



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“GRADO DE INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA Y SU CORRELACIÓN
EN PACIENTES CON TRASTORNOS NEUROLÓGICOS EN UNA POBLACIÓN
RURAL DE MÉXICO.”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

POR

STEPHANIE MICHELLE BOJORQUEZ CUEVAS

Director de tesis
Dra. Aracely Serrano Medina

Tijuana B.C, Abril 2018

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No.23

Tijuana, B. C., a 23 de Marzo de 2018

C. Stephanie Michelle Bojorquez Cuevas
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

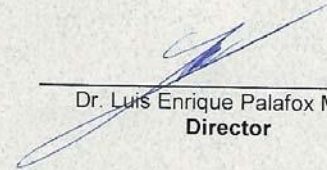
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

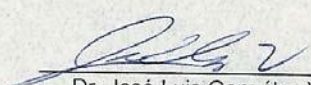
Es propuesto, por la Dra. Aracely Serrano Medina quien será la responsable de la
calidad del trabajo que usted presente, referido al tema “Grado de Inhibición de la
Acetilcolinesterasa y su Correlación en Pacientes con Trastornos Neurológicos
en una Población Rural de México”, el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo
con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII. ANEXOS


Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis




Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director


Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

INDICE

Abreviaturas, acrónimos y símbolos	4
Resumen	8
Capítulo I INTRODUCCIÓN	10
I.1 JUSTIFICACION	13
I.2 OBJETIVO GENERAL.....	13
I.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
I.4 ANTECEDENTES	15
Capítulo II TEORIA GENERAL	17
II.1 Pesticidas Organofosforados	18
II.2 Carbamatos.....	20
II.3 Acetilcolinesterasa	21
II.4 Butirilcolinesterasa	22
II.5 Acetilcolina	23
II.6 Neurotransmisión Colinérgica	24
II.7 Intoxicación por Organofosforados	26
II.8 Trastornos Neurológicos	27
II.9 Depresión mayor.....	28
II.10 Ansiedad Generalizada	28
II.11 Suicidio.....	29
II.12 Polarización, despolarización de las células nerviosas	30
II.13 Influencia de la neurotransmisión colinérgica y los estados de ánimo	32
Capítulo III EXPERIMENTAL	33

III.1 Equipos y Reactivos.....	34
III.2 Diseño del estudio y selección de pacientes	35
III.3 Declaración ética.....	36
III.4 Recolección de datos	37
III.5 Preparacion de las soluciones	38
III.6 Toma de la muestra sanguínea.....	39
III.7 Determinación de hemoglobina.....	40
III.8 Preparacion de las muestras	40
III.9 Determinación de la actividad enzimática	40
III.10 Análisis estadístico	42
Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
IV.1 Diseño de estudio y participantes	44
IV.2 Recolección de datos.....	45
IV.3 Determinación de la actividad enzimática.....	50
Capítulo V CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIASS BIBLIOGRAFICAS	56
ANEXOS	66

ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y SIMBOLOGIA

Op	Organofosforados
AChE	Acetilcolinesterasa
BChE	Butirilcolinesterasa
ACh	Acetilcolina
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
nAChRs	Receptor nicotínico de la acetilcolina
mAChRs	Receptor muscarínicos de la acetilcolina
mL	mililitros
mg	Miligramos
Kg	Kilogramos
L	litros
G	gramos
rpm	revoluciones por minuto
μL	Microlitros
mmol	milimol
min	minutos
Hb	hemoglobina
nm	nanómetros
pH	Potencial de hidrógenos
°C	Grados centígrados
PBS	Buffer salino de fosfatos
SS	Solución salina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacetico
DTNB	5,5-di-tio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Fosfato di-básico de sodio
KH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de potasio
Ca ²⁺	Calcio

DEDICATORIA

Sin ti ninguno de mis logros sería posibles, por eso quiero que sientas cada uno de ellos como tuyos, siendo así tus esfuerzos los míos, recompensándote cada día tus luchas que me llevaron a ser quien soy, donde nunca faltó el apoyo e incondicional afecto.

A ti que siempre estuviste para mí, la mejor madre;

Irma Osiris Cuevas Sánchez.

Por siempre guiarme a tomar las mejores decisiones, y mostrar lo mejor de mí, por siempre estar ahí cuando necesitaba un consejo, a mí hermana, Raquel.

A cada una de esas personas que complementan mi vida y me esperan ver brillar agradezco de todo corazón su incondicional afecto y ánimos para hacer esto posible.

AGRADECIMIENTOS

A mis mejores amigas de la carrera que siempre me apoyaron en cada uno de mis proyectos y a todas las personas que contribuyeron a emprender mi gusto por la investigación y la ciencia.

Dra. Aracely Serrano Medina por ayudarme e incluirme en sus proyectos, impulsarme a ser mejor profesionista y persona, por ser un ejemplo de perseverancia y esfuerzo, y por sobre todo a difundir e inculcar el amor por la investigación.

Dr. José Manuel Cornejo Bravo por apoyar el proyecto desde el inicio, ayudar y aconsejar el mejor camino a seguir.

Dr. José Luis Pineda Camacho quien sin su apoyo y colaboración en la organización del viaje de estudios este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A todos mis maestros, compañeros de carrera y mis amigos más cercanos quien nunca me dejaron rendirme.

Muchas Gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Por el apoyo otorgado en cuanto equipo y salas de investigación, así como una beca de investigación de la 19ª. Convocatoria Interna con número programático 4287 otorgada por la Universidad Autónoma de Baja California.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería UABC Campus Tijuana por todo el conocimiento recibido y transmitido en sus aulas, las cuales fueron mi hogar durante mi formación profesional como Químico Farmacobiologo, así también el apoyo brindado en sus laboratorios de investigación, en especial al laboratorio de Biofarmacia.

A la Facultad de Medicina y Psicología UABC Campus Tijuana por el apoyo en el ámbito de investigación, por el préstamo de sus instalaciones y por cada semestre brindar sus servicios de salud a la comunidad de Santa María Los Pinos del Valle de San Quintín B.C., en especial apoyo al Dr. José Luis Pineda Camacho quien organiza cada uno de estos viajes en apoyo a la comunidad de B.C.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de neurociencias de la Facultad de Medicina y Psicología con el apoyo del laboratorio 1 de la misma Facultad y con el apoyo del viaje de estudios epidemiológicos que se realizan en Santa María Los Pinos del Valle de San Quintín B.C., bajo la dirección de la Dra. Aracely Serrano Medina. Este trabajo fue apoyado por la beca de investigación de la 19ª. Convocatoria Interna con número programático 4287 otorgada por la Universidad Autónoma de Baja California.

Las manifestaciones conductuales de la toxicidad con plaguicidas organofosforados se atribuyen generalmente al agotamiento de la acetilcolinesterasa ubicada en el cerebro y en los eritrocitos, lo cual está implicado en la causa de trastornos afectivos como la ansiedad, depresión e insomnio.

El objetivo de este proyecto fue correlacionar la depresión mayor con riesgo suicida, y la ansiedad generalizada con la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en trabajadores agrícolas expuestos crónicamente a plaguicidas.

Se realizó un estudio transversal basado en una comunidad de 140 trabajadores rurales del noroeste del Estado de Baja California expuestos a los plaguicidas al menos 6 meses y un grupo control no expuesto de 100 pacientes. Se utilizó un cuestionario preestablecido y estructurado para diagnosticar depresión mayor, riesgo suicida y ansiedad generalizada a través de una entrevista cara a cara. Posterior a la entrevista a cada paciente se les determinó la hemoglobina con el equipo

ADVIA60/Mindrray BC3200; en fresco, se analizó la actividad enzimática específica de acuerdo a los valores de la hemoglobina.

El estudio puso de manifiesto que el nivel de depresión mayor y ansiedad generalizada, fue significativamente mayor en el grupo expuesto, reveló una diferencia altamente significativa, $\rho < 0,001$. Los niveles de actividad enzimática para el grupo de trabajadores rurales fue ligeramente baja $\left(X = 427 \frac{mU}{\mu mol} Hb(Fe) \right)$, mientras que el grupo control no expuesto fue un promedio de $\left(X = 543 \frac{mU}{\mu mol} Hb(Fe) \right)$.

Existe una correlación entre la actividad enzimática ligeramente deficiente y el estado de ansiedad de trabajadores agrícolas, es necesario informar a los agricultores sobre el manejo integral de plaguicidas para prevenir complicaciones graves de salud, que pueden ocurrir como resultado del uso inseguro e inapropiado de pesticidas.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

México es un país muy diverso, su gran variedad de climas y suelos le permiten posicionarse en el 3er lugar de producción alimentaria a nivel latinoamericano y el 10° lugar a nivel mundial, en el cual el 13% del territorio nacional se utiliza para la producción agrícola, lo que equivale a 145 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura, donde se cultivan más de 200 productos a lo largo del año en distintas épocas, ya sea a campo abierto o bajo agricultura protegida.¹⁴

Baja California como muchos otros estados en la república de México, cuenta con zonas agrícolas las cuales se ven afectadas por plagas como también sucede a nivel global, dejando una pérdida considerable en la economía de muchos agricultores y la escasez de alimentos necesarios¹⁴. El método más utilizado hoy en día para la eliminación de plagas son los insecticidas sintéticos. Sin embargo, el implementar estos químicos genera un alto precio en la salud de los agricultores que se ven expuestos a ellos diaria y crónicamente.

