., Tu Y., Huang J., Zhang Y., Zheng G., Xu X., Wang J., Xiao J., Christiani D., and Xia Z. (2018). Hypermethylation of CpG islands is associated with increasing chromosomal damage in Chinese lead-exposed workers, *Environ Mol Mutagen*,
- Yu X., Zhao B., Su Y., Zhang Y., Cheng J., Wu W., Cheng Q., Guo X., Zhao Z., Ke X., Danzeng W., Zhao B. and Ma Q. (2018). Association of prenatal organochlorine pesticide-dichlorodiphenyltrichloroethane exposure with fetal genome-wide DNA methylation., *Life Science*, 200, 81-86
- Zepeda-Arce R, Rojas-García AE, Benitez-Trinidad A, Herrera-Moreno JF, Medina-Díaz IM, Barrón-Vivanco BS, Villegas GP, Hernández-Ochoa I, Sólis Heredia MJ, and Bernal-Hernández YY. (2017) Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. *Environ Toxicol*, 32 . 1754-1764.
- Zhang Q., Li Z., Chang C., Lou J., Zhao M. y Lu C. 2018. Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: A review. *Environmental Pollution*, 236, 71–81.
- Zhang, X., Wallace, A., Du, P., Kibbe, W., and Jafari, N., 2012. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 53,. 542–549.
- Zhou C., Ye M., Ni S., Li Q., Ye D., Li J., Shen Z. and Deng H. (2018). DNA methylation biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma, epigenetics, DOI: 10.1080/15592294.2018.1465790, . 1-46
- Zhu H., Zhu C., Mi W., Chen T., Zhao W., Zuo X., Luo H., and Zhen Li Q. (2018) Integration of Genome-Wide DNA Methylation and Transcription Uncovered Aberrant Methylation-Regulated Genes and Pathways in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Systemic Sclerosis, *International Journal of Rheumatology*, 2018, 1-20