



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

“Estudio del deterioro cognitivo y su correlación con la actividad enzimática de las colinesterasas en poblaciones rurales del noroeste de Baja California”

TESIS

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Presenta

Andrea Vanessa Martínez Tamés

Directora de tesis:

Dra. Aracely Serrano Medina

Tijuana, Baja California, mayo de 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

FOLIO No. 061

Tijuana, Baja California, a 18 de abril de 2024

C. ANDREA VANESSA MARTÍNEZ TAMÉS
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTE:

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la opción de **Tesis** es propuesto por la **Dra. Aracely Serrano Medina** quien será la responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema; "**Estudio del deterioro cognitivo y su correlación con la actividad enzimática de las colinesterasas en poblaciones rurales del noroeste de Baja California**", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

RESUMEN

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES
- III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIONES
- VI. TRABAJO A FUTURO
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
- VIII. APÉNDICES

Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director

Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

Dedicatoria:

A mis papás, Andrés Alfredo Martínez Velasco y Laura Vanessa Tamés González quienes me formaron con fe y todo el amor de este mundo, brindándome su apoyo en mis momentos más difíciles para seguir adelante y siempre dar lo mejor de mí. Gracias por siempre creer en mí y apoyarme en cada una de las metas que me proponía por más locas que se escucharan. Gracias por siempre estar para mí, todo lo que he logrado ha sido por y para ustedes.

A toda mi familia, en especial a mi abuelo, Luis Tamés León, gracias por ser mi más grande inspiración y mi ejemplo para seguir y a mi abuela, Laura González Ibarra, gracias por todo tu amor incondicional y tus cuidados, mis tías, Laura Jessica Tamés González, Laura Lizette Tamés González, Laura Luciana Tamés González y tío, Luis Tamés González, así como a mis primos, todos ellos son mi más grande motor.

Mis mejores amigos, Alen Silva Rodríguez, Grecia Figueroa Vázquez, Krysta Carranza Ambriz, Mariana Navarro Barraza, Melissa Castel Aguilar, Paulina Araiza Arredondo, Renata Burnett, Sofía Álvarez Rocha y Valeria Flores Gutiérrez por siempre estar para mí y todo su apoyo incondicional.

Agradecimientos institucionales:

Agradezco el apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de Baja California a través de los siguientes medios: la 23ª Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación, por la beca otorgada durante el año 2023. Asimismo, agradezco a la Facultad de Medicina y Psicología por permitirme realizar mi proyecto en sus laboratorios, así como a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por apoyar en el viaje de estudios. Por último, expreso mi gratitud al Rancho Los Pinos en el municipio de San Quintín, Baja California, por permitirnos colaborar en sus jornadas de salud.

Agradecimientos Personales:

A mi directora de tesis, la doctora Aracely Serrano Medina por toda su paciencia, dedicación y compromiso ya que sin ella esta investigación no hubiera sido posible.

Así como a mi equipo de trabajo, QFB Yahaira Anette Hidalgo, Dra. Krysta Carranza Ambriz, y a todos los estudiantes de la facultad de ciencias químicas e ingeniería que me apoyaron en los viajes realizados a San Quintín, así como los docentes que participaron en cada uno de los viajes.

A mi comité de tesis integrado por el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, la Dra. Ayla Vea Barragán y la Dra. Hévila González Castañeda.

A mis colegas y amigas del alma Melissa Castel Aguilar, Alexandra Quiroz Macías, Carmen Serena Hernández y Zarema Araujo quienes me apoyaron durante todo este proceso de investigación.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice.....	iii
Lista de símbolos y abreviaturas.....	v
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
I. 1 Antecedentes.....	3
I. 2 Justificación.....	7
I. 3 Hipótesis.....	8
I. 4 Objetivo general.....	8
I. 4.1 Objetivos específicos	9
CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL.....	10
II.1 Exposición a pesticidas.....	11
II.2 Tipos de pesticidas: OPs, carbamatos.....	12
II.3 Sistema nervioso colinérgico.....	15
II.4 Neurotransmisión colinérgica.....	16
II.5 Neurotransmisión colinérgica en memoria y cognición.....	16
II.6 Acetilcolinesterasas.....	17
II.7 Actividad enzimática AChE.....	18
II.8 Actividad enzimática de BChE colinesterasas Wiener Lab.....	20
CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL.....	22