A nivel estado, Baja California produce cientos de empleos gracias a los sectores agrónomos, siendo 360mil empleos producidos por esta actividad solo en Baja California en el año 2015 ¹⁵, además del aporte alimentario con la producción de sus principales cultivos, como son, jitomate, fresa, trigo, cebolla, algodón, avena, alfalfa verde, espárrago, uva, naranja y limón, posicionando al estado como uno de los primeros 3 lugares en producción de muchos de estos alimentos¹⁶.

Estadísticas oficiales muestran que cada año, más de 3, 000,000 de personas alrededor del mundo presentan intoxicación por pesticidas.¹ Los compuestos

organofosforados (OPs) y carbamatos, son utilizados ampliamente en el control de plagas para la agricultura, incluso en los entornos domésticos, ocasionando intoxicaciones agudas y crónicas por la exposición a los mismos convirtiéndose en un problema importante de salud pública.²

Entre las exposiciones prolongadas más frecuentes, se encuentran el consumo de alimentos contaminados,³ el consumo de agua contaminada, el contacto con la piel y la inhalación por aire contaminado.⁴

Los pesticidas organofosforados y los carbamatos tienen un mecanismo común de acción tóxica: La inhibición de las colinesterasas en el sistema nervioso central, uniones neuromusculares y en la sinapsis nerviosa periférica.⁹

Las colinesterasas presentes en el tejido neural y en los eritrocitos son conocidas como la acetilcolinesterasa (AChE) y las colinesterasas presentes en el suero y sintetizadas en el hígado son conocidas como butirilcolinesterasa (BChE). La evaluación de las actividades enzimáticas ha demostrado ser un método sensible para la supervisión a la exposición a inhibidores de la colinesterasa tales como los compuestos organofosforados y carbamatos.^{10, 11,12}

I.1 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la demanda alimenticia de la población aumenta día con día obligando a las zonas agrícolas a ampliarse generando un sistema de abasto mayor y al mismo tiempo métodos más efectivos para brindar calidad, asegurándose así la menor pérdida de productos y por lo tanto una mejor producción, sin embargo este aumento ha generado que las zonas rurales agricultoras de los estados dedicados a la producción alimentaria como Baja California someta a sus trabajadores a mayores horas de trabajo y a contaminantes tales como elementos organofosforados y carbamatos.

Los servicios de salud han reportado una alta incidencia en los hospitales de salud pública del estado de Baja California de pacientes intoxicados por plaguicidas, por lo que se decidió implementar un estudio dedicado a la inhibición de acetilcolinesterasa y así poder brindar una información adecuada al personal de salud y a los trabajadores del campo de los efectos negativos en su salud y cómo poder tratar adecuadamente con oximas reactivadoras de acetilcolinesterasa.

I.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa en pacientes con trastornos neurológicos en una población rural y urbana del estado de Baja California México.

I.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el grado de inhibición de la acetilcolinesterasa mediante el ensayo Ellman modificado en pacientes que presenten síntomas severos de depresión mayor en poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar el grado de inhibición de la acetilcolinesterasa mediante el ensayo Ellman modificado en pacientes que tengan tendencia suicida, en poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar el grado de inhibición de la acetilcolinesterasa mediante el ensayo Ellman modificado en pacientes que presenten ansiedad generalizada en poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar la actividad enzimática de la población no expuesta para utilizarla como control y correlacionar los resultados con la población rural.
- Determinar la hemoglobina total de cada paciente.
- Realizar análisis estadísticos correlacionando el impacto ambiental laboral entre los dos grupos poblacionales.

I.4 ANTECEDENTES

De acuerdo con nuestro conocimiento, no suficientes investigaciones que describan los efectos neurológicos por exposición ambiental de los plaguicidas en poblaciones rurales y los efectos negativos neuropsicológicos relacionados.

Sin embargo, existen investigaciones que correlacionan el medio ambiente de las poblaciones rurales asociándola con la actividad enzimática que soportan la idea de que la exposición a los compuestos OPs proponiendo que pueden estar asociados a la salud mental en individuos asociados a los trastornos de la depresión con tendencia al suicidio y los cuales habitan una comunidad rural en general.¹³

Diversos análisis han sido reportados sobre la exposición a los pesticidas como posible riesgo de estimular u ocasionar la aparición de enfermedades como Parkinson, Alzheimer, trastornos de déficit de atención e hiperactividad, desórdenes de ansiedad y depresión; así como desórdenes mentales, en países subdesarrollados sobre todo en las poblaciones rurales.⁵⁻⁸

El investigador Franz Worek fue uno de los pioneros en la investigación sobre la inhibición de la acetilcolinesterasa eritrocitaria, al igual que estandarizó y ajustó el método de Ellman para eliminar la interferencia que generaba el color rojo de la sangre al realizar la lectura en el espectrofotómetro. Este investigador realizó múltiples investigaciones sobre el método más apropiado para realizar estudios económicos rápidos y prácticos para la identificación de la inhibición de AchE³⁷

Recientemente el Reino Unido investigó a los granjeros de ovejas de diferentes zonas rurales, donde los resultados obtenidos sugieren que los individuos con una exposición prolongada a pesticidas, incrementa el riesgo de desórdenes psiquiátricos.¹⁷ En el estudio, 78 voluntarios sanos no mostraron ansiedad, en cambio los 127 granjeros expuestos crónicamente a los pesticidas mostraron desordenes psicológicos y ansiedad.

La depresión mayor es un desorden psiquiátrico común mundialmente, ^{18,19} la Organización Mundial de la Salud estima que la depresión forma parte de las principales enfermedades a nivel mundial.²⁰ Sin embargo, la depresión en personas adultas es mayor en zonas rurales que en las zonas urbanas. ¹⁸

Aun así, existe controversia respecto a los tipos de químicos que existen asociados a estos trastornos neurológicos y los diferentes factores de riesgo que representan a la salud mental, ya que estudios asiáticos demuestran la relación con el factor de riesgo de desórdenes neuropsicológicos debido a la exposición a pesticidas en depresión de adultos mayores.^{18, 21,22}

CAPITULO II
TEORÍA GENERAL

II.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Estos agentes, son utilizados para controlar varios tipos de pestes. Su mecanismo de acción es al entrar en contacto con los insectos ya sea como aerosol/ vía aérea o por contacto/ ingestión, este proceso es denominado como método sistémico, donde el insecto entra en contacto directo con la planta o la ingiere generando la muerte. Durante la segunda guerra mundial comenzaron las investigaciones con los pesticidas organofosforados, en esta etapa de la historia se desarrollaron y descubrieron la mayoría de ellos para ser utilizados en los combates durante la segunda guerra mundial. Los insecticidas organofosforados fueron creados como gases neurológicos compuestos tales como el soman, el sarín, y el tabun; posteriormente fueron utilizados como un componente del agente naranja para deforestar grandes áreas de la jungla en combate. Después de la segunda guerra mundial estos químicos fueron empleados en usos domésticos.⁵⁰

Sin embargo, existen organofosforados con un grado de toxicidad menor, los cuales se emplean actualmente en la medicina veterinaria y humana como desparasitantes.²⁷

Entraron en auge al mercado debido a su biotransformación relativa, comparada con los anteriores pesticidas organoclorados, los cuales tardan 100 años en biotransformarse en compuestos inertes o de baja toxicidad.²⁷

Los OPs son el grupo de pesticidas más utilizados en el mundo, (Tabla 1) al mismo tiempo su mecanismo de acción brinda un alto interés en estudios de la salud

mental debido a sus efectos negativos en el proceso normal de la señalización neuronal.¹³ Los compuestos organofosforados tienen una cualidad que los hace bastante peligrosos para la salud, su alto grado de absorción. Estos compuestos se absorben rápida y fácilmente por la piel, el sistema respiratorio y por el sistema gastrointestinal debido a su tendencia lipofílica, en general son rápidamente absorbidas por cualquier membrana fisiológica en la que entren en contacto.

Compuestos	Rango de toxicidad	Dosis diaria aceptada (mg/kg)
Metil Azinfos	5	0.005
Clorfenvinfos	-	0.002
Diazinon	4	0.002
Diclorvos	-	0.004
Dimetoato	4	0.01
Fenitrothion	-	0.005
Malation	4	0.02
Parathion	6	0.005
Metil paration	5	0.02
triclorfon	4	0.01

Tabla 1. Pesticidas organofosforados más comunes y comerciales utilizados en la agricultura, rango individual de toxicidad además de sus dosis diarias permitidas aceptadas por kg de peso.

Los compuestos organofosforados actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa mediante la fosforilación del sitio estérico, provocando la acumulación de acetilcolina la cual genera los síntomas de intoxicación, (Imagen 1) como lo son las alteraciones neurológicas y cognitivas, así como síntomas psicológicos, sin embargo, existe un medicamento capaz de revertir la inhibición de la acetilcolinesterasa.

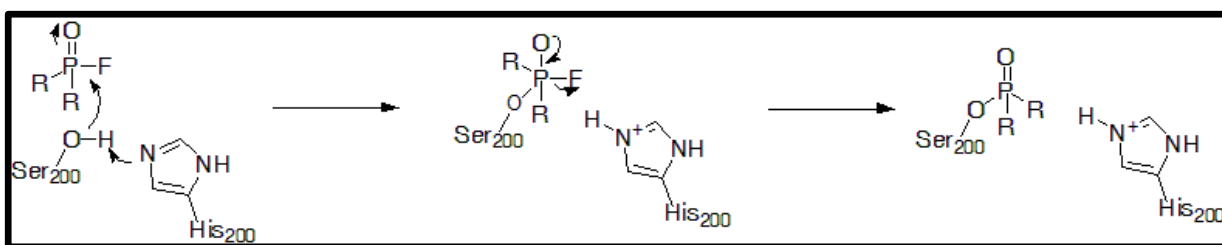


Imagen 1. Interacción del sitio activo de la Acetilcolinesterasa y un compuesto organofosforado dejando a la enzima inactiva por la generación de enlaces covalentes con el OH de la Serina 200.

La Pralidoxima es un método económico y efectivo que ayuda en la eliminación del organofosforado del organismo y rompe el enlace covalente de la enzima con el organofosforado reactivando el sitio activo.³⁶

A pesar de todos los efectos negativos respecto a estos compuestos son considerados pesticidas no persistentes, debido a que son relativamente inestables y se degradan en el medio ambiente como resultado de la hidrólisis y la fotólisis por lo que se dice que tienen un pequeño impacto en el medio ambiente a pesar de sus efectos agudos sobre los organismos.²⁷

II.2 CARBAMATOS

Los carbamatos (Tabla 2) inhiben la acetilcolinesterasa por carbamoilación del sitio estérico. Al igual que los compuestos organofosforados el mecanismo de acción es el mismo, con la diferencia del tiempo menor en el que actúa con respecto a los organofosforados. La intoxicación con carbamatos es menor ya que permite que la acetilcolinesterasa se reactive espontáneamente después de su inhibición sin

necesidad de implementar oximas como la Pralidoxima como sucede con los Organofosforados.²⁷

Compuestos	Rango de toxicidad	Dosis diaria aceptada (mg/kg)
Aldicarb	6	0.005
Aminocarb	5	-
Carbaril	4	0.01
Carbofurano	5	0.01
Dimetano	4	-
Dimetilano	4	-
Isolano	5	-
Metomilo	5	-
Propoxur	4	0.02
Piramato	4	-
Pirolano	5	-
zectrano	5	-

Tabla 2. Pesticidas carbamatos más comunes y comerciales conocidos y usados en la agricultura, dosis diarias permitidas y rango de toxicidad individual. En la mayoría de los carbamatos no se cuenta con una dosis diaria aceptada debido a la falta de estudios realizados en este grupo de compuestos.

II.3 ACETILCOLINESTERASA

Esta enzima (Imagen 2) se encuentra en la terminal presináptica, donde las moléculas de acetilcolina se unen y activan los receptores de acetilcolina (colinoreceptor). La Acetilcolinesterasa se encarga de liberar la acetilcolina de los receptores, dividiéndola específicamente en colina y acetato, terminando así con la neurotransmisión colinérgica, el tiempo de acción de acetilcolinesterasa es muy rápida, en tan solo unas fracciones de segundo.²⁷ Sin embargo la acetilcolinesterasa

no solo se encuentra en la presinapsis, sino también en los glóbulos rojos, de esta forma es posible cuantificar la acción de estas enzimas por análisis sanguíneos.

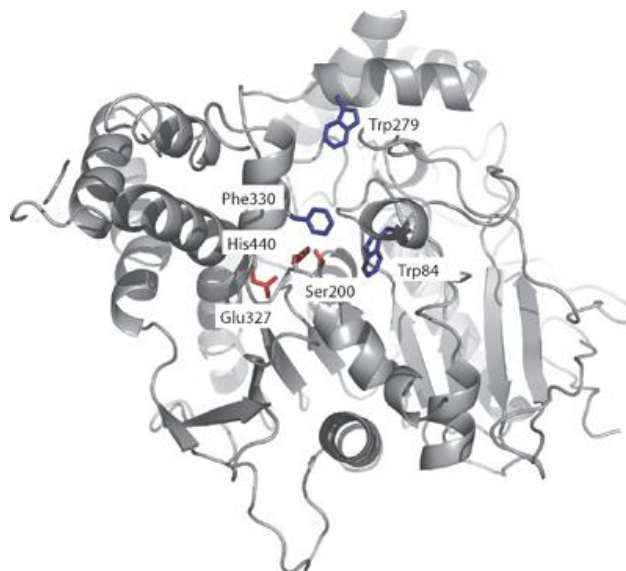


Imagen 2. Imagen de la acetilcolinesterasa en su forma tridimensional con exposición del sitio activo donde se observan los diferentes tipos de aminoácidos expuestos que generan el sitio activo de los cuales se compone por 6, siendo uno de los más importantes por su formación de puentes covalentes con los compuestos organofosforados el sitio de Serina 200.

II.4 BUTILCOLINESTERASA

La enzima butirilcolinesterasa es un hidrolizador de serina que cataliza la hidrólisis de ésteres de colina²⁹. Es una enzima multifuncional que regula la transmisión colinérgica³⁰. Está relacionada con el crecimiento, la diferenciación y la degeneración del tejido nervioso³¹. Los niveles de BChE en las muestras del fluido cerebroespinal han sido implementados como marcadores sensitivos y específicos

para Alzheimer inclusive los niveles plasmáticos se han visto implicados en la lepra.^{32, 33, 34}

II.5 ACETILCOLINA

Acetilcolina (ACh), uno de los primeros neurotransmisores identificados (Imagen 3), funciona como neurotransmisor primario modulador de numerosas funciones de comportamiento y fisiológicas de las neuronas colinérgicas en el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP).

La familia de las colinesterasas es una de las enzimas más importantes en el cuerpo humano, la colinesterasa no solo se encuentra en el cuerpo humano sino también en y otros vertebrados para el funcionamiento de su SNC.¹³

Dentro del SNC, ACh modula diversas funciones de comportamiento, incluyendo la cognición y la atención, mientras que, en el SNP, la ACh exhibe modulación tanto inhibitoria como excitatoria de funciones fisiológicas y motoras dinámicas. Las acciones fisiológicas de ACh están mediadas por la activación de receptores nicotínicos-acetilcolina específicos de subtipo (nAChRs) o receptores.

Muscarínicos-acetilcolina (mAChRs). La disponibilidad de ACh para la neurotransmisión colinérgica implica un proceso altamente coordinado que implica la biosíntesis de ACh, el almacenamiento y la liberación vesicular, el metabolismo y el reciclado de productos de degradación de ACh. Este proceso dinámico de biosíntesis de ACh depende de la disponibilidad y captación presináptica del sustrato ACh, la

colina. Se han identificado varios compuestos que activan o inhiben selectivamente funciones de ACh en su receptor.²⁷

La acetilcolina es el neurotransmisor fundamental de las neuronas motoras bulbo-espinales, las fibras preganglionares autónomas, las fibras colinérgicas posganglionares (parasimpáticas) y muchos grupos neuronales del SNC (p. ej., ganglios basales y corteza motora). Se sintetiza a partir de la colina y la acetilcoenzima A mitocondrial, mediante la colinacetiltransferasa. Al ser liberada, la acetilcolina estimula receptores colinérgicos específicos y su interacción finaliza rápidamente por hidrólisis local a colina y acetato mediante la acción de la acetilcolinesterasa. Los niveles de acetilcolina están regulados por la colinacetiltransferasa y el grado de captación de colina.³⁹

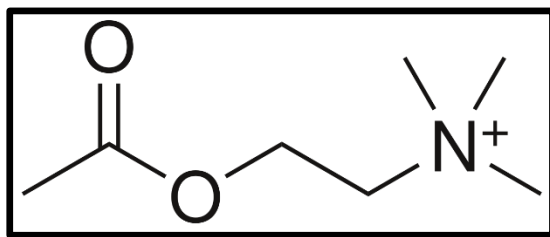


Imagen 3. Acetilcolina. Se muestra en la imagen la estructura química de la acetilcolina en un plano bidimensional como neurotransmisor.

II.6 NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA

La neurotransmisión colinérgica comienza al sintetizarse el neurotransmisor acetilcolina, posteriormente generado el neurotransmisor se procede al

almacenamiento de los mismos en vesículas sinápticas encontradas en las terminaciones neuronales.