III. 1 Equipos y reactivos.....	23
III. 2 Metodología.....	23
III.2.1 Diseño del estudio.....	23
III.2.2 Criterios de inclusión y exclusión	24
III.2.3 Declaración ética	25
III.2.4 Recolección de datos.....	25
III.2.5 Evaluaciones neuropsicológicas.....	26
III.2.6 Recolección y preparación de muestras.....	27
III.2.7 Determinación de la actividad enzimática (AChE).....	28
III.2.8 Determinación de la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa (BChE)	28
III.2.9 Determinación de la hemoglobina total.....	28
III.2.10 Evaluación de marcadores bioquímicos.....	29
III.2.11 Análisis Estadístico.....	29
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CAPÍTULO V CONCLUSIONES.....	43
CAPÍTULO VI TRABAJO FUTURO.....	46
CAPÍTULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO VIII APÉNDICES.....	51
Apéndice 1. Acetylcholinesterase Activity Assay Kit.....	52

Lista de símbolos y abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
TMSE	Examen del Estado Mental Tailandés
AChE	Acetilcolinesterasa
BChE	Butirilcolinesterasa
EE	Exposición ambiental
OE	Exposición ocupacional
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
mAChR	Receptores muscarínicos
nAChR	Receptores nicotínicos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
MoCA	Evaluación Cognitiva de Montreal
TMT	Trail Making Test
K ₂ EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético dipotásico
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
ANOVA	Analysis of Variance
ED	Expuestos directamente
EI	Expuestos indirectamente
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
GGT	Gamma-glutamil transferasa
LDH	Lactato deshidrogenasa

Hb	Hemoglobina
Hto	Hematocrito
PLT	Plaquetas
ALP	Fosfatasa alcalina

Lista de tablas

Tabla 1. Variables sociodemográficas de la población estudiada.....	32
Tabla 2. Deterioro cognitivo.....	32
Tabla 3. Datos comparativos de los distintos grados de deterioro cognitivo medidos por los test TMT A para evaluar la atención selectiva, coordinación psicomotora y velocidad de procesamiento visual. TMT B para evaluar la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva.....	33
Tabla 4. Bioquímica clínica de la población estudiada. Los datos se representan en frecuencia y porcentaje.....	35
Tabla 5. Serie roja.....	37
Tabla 6. La actividad de la AChE y BChE enzimas en la población estudiada.....	38
Tabla 7. Correlaciones de las colinesterasas entre los distintos parámetros evaluados..	40

Lista de figuras

Figura 1. Gráfica de intoxicación por dimetoato (A) y por fentiión (B).....	6
Figura 2. Fórmula general de organofosforados.....	13
Figura 3. Papel fisiológico (a) e interacción de la acetilcolinesterasa (AChE) y otras esterasas (E) con compuestos organofosforados (b) y carbamato (c).....	14
Figura 4. Goodman y Gilman. Pasos implicados en la hidrólisis de la ACh por AChE y en la inhibición y reactivación de la enzima.....	20

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Se considera que la intoxicación con pesticidas organofosforados es un problema de salud pública mundial de gran importancia en el cual existe más vulnerabilidad en los países en vías de desarrollo. A pesar de que existen diversos tipos de pesticidas el grupo de los organofosforados es ampliamente utilizado en actividades agrícolas, esto gracias a su buen control de insectos debido a su alta toxicidad y persistencia moderada en el ambiente (Jaramillo-Colorado et al., 2016).

México es uno de los países considerados en tener el mayor consumo de plaguicidas en América Latina, de los cuales los pesticidas organofosforados son los que predominan teniendo un efecto nocivo para la salud. Las vías de intoxicación incluyen la vía oral, inhalación, absorción cutánea, así como la ingesta de alimentos que contengan residuos de pesticidas.

Los agentes organofosforados inhiben la acción de la acetilcolinesterasa sobre la sinapsis hística muscarínica y nicotínica, esto se realiza mediante el depósito de un grupo fosforilo en el centro de actividad de la enzima. Esta inhibición promueve la acumulación excesiva de acetilcolina y como consecuencia hay una sobreestimulación de los receptores colinérgicos. En las sinapsis colinérgicas, la acetilcolinesterasa anclada a la membrana postsináptica desempeña un papel crucial como un regulador que controla la transmisión colinérgica. Los agentes organofosforados inhiben las enzimas esterases, principalmente la acetilcolinesterasa de las sinapsis y membrana de los glóbulos rojos, así como la butirilcolinesterasa plasmática. La identificación de la intoxicación por organofosforados se basa principalmente en evaluaciones clínicas; no obstante, se recomienda confirmarla mediante la medición de la actividad de la butirilcolinesterasa plasmática o la acetilcolinesterasa en los glóbulos rojos. Cuando los valores de la

actividad de las colinesterasas se sitúan por debajo del 80% del rango