La síntesis de la acetilcolina (Imagen 4) implica la unión de la colina acetilcoenzima A, la reacción catalizada por una enzima específica, la colina acetiltransferasa (o colina acetilasa):³⁵

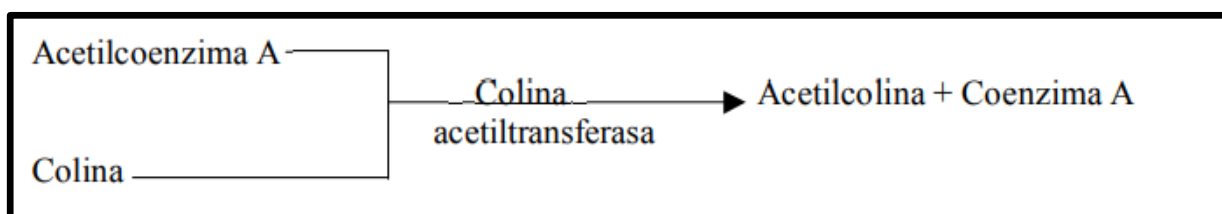


Imagen 4. Reaccion desglosada de la Sintesis de acetilcolina dentro del metabolismo humano. Acetilcoenzima A se une a colina, generando colina acetiltransferasa, al continuar la reacción y al estabilizarse la molécula termina generando dos compuestos, Acetilcolina y coenzima A.

Cuando es estimulada la terminal nerviosa por un potencial de acción se libera el neurotransmisor al espacio sináptico generando un impulso nervioso a la terminación provocando la liberación en cadena de más vesículas, este evento se suma para generar una contracción muscular.

La neurotransmisión colinérgica concluye con la inactivación biológica de la acetilcolina. Esta se produce por hidrólisis, catalizada por la acetilcolinesterasa, con producción de colina (prácticamente sin acción sobre el receptor), que se reincorpora por captación de alta afinidad para ser reutilizada en la síntesis de acetilcolina y ácido acético.³⁵

II.7 INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS

La inhibición de la AChEasa provoca acumulación de la ACh en la unión sináptica y la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos. La causa de muerte por envenenamiento con organofosforados por exposición aguda está asociada en general con la asfixia y el fallo respiratorio ³⁹ (Tabla 3).

Inhibición de ACE	Niveles de intoxicación	Síntomas clínicos
25-50%	Leve	Cefalea, alteraciones visuales, náuseas, mareo, salivación, lagrimeo, miosis, espasmo bronquial, secreciones bronquiales
50-75%	Moderado	Además bradicardia, hipotensión, trastorno A-V, Vómito, astenia, sudoración, trastornos metabólicos, trastornos electrolíticos, deterioro mental progresivo.
Más de 75%	Severo	Convulsión, coma, edema pulmonar, insuficiencia respiratoria severa y muerte.

Tabla 3. Relación porcentual de inhibición de la Acetilcolinesterasa, donde se describe el efecto clínico que genera dependiendo el grado de inhibición enzimática.

Los síntomas de envenenamiento crónico con plaguicidas de actividad anti-colinesterasa son similares a los de las situaciones en las que la acción colinérgica se mantiene ininterrumpidamente a lo largo del tiempo. Los receptores de ACh son de dos tipos: nicotínicos y muscarínicos. La estimulación continuada de los receptores muscarínicos (AChR) por la inhibición de la enzima AChEasa, produce síntomas o

signos de envenenamiento colinérgico que incluye broncoconstricción y secreciones bronquiales, aumento de la salivación y el lagrimeo, aumento del tono gastrointestinal y del peristaltismo, náuseas, vómitos, diarreas, braquicárdias que pueden progresar hasta el bloqueo cardíaco, constricción de pupilas, etc. La estimulación de receptores nicotínicos (en las uniones neuromusculares) causa debilidad muscular, tic involuntario, gesticulaciones y calambres. La acumulación de ACh en el SNC causa tensión, ansiedad, insomnio, inestabilidad emocional, neurosis, apatía, confusión, jaqueca, convulsiones, depresión de los centros respiratorio y circulatorio, pudiendo llegar a coma y muerte.³⁹

El mecanismo de toxicidad de los insecticidas organofosforados y carbamatos conlleva la inhibición de la AChEasa, (Imagen x) interaccionando con el grupo OH de la serina del centro activo. Se forma un intermediario de la enzima fosforilada o carbamoilada, y es la salida de estos grupos (fosfato o carbamato) del centro activo de la enzima lo que limita la velocidad del proceso.³⁹

II.8 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

Los trastornos neurológicos son enfermedades del sistema nervioso central y periférico, es decir, del cerebro, de la médula espinal, de los nervios craneales y periféricos, de las raíces nerviosas, del sistema nervioso autónomo, de la placa neuromuscular, y de los músculos.²⁶ Entre esos trastornos se cuentan la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, enfermedades cerebrovasculares tales

como los accidentes cerebrovasculares, la migraña y otras cefalalgias, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, las infecciones neurológicas, los tumores cerebrales, las afecciones traumáticas del sistema nervioso tales como los traumatismos craneoencefálicos, y los trastornos neurológicos causado por la desnutrición.²⁶ El sistema nervioso puede verse afectado por numerosas infecciones o desequilibrios en el funcionamiento neuronal. Cientos de millones de personas en todo el mundo sufren trastornos neurológicos.

II.9 DEPRESIÓN MAYOR

La depresión se define como una enfermedad o trastorno mental que se caracteriza por una profunda tristeza, decaimiento anímico, baja autoestima, pérdida de interés por todo y disminución de las funciones psíquicas.¹⁸

Actualmente la depresión es el problema más común en psiquiatría en el mundo, se reporta que el 10 al 20% de la población mundial sufre de este trastorno, a pesar de esto se calcula que el número de afectados sigue en aumento continuo.¹⁸

II.10 ANSIEDAD GENERALIZADA

La ansiedad al igual que la depresión compone uno de los principales trastornos psicológicos que afecta la salud mental de millones de personas en todo el mundo, las causas pueden ser muy variables como lo son el estilo de vida y el entorno. La ansiedad es un estado mental que se caracteriza por una gran inquietud, una intensa

excitación y una extrema inseguridad. Estudios epidemiológicos también han reportado una mayor incidencia de ansiedad y depresión en grupos particulares de individuos como aquellos con condiciones de salud crónica y en ocupaciones específicas. Con respecto a este último, Roberts y Lee (1993) encontraron la mayor incidencia de depresión en la agricultura.²⁵

II.11 SUICIDIO

Los pensamientos suicidas son comunes en presencia de depresión mayor, están estrechamente relacionados.^{23, 24,25}

El suicidio representa un problema significativo en la salud pública global colocándose en el décimo lugar como causa de muerte. Cada país maneja cifras diferentes respecto a la cantidad de suicidios que se llevan a cabo entre sus poblaciones incluyendo las variables entre las diferentes regiones de un mismo país, donde las zonas rurales representan los números más altos. La razón por la que las personas cometen o intentan suicidio no es muy claro en las regiones rurales, a pesar que el suicidio es un fenómeno muy complejo de analizar. Se puede concluir que podría ser causado como resultado de una interacción biológica, psicológica y factores socioeconómicos, así como también los contaminantes del ambiente.

Existen datos que revelan que los lugares con los porcentajes más altos de suicidio son áreas donde se utilizan pesticidas organofosforados dentro de las regiones rurales.¹³ Los compuestos organofosforados además de contribuir

indirectamente en los pensamientos suicidas también es un químico utilizado para cometer suicidio, inclusive su posesión puede asociarse directamente con desórdenes mentales.¹³

II.12 POLARIZACIÓN, DESPOLARIZACIÓN Y REPOLARIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS

Para poder llevar a cabo la transmisión del impulso nervioso se necesita efectuar una serie de pasos en la célula nerviosa. Las neuronas son excitables debido a que en sus membranas se distribuyen iones (partículas con cargas eléctricas). Esta distribución es desigual, sin embargo, mantiene un equilibrio de carga que le permite reaccionar a los cambios electroquímicos que se generen. A este estado de la membrana neuronal se lo denomina polarización. La llegada de un potencial de acción despolariza la membrana presináptica, lo que provoca la apertura de canales iónicos. Sucesivamente el Ca^{2+} entra a la célula y el aumento de su concentración hace que las vesículas de acetilcolina se unan a la membrana y liberen, por exocitosis, su contenido de neurotransmisor en la hendidura sináptica.

Dentro de la membrana postsináptica están los receptores de neurotransmisores a los que se une la molécula neurotransmisora (ACh) lo que provoca la apertura de los canales iónicos en esta membrana. La entrada de Ca^{2+} y de otros cationes produce la despolarización y excitación de la membrana

postsináptica, y esa despolarización se propaga hasta la siguiente célula nerviosa o a la placa motora correspondiente.

Este fenómeno se llama despolarización o transmisión del impulso nervioso. El impulso se propaga a lo largo de la membrana, al llegar al axón se produce la liberación de neurotransmisores, que al entrar en contacto con la membrana neuronal contigua ejercen sobre ella la acción de un estímulo (cambios iónicos) generando un estímulo en cadena. Es así como se propagan los impulsos nerviosos de una neurona a otra.³⁹

Para que una neurona esté en condiciones de transmitir un nuevo impulso, la membrana se tiene que repolarizar, es decir debe recuperar el estado electroquímico inicial. La única forma en que la membrana puede repolarizarse es mediante la acción de la acetilcolinesterasa, la cual se encuentra en la terminación postsináptica, esta hidroliza rápidamente la unión de acetilcolina con el receptor, lo que conlleva a la repolarización de la membrana y las prepara para la llegada de un nuevo impulso.

La función normal y sincronizada de todos estos componentes depende de una acción rápida por parte de la acetilcolinesterasa, que permite la propagación sincronizada de los impulsos.³⁹

II.13 INFLUENCIA DE LA NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA Y LOS ESTADOS DE ÁNIMO

Numerosas investigaciones sugieren que las monoaminas del cerebro tales, como la norepinefrina, la dopamina y la serotonina, son factores determinantes en los estados de ánimo, además de jugar un rol importante en el sueño, el tono motor, los sueños, la analgesia, el pensamiento, la memoria y el sistema endocrino.⁴¹ Incluso se reporta la relación con los desórdenes Colinérgicos, la depresión y la manía.

Varios estudios demuestran que los inhibidores de la acetilcolinesterasa inducen estados depresivos y, efectos anti energéticos, debido a los altos niveles de acetilcolina, ⁴⁰ por la alteración del balance adrenérgico-colinérgico⁴¹. La hiperactivación del sistema neuroendocrino adrenal pituitario hipotalámico, al verse incrementado los niveles de cortisol, acetilcolina y beta endorfina, se asociaron con pacientes deprimidos.⁴¹ Varias investigaciones sugieren que la acetilcolina juega un papel importante en la liberación de la beta endorfina, este efecto neuroendocrino llevan naturalmente a la depresión.⁴¹

CAPITULO III
EXPERIMENTAL

III.1 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

Equipo

1. Centrifuga
2. Espectrofotómetro Uv-Vis 6705 Jenway
3. Micropipetas
4. Cajas para muestras
5. Termoblock
6. Gradilla
7. Vortex
8. Balanza analítica Denver instrument M-200
9. Agitador magnético VWR Dyla-Dual
10. Analizador hematológico automatizado Mindray modelo BC3200 y ADVIA

Material

1. Tubo morado
2. Algodón
3. Ligaduras

4. Tubos 5 ml
5. Ependorf 2 ml
6. Puntillas todos tamaños
7. Pipetas transfer
8. Micropipetas diferentes volúmenes
9. Agitador de tubos

Reactivos

1. PBS 7.4
2. Solución salina
3. DTNB
4. ATCh
5. Diluting reagent
6. triton x100

III.2 DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES.

Estudio transversal de base comunitaria en dos periodos de tiempo; del 17 al 21 de mayo y del 4 al 8 de octubre del 2017 en el Valle de San Quintín, B.C., en el Noroeste de México. 140 pacientes expuestos a los plaguicidas que habitan en la

población rural, dedicados a la agricultura en el ejido Venustiano Carraza o también llamado Santa María, así como 100 pacientes no expuestos, fueron la población de estudio.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes diagnosticados con depresión, ansiedad extrema, tendencia suicida.
2. Todos los pacientes deberán ser mayores de 18 años de ambos sexos.
3. Todos los pacientes deberán tener residencia en la zona geográfica a muestrear, por al menos seis meses.
4. Pacientes que firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes menores de edad (0 a 17 años)
2. Pacientes diagnosticados con, cardiopatías, hipotiroidismo, leucemia, cáncer, Alzheimer, enfermedad de Parkinson.
3. No haber firmado el consentimiento informado.

III.3 DECLARACIÓN ÉTICA.

El estudio fue revisado y aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, de la Universidad Autónoma de Baja California. Los participantes recibieron explicaciones del estudio y del propósito del estudio en su lengua materna. El consentimiento informado de los pacientes participantes del estudio antes el comienzo de cada entrevista. Se preparó un consentimiento informado

escrito y verbal, que involucró el propósito de la investigación, la duración esperada de la entrevista y una descripción que los participantes podían retirar de la entrevista en cualquier momento, no tenían riesgo y no hubo remuneración económica de por medio por su reclutamiento. Se leyó esta declaración a cada participante del estudio antes dirigiendo la entrevista y solicitar su permiso para participar en el estudio.

III.4 RECOLECCIÓN DE DATOS.

Se realizó una entrevista cara a cara con el trabajador rural para solicitar información y así mismo para diagnosticar su estado psicológico. Un total de seis estudiantes de medicina capacitados sobre la importancia de la confidencialidad de la información, fueron los recolectores de datos y los que diagnosticaron la situación neurológica del paciente. Los datos fueron recolectados utilizando el examen diagnóstico “Mini international neuropsychiatric interview”⁴³ cuestionario previamente probado y estructurado. Recopilamos información sobre aspectos sociodemográficos, económicos y aspectos sanitarios y de sintomatología de exposición a pesticidas. En cuanto a los datos del uso de los plaguicidas en los campos, no fue posible recolectarlos, ya que los jornaleros no tienen el conocimiento de que tipo de mezcla utilizan para evitar las plagas en los campos agrícolas.

Los participantes fueron entrevistados y muestreados en el sitio del viaje de estudios. En el sitio del viaje de estudios epidemiológicos, se colocaron los

consultorios médicos y el laboratorio clínico, por lo que el estudio bioquímico del paciente fue en fresco y el diagnóstico psicológico fue al momento.

III.5 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

III.5.1. Preparación de buffer de fosfato 0.1 M pH 7.4 (PP).

Para la preparación del Buffer de fosfato a pH 7.4 se necesitaron preparar dos soluciones una con fosfato di-básico de sodio y otra con fosfato monobásico de potasio. **Solución 1.** Se pesaron 17.8g de fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), se procedió a agregarlo lentamente a un litro de agua destilada, después se mezcló la solución final con agitación magnética hasta que se disolvió completamente.

Solución 2. Se prepararon 2.72g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), se procedió a agregarlo lentamente a 200mL de agua destilada, después se mezcló la solución final con agitación magnética hasta que se disolvió completamente. Finalizando la preparacion de las mezclas se procedió a mezclar un poco de la solución 2 en la solución 1, monitoreando el pH constantemente hasta alcanzar un pH de 7.4 a temperatura ambiente. Al alcanzar el pH deseado se procedió a refrigerar a 4°C.

III.5.2. Preparacion de DTNB 10 mmol.

Se pesaron 79.26mg de DTNB los cuales se adicionaron a 20mL de buffer de fosfatos, después se mezclaron por agitación magnética hasta que se disolvió

completamente, al finalizar la homogenización se procedió a guardar en alícuotas de 5mL la solución resultante y almacenada a -4°C

III.5.3. Preparación del sustrato (ATCh 28.3 mmol).

Se pesaron 82.24 mg de acetilcolina, se disolvieron en 10mL de agua destilada fría, la cual se mezcló por agitación mecánica hasta homogenizar, posteriormente se almacenó la solución resultante en alícuotas de 2mL y se almacenó a -4°C.

III.5.4. Preparación de Diluting reagent para muestras de sangre completa.

Se tomaron 150µL de triton X-100, los cuales se agregaron a 499.85mL de PP, enseguida se mezcló por agitación magnética hasta homogenizar, la solución resultante se almacenó en refrigeración.

III.6 TOMA DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

Posterior al diagnóstico psicológico del paciente y haber firmado el consentimiento informado, se procedió a realizar la toma de muestra de sangre por punción venosa: Se utilizaron jeringas o sistema vacutainer para tomar 3 ml de sangre venosa en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA. Se dividieron las muestras en 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml. Todas las muestras recolectadas se procesaron inmediatamente después de la toma de la muestra, así mismo se procedió a realizar los ensayos.

III.7 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA

Una vez extraída la muestra, se colocó en el equipo hematológico automatizado Mindray modelo BC-3200 y ADVIA 60 para la determinación de la hemoglobina.

III.8 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la preparación de las muestras se realizaron los siguientes procedimientos:

Se diluyó la muestra 1:40 utilizando buffer de fosfatos pH 7.5, posteriormente se lisaron los eritrocitos con Diluting reagent. Se separaron el plasma de los eritrocitos por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante (Hemolisado) fue el utilizado.

III.8.1. Preparación del blanco

Se tomó 1mL de PP a un pH de 7.4, 50µL de DTNV 10mmol, 500 µL de la muestra hemolisada y 55 µL de SS, la mezcla resultante se mezcló en Vortex y se procedió a incubar por 10 minutos a una temperatura de 37°C en Termoblock. Una vez pasados los 10 minutos de incubación se procedió a calibrar el espectrofotómetro utilizando el blanco previamente preparado, el cual se ajustó a una lectura de 436nm.

III.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El ensayo para determinar la actividad enzimática, se realizó de acuerdo al protocolo de Worek et al.^{11, 12}

Se prepararon los reactivos en fresco antes de medir la actividad enzimática. Se realizó la mezcla de reactivos en una cubeta de lectura con las siguientes cantidades para la determinación de la actividad enzimática:

Se tomó 1mL de PP a un pH de 7.4, 50μL de DTNV 10mmol, 500 μL de la muestra hemolisada y 55 μL de SS, la mezcla resultante se mezcló en Vortex y se procedió a incubar por 10 minutos a una temperatura de 37°C en Termoblock.

Posteriormente se agregaron 50μL de ATCh y se procedió a homogenizar con ayuda del Vortex, inmediatamente se realizaron las lecturas correspondientes manteniendo la temperatura de 37°C.

Se tomó nota de las absorbancias a tiempo 0 y 3 min.

Para lograr el equilibrio de la temperatura y la reacción completa de los grupos sulfhidrilo de la matriz de la muestra con DTNB, la mezcla se incubó durante 10 min antes de la adición del sustrato (Acetilcolina, ATCh). La cinética de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, se midió a 436 nm utilizando el espectrofotómetro Beckman DU-530.

III.9.1. Cálculos

- La actividad enzimática se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$AChE \text{ actividad} \left(\frac{\frac{\mu M}{L}}{\text{min}} \right) = \frac{Muestra \left(\frac{mE}{\text{min}} \right) - Blanco \left(\frac{mE}{\text{min}} \right) * FD * 100}{10.6}$$

$$\epsilon \text{ de TNB}^- = 10.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ a } 412 \text{ nm, Factor de dilución, FD} = 316$$

- La cantidad de sustrato hidrolizado se correlacionó con los niveles de concentración de hemoglobina para el cálculo de la actividad AChE en términos de $\frac{\text{unidades internacionales mU}}{\text{hemoglobina } \mu\text{M Hb}}$

$$AChE \left(\frac{\frac{\mu\text{M}}{\text{L}}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{Actividad} \left(\frac{\frac{\mu\text{M}}{\text{L}}}{\text{min}} \right) \times FD \times 1.58}{Hb \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{L}} \right)}$$

El factor de 1.58 corrigió para las diferentes diluciones de las muestras de sangre sobre la determinación de la concentración de hemoglobina y la actividad de la AChE.

III.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS versión 21.0. Si los resultados pasaban la prueba de normalidad se realizaron comparaciones utilizando la distribución t de Student, análisis de Chi cuadrada, también se usó ANOVA a diferentes vías o ANOVA de rangos todo de acuerdo al tipo de datos que se obtuvieron en la investigación.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 DISEÑO DE ESTUDIO Y PARTICIPANTES

El valle de San Quintín se encuentra a 325 km al sur de San Diego California, Estados Unidos de América. Según el censo de 2010, la zona tiene una población total de 42,411 de los cuales 14,671 (34.59%) son habitantes rurales⁴². Tiene 12 ejidos o distritos, entre ellos El ejido Venustiano Carranza o Santa María Los Pinos, en donde se realizó el estudio. Santa María cuenta con una población de 2,078 habitantes; los cuales el 49.56% son mujeres y 50.43 % son hombres. Los cultivos más comunes en el noroeste de Baja California son Tomate, pepino, cebolla, arándano, nopal, moras, col de brúcelas, calabacitas, frambuesas, zarzamoras, entre otras.

El diseño del estudio consistió en determinar las diferentes características y el desarrollo del diseño de estudio observacional, en un momento dado, en una sola medición retrospectiva. Cada estudio fue una fuente importante de información sobre la salud y los hábitos de la población. El estudio transversal proporciona estimaciones de prevalencia en diferentes grupos demográficos. El diseño de estudios fue transversal ya que es el diseño de una investigación observacional, individual, que mide una o más características o enfermedades en un momento dado. Por su exposición se pudo clasificar en observacional; por su temporalidad, es retrospectivo; su unidad de análisis es un individuo y se midió en un solo momento.

IV.2 RECOLECCIÓN DE DATOS.

Se realizó una entrevista cara a cara con cada uno de los trabajadores rurales para solicitar información y así mismo para diagnosticar su estado psicológico. Los datos fueron recolectados utilizando el “Mini international neuropsychiatric interview”⁴³ cuestionario previamente probado y estructurado. En la tabla 4, se concentra la información recolectada sobre aspectos sociodemográficos, económicos y aspectos sanitarios y de sintomatología de exposición a pesticidas conocidos como el “síndrome del farmer”.^{44,42}

Género	62.12 %(M), 37.87% (H)
Edad	32.34 ± 10.54(M), 35.80 ± 11.57(H)
Escolaridad	46.21% Primaria 33.92% Secundaria 19.87% Sin estudios
Estado Civil	39.39% Casados 20.45% Solteros 40.16% Unión libre
Tiempo de residencia	6.34 ± 7.90 años

Tabla 4. Datos demográficos de los trabajadores rurales, expuestos a los plaguicidas.

Los datos más relevantes nos indican que el mayor porcentaje de la población de estudio (población expuesta) fueron mujeres en una edad promedio de 32 años, con primaria terminada, con estado civil de unión libre, cumpliendo el requisito para el criterio de inclusión para el tiempo de residencia mayor a 6 meses. Como resultado del tiempo de residencia en la población de estudio fue un promedio de 6.34 años, en general.

Los datos comparativos con la población no expuesta, (Tabla 5) demuestran también una población mayor de mujeres que de hombres, la edad promedio fue de 24.18 años en comparación del grupo expuesto que fue de 33.61 años. La región de estudio con mayor porcentaje fue la población del centro comunitario agrícola, (Santa María Los Pinos) en menor proporción, las regiones de estudio pertenecieron a diversos puntos del centro comunitario, otras villas cercanas o la ciudad de San Quintín.

VARIABLES	VOLUNTARIOS SANOS(n=100)	PACIENTES EXPUESTOS (n=140)
Edad (años, intervalo)	24.18 (19-54)	33.61, (18-65)
Sexo (M/H %)	58.25/ 41.75	62.12/37.87
Lugar de residencia		
Centro de la comunidad agrícola	0%	73.59%
Alrededores de la villa	0%	24.47%

Tabla 5. Datos demográficos comparativos de los voluntarios no expuestos.

En cuanto al síndrome del farmer, los resultados se muestran en la tabla 6, la cual nos indica el porcentaje con respecto a la población de estudio.

Tiempo de exposición, (Hrs/semana)	47.37 ± 16.80
Síndrome del Farmer (%)	
Dolor de hombros	35.60
Dolor de espalda	54.54
Entumecimiento	37.12
Nocturia	20.45
Disnea	21.96
Insomnio	26.51
Mareos	35.60
Malestar abdominal	30.30
Hábitos de higiene	
Apreciación de la salud	18.18% Mala 25% Normal

	33.33% Regular 24.24% Buena
Baño	12.12% tercer día 87.88% Diario
Lavado de manos	8.33% A veces 91.67% Siempre
Lavado de frutas y verduras	20% A veces 80% Siempre
Lavado de ropa	27.5% Diario 72.5% Tercer día
Fuente de agua potable	100% Garrafón

Tabla 6. Datos sanitarios y de sintomatología “Síndrome del Farmer” presentado por los pacientes expuestos.

Los datos mostrados en la tabla 6, reflejan el tiempo de exposición o las jornadas de trabajo habituales a las que se someten los trabajadores del campo las cuales están alrededor de 47 horas por semana, esto indica una jornada laboral normal. En cuanto al síndrome del farmer, un porcentaje mayor se reflejó para el dolor de espalda, seguido de entumecimiento, mareo y dolor de hombros. Es posible sugerir que la exposición crónica a los pesticidas tiene como consecuencia el síntoma de dolor muscular como son el dolor de espalda y de los hombros, pero también debe tenerse en cuenta que los jornaleros cargan en su espalda, múltiples kilogramos de producto recolectado en los campos, además de las posturas que toman por varias horas al recolectar ciertos frutos.^{42,44} En cuanto a los hábitos de higiene, la mayoría de los voluntarios tienen apreciación regular de su salud, la mayoría, se baña diario, se lava las manos, lava siempre las frutas y verduras, lava cada tercer día su ropa y toma agua potable de garrafón.

DEPRESION	CONTROL (%)	PROBLEMA (%)	P
Se ha sentido decaído la mayor casi todos los días	19	25	0.00
Ha perdido el interés en la mayoría de las cosas	18	26.43	0.00
Disminuyó el apetito o aumentó el apetito, subió o bajó de peso $\pm$ 3.5 kg	12	20	0.00
Se sentía inquieto o tenía dificultad para permanecer tranquilo	14	18.57	0.00
La mayor parte del tiempo se siente fatigado o sin energía	17	26.43	0.00
Se sentía culpable o inútil	9	17.14	0.00
Periodos de más de dos semanas de sentirse deprimido	0	15	0.00
Periodo de dos meses sin depresión entre dos periodos depresivos	0	10.71	0.00

RIESGO SUICIDA	CONTROL	PROBLEMA	P
Ha pensado que estaría mejor muerto	8	24.29	0.00
Ha deseado estar muerto	8	22.86	0.00
Ha querido hacerse daño	5	22.86	0.00
Ha pensado en el suicidio	5	25.71	0.00
Ha planeado como suicidarse	1	14.29	0.00
Ha intentado suicidarse	0	11.43	0.00
Riesgo de suicidio leve	2	20	0.00
Riesgo de suicidio Moderado	3	32	0.00
Riesgo de suicidio alto	3	45	0.00

ANSIEDAD GENERALIZADA	CONTROL	PROBLEMA	P
Se ha sentido excesivamente preocupado o ansioso	32	22.14	0.01
Se presentan las preocupaciones casi todos los días	16	14.29	0.01
Le resulta difícil controlar las preocupaciones	17	15.71	0.01
Se sentía intranquilo o agitado	22	17.86	0.01
Se sentía tenso	27	17.86	0.01
Se sentía cansado o se agotaba fácilmente	28	15.71	0.01
Tenía dificultad para concentrarse	25	14.29	0.01
Se sentía irritable?	22	16.43	0.01
Tenía dificultad para dormir	32	10.71	0.00

Tabla 7. Algunas preguntas dentro de la entrevista cara a cara con el paciente para el diagnóstico de la situación psicológica del “Mini international neuropsychiatric interview”, los resultados se expresan en porcentaje.

Para el diagnóstico del trastorno neurológico de los pacientes, se utilizó el test diagnóstico “Mini international neuropsychiatric interview”⁴³ (Tabla 7) y de acuerdo con los resultados de la entrevista para el diagnóstico de depresión mayor con tendencia suicida, se determinó que el 26% de los pacientes expuestos entrevistados se sienten fatigados o sin energía, también se han sentido decaídos la mayor parte del tiempo y han perdido el interés por la mayoría de las cosas. Para determinar el riesgo suicida el 25% de los pacientes entrevistados respondieron que han pensado en el suicidio. En menor porcentaje los pacientes han intentado suicidarse, representado con un 15% de riesgo de suicidio moderado.

Para determinar el diagnóstico de ansiedad generalizada, el 22% de los pacientes entrevistados sostuvieron sentirse extremadamente preocupados y el 17% de los pacientes sostuvieron sentirse inquietos, intranquilos y agitados.

Con los resultados anteriores se pudo diagnosticar la situación psiquiátrica de los pacientes expuestos y no expuestos dando como resultado la siguiente Tabla 8.

Los datos obtenidos del diagnóstico psiquiátrico de los voluntarios expuestos y los voluntarios no expuestos revelaron una diferencia significativa representada principalmente por pacientes expuestos con depresión mayor, ansiedad y riesgo

suicida, en cuanto a la ansiedad generalizada del lado de los pacientes no expuestos cabe destacar el entorno de los voluntarios sanos los cuales un 98% eran estudiantes universitarios, con presiones escolares y algunos con problemas sociales que se presentan en edades cortas en las ciudades.

SINTOMA NEUROLÓGICO	%VOLUNTARIOS EXPUESTOS (n=140)	%VOLUNTARIOS NO EXPUESTOS (n=100)
Depresión mayor	14.29	3
Ansiedad generalizada	14.29	18
Depresión mayor con riesgo suicida además ansiedad	31.43	8
Depresión y ansiedad	14.29	7
Ningún síntoma	25.70	64

Tabla 8. Diagnóstico de la situación psiquiátrica de los voluntarios expuestos y no expuestos.

Se puede notar que la mayoría de los voluntarios presentan trastornos neurológicos sin embargo solo en uno de los casos el porcentaje de los voluntarios con una respuesta positiva se presenta en el cuadro de ansiedad generalizada. Aun así, los voluntarios expuestos revelan mayores problemas neurológicos sin una razón de entorno social aparente, lo que nos lleva a sospechar el lado laboral.

IV.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los pacientes expuestos a los plaguicidas, todos trabajadores del campo mostraron un patrón de inhibición próximo al 22% de la actividad enzimática, como se puede mostrar en la tabla 9 los voluntarios expuestos muestran una actividad

enzimática reducida significativamente de 43 mE/min en comparación de los voluntarios control los cuales presentan una diferencia del 20% en la actividad.

Los datos arrojados por los controles presentaron una inhibición prácticamente nula de la enzima estudiada, se puede decir que los alimentos consumidos hortofrutícolas pudieron influir en la inhibición presentada por los controles ya que es bien sabido que los alimentos de este tipo absorben el pesticida organofosforado por la raíz, las hojas y las ramas, o simplemente por una condición genética, sin embargo, no presentan una inhibición significativa.

VOLUNTARIOS NO EXPUESTOS (CONTROL)				
EDAD (años)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (mE/min)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA mU/μLHb	ACTIVIDAD %	INHIBICIÓN %
24.18 ± 9.87	226 ± 28	543.58 ± 93.15	96.94 ± 12.26	3.06 ± 12.26
VOLUNTARIOS EXPUESTOS				
33.61 ± 11.63	183 ± 36	427.73 ± 142.55	77.75 ± 15.80	22.25 ± 15.80

Tabla 9. Promedios de cada uno de los parámetros analíticos en voluntarios expuestos y no expuestos. (Controles).

	Depresión Mayor	Ansiedad generalizada	Depresión con riesgo suicida	Depresión y ansiedad	Ningún síntoma
Edad	27 ± 7.20	35.40 ± 10.22	30.91 ± 9.26	33.50 ± 8.29	34.8 ± 16.6
Actividad (mE/min)	181.85 ± 23.47	177.48 ± 40.96	174.89 ± 33.35	178.23 ± 50.03	182.54 ± 43.29
Actividad E (mU/uL Hb)	436 ± 88.01	388.62± 92.50	414.34± 96.17	421.66.62± 109.19	426.27± 113.61
% Actividad	77.94 ± 9.97	76.09 ± 17.40	74.99 ± 14.17	76.40 ± 21.26	78.24 ± 18.39
% Inhibición	22.06 ± 9.97	23.91 ± 17.40	25.01 ± 14.17	23.60 ± 21.26	21.76 ± 18.39

Tabla 10. Datos de actividad enzimática de los voluntarios expuestos. Todos los datos se muestran con su promedio de cada grupo de síntoma neurológico y su desviación estándar.

Los datos reflejados en la tabla 10 revelan la influencia de la inhibición enzimática la cual se mantuvo en un rango promedio en cada uno de los desórdenes neurológicos investigados, el riesgo suicida demostró tener el mayor grado de inhibición al ser uno de los puntos más delicados de la investigación puesto que este representa un grado de depresión severo en los voluntarios expuestos que desencadena pensamientos y deseos de suicidarse lo cual capta la atención como uno de las consecuencias más graves neurológicas en la intoxicación por OP, sin embargo no se minimiza las primeras etapas que conllevan al pensamiento suicida como lo son la depresión y ansiedad en los voluntarios.

CAPITULO V
CONCLUSIÓN

Se logró determinar el grado de inhibición de acetilcolinesterasa mediante el ensayo de Ellman modificado en los voluntarios expuestos a OP de la población rural en San Quintín B.C. Donde se demostró que el porcentaje de inhibición presentado era alto.

La tendencia suicida por otro lado representó un porcentaje alarmante de incidencia en los trabajadores rurales de la investigación realizada siendo al mismo tiempo el porcentaje de inhibición más alto en comparación con la depresión y ansiedad aislada.

Al comparar los datos de la actividad enzimática de los controles y los pacientes expuestos se obtuvo una notable diferencia entre uno y otro, los datos de actividad enzimática se mantuvieron altos en los datos control al igual que se obtuvo una notable deficiencia de actividad en los datos de los pacientes expuestos.

Queda destacar que uno de los datos más significativos para poder llevar a cabo el método de Ellman modificado y procesar los datos obtenidos fue la hemoglobina de cada voluntario y paciente, este dato varía dependiendo del sexo y la edad sin embargo todos los datos obtenidos estuvieron dentro del rango normal en los voluntarios y controles.

Todos los datos obtenidos revelan una estrecha relación de los trastornos neurológicos y la exposición crónica a los pesticidas organofosforados y carbamatos, debido a las largas horas que permanecen en contacto con los pesticidas y lo fácil de contaminarse ya que tienen una persistencia medioambiental. Son altamente

liposolubles lo que les permite entrar al cuerpo humano sin problema alguno, por lo que la reactivación enzimática promete ser una solución de bajo costo más asequibles⁴⁹ al igual que mejoraría la vida del trabajador rural los cuales ignoran los estragos que pueden causar los pesticidas a su salud mental y salud general.^{44,42}

Los cuadros de intoxicación con organofosforados constituyen un problema serio de salud pública en diversas partes del mundo incluyendo Baja California lo que lo hace un problema no ajeno a nuestra población. Durante las entrevistas realizadas a los jornaleros se reveló que no conocían el tipo de organofosforado que se utilizaban en los sembradíos, al igual que desconocían los efectos adversos de los mismos, la única información con la que contaban era que las soluciones que se manejaban en los sembradíos eran mezclas, no un solo químico.⁴²

La información presentada en este trabajo revela la relación con la inhibición de la acetilcolinesterasa y los desórdenes neurológicos en una población rural además de revelar la falta de información de los trabajadores del campo respecto a trabajar en un ambiente rodeado de químicos dañinos para la salud, y cómo poder contrarrestar los efectos adversos de la intoxicación. Hace falta equipo de protección para los trabajadores del campo de Baja California, así como brindarles información para proteger su salud, en uno de los trabajos más antiguos de la civilización y uno de los más desvalorados para los trabajadores que ejercen esta labor en la actualidad, la intoxicación por organofosforados podría minimizarse si se canaliza correctamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Geneva,Switzerland: WHO; 1990.
2. Zhang J, Stewart R, Phillips M, Shi Q, Prince M. Pesticide exposure and suicidal ideation in rural communities in Zhejiang province, China. Bull World Health Org. 2009;87(10):745–53.
3. Ye M, Beach J, Martin JW, Senthilselvan A. Associations between dietary factors and urinary concentrations of organophosphate and pyrethroid metabolites in a Canadian general population. Int J Hyg Environ Health. 2015;218(7):616–26.
4. Cohen Hubal EA, Sheldon LS, Burke JM, McCurdy TR, Berry MR, Rigas ML, et al. Children's exposure assessment: a review of factors influencing Children's exposure, and the data available to characterize and assess that exposure. Environ Health Perspect. 2000;108(6):475–86.

5. Ross SM, McManus IC, Harrison V, Mason O. Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(1):21–44.
6. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lour des Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):85–103.
7. Bouchard MF, Bellinger DC, Wright RO, Weisskopf MG. Attention deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics.* 2010;125(6):1270–7.
8. Casarett et al. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 4th Ed. In: Klassen CD, Amdur MO, Doull J. Macmillan Publishing, New York, 1995.
9. Radić Z., Dale T., Kovarik Z., Berend S., Garcia E., Zhang L., Amitai G., Green C., Radić B., Duggan B., Ajami D., Rebek J. and Taylor P. Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by

butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochem. J.*; **2013**, 450:1, 231-242

10.JJ Oliveira-Silva, SR Alves , AF Inaci , A Meyer , P de N Sarcinelli, R de C Mattos, M de FA Ferreira, JC Cunha and JC Moreira. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Hum Exp Toxicol* 2000 19: 173-177.

11.Franz Worek, Ulrike Mast, Daniela Kiderlen, Christine Diepold, Peter Eyer. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 1999,288,73-90.

12.Ellman G.L., Courtney K., Andres V. and Featherstone R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*; **1961**, 2:7, 88-95

13.Vesile A, Fevziye BS, Recep S, Ibrahim E, Imran KO. The Red Blood Cell Acetylcholinesterase Levels of Depressive Patients with Suicidal Behavior in an Agricultural Area

14.- John Unsworth (2010).History of pesticide use. International union of pure and applied chemistry(iupac)

15.- Promexico, secretaria de economía, baja california sur (2015) why invest in Baja California Baja california sur.

16.- SAGARPA (2009), monitor agroquímico 2009 del estado de baja california, gobierno federal, subsecretaria de fomento de los agronegocios.

17. - Freire, C., Koifman, S., 2013. Pesticides, depression and suicide: a systematic review Of the epidemiological evidence. Int. J. Hyg. Environ. Health 216, 445–460

18. - Y. Joo, S. Roh, Risk factors associated with depression and suicidal ideation in a rural population Environ. Health Toxicol., 31 (2016), p. e2016018

19. - D.R. Williams, H.M. Gonzalez, H. Neighbors, R. Nesse, J.M. Abelson, J. Sweetman, J.S. Jackson; Prevalence and distribution of major depressive disorder in African Americans, Caribbean blacks, and non-Hispanic whites: results from the National Survey of American Life.

20.- T.B. Ustun, J.L. Ayuso-Mateos, S. Chatterji, C. Mathers, C.J. Murray; Global burden of depressive disorders in the year 2000 Br. J. Psychiatry, 184 (2004), pp. 386-392

21.- N.M. Faria, A.G. Fassa, R.D. Meucci, N.S. Fiori, V.I. Miranda; Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil Neurotoxicology, 45 (2014), pp. 347-354

22.-S.B. koh, T.H. Kim, S. Min, K. Lee, D. R. Kang, J. R. Choi, Exposure to pesticide as a risk factor for depression: A population-based longitudinal study in Korea, 62(2017), pp. 181-185

23. - M.J. Filteau, Y.D. Lapierre, D. Bakish, A. Blanchard; Reduction in suicidal ideation with SSRIs: a review of 459 depressed patients, Journal of Psychiatry and Neuroscience, 18 (3) (1993), p. 114

24. - E.D. Ballard, A.B. Patel, M. Ward, D.A. Lamis; Future disposition and suicidal ideation: Mediation by depressive symptom clusters, Journal of Affective Disorders, 170 (2015), pp. 1–6

25.- J.G. Keilp, M.F. Grunebaum, M. Gorlyn, S. LeBlanc, A.K. Burke, H. Galfalvy, M.A. Oquendo, J.J. Mann; Suicidal ideation and the subjective aspects of depression, Journal of Affective Disorders, 140 (1) (2012), pp. 75–81

26.-Organizacion mundial de la salud; ¿Qué son los trastornos neurológicos?, (2016) OMS, <http://www.who.int/features/qa/55/es/>

27.- B.G. Katzung, S.B. Masters, A. J. Trevor; Basic & Clinical pharmacology, McGrawHill(2012) , 12 pp.1-151,359

- 28.- A.Sykam,V.R. Gutlapalli, S.P. Tenali, A.K. Meena, P. Chandra, S. Suneetha, L. M. Suneetha; Anticeramide antibody and butyrylcholinesterase in peripheral neuropathies,(2017) pp.1-2
29. - Silver A. The Biology of Cholinesterases. North-Holland Pub. Co.; 1974.
30. - Balasubramanian AS, Bhanumathy CD. Noncholinergic functions of cholinesterases. FASEB J 1993; 7:1354–8.
31. - Mack A, Robitzki A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. Prog Neurobiol 2000; 60:607–28.
32. - Sáez-Valero J, Small DH. Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. Brain Res 2001; 889:247–50.
33. - Derleme Ekim Y. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. Structure 2003; 28:54–61 [Review Article].

34. - Suneetha LM, Karunakar V, Mehervani, et al. Serum butyrylcholinesterase activity in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004; 72:324–6.

35.-R.P. Rothlin; *Farmacologia I, Colinergicos y Anticolinergicos* (2003) pp.4-6

36.- Marruecos-Sant, L, & Martín-Rubí, JC. (2007). Uso de oximas en la intoxicación por organofosforados. *Medicina Intensiva*, 31(5), 258-260.

37.- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., & Eyer, P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 288(1), 73-90.

38.- Sussman, J. L. Harel, M., Frolow, F. et al. *science* 253.872, 1991 American Association for the Advancement of Science.

39.-UAH(2006) Mecanismo de accion de la AChEasa. *Bioquímica ambiental*,12(1),1-5

- 40.- Janowsky D; El-Yousef, Khaled; Davis, John. Acetilcolina y Depresión, psychosomatic medicine; 1974, 36-3;24-257
- 41.- david S. janowaky, M.D, (1990)Cholinergic dysfunction in depression,university of north Carolina,100:110
- 42.- Lourdes C., Christine A., Evarista A., Erika Z., Concepción M. (2013)AGROQUÍMICOS Y MUJERES INDÍGENAS JORNALERAS EN BAJA CALIFORNIA, 9:12
- 43.- D. Sheehan, J. Janavs,R. Baker,K.Harnett-Sheehan, E.Knapp, M. Sheehan, (2000)MINI INTERNATIONAL NEUROPSYCHIATRIC INTERVIEW, florida University
- 44.- Manninen, P., Riihimäki, H., & Heliövaara, M. (1995). Incidence and risk factors of low-back pain in middle-aged farmers. *Occupational medicine*, 45(3), 141-146.
- 45.-Pub Chem, Acetylcholine, U.S national library of medicine, national center for biotechnology information(2015)
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetylcholine>
- 46.- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3), 10–22. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>

47.- OPS. Situación Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas en el Istmo Centroamericano, 1992-2000. Boletín Epidemiológico 2002; 23(3).

48.- Hurtado Clavijo, Carlos Mauricio, & Gutiérrez de Salazar, Myriam. (2005). ENFOQUE DEL PACIENTE CON INTOXICACIÓN AGUDA POR PLAGUICIDAS ORGANOS FOSFORADOS. Revista de la Facultad de Medicina, 53(4), 244-258. Retrieved March 13, 2018, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000400006&lng=en&tlng=es.

49.-Sophia B., Pamela T., Ankur D., Veronica C., Hannah K., Thommey P., James R., Seok K., Desing and mechanistic investigation of oxime-conjugated PAMAM dendrimers as the catalytic scavenger of reactive organophosphate,(2014) Royal society of chemistry 6(11).

50.- Benitez-Leite, Luisa Macchi, Matilde Acosta, Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos, Archivos de Pediatría del Uruguay 2009; 80 (3)

ANEXOS



Anexo 1. Entrevista cara a cara con los trabajadores rurales.



Anexo 2. Equipo de investigación durante la prestación de servicios en el viaje de estudios San Quintín B. C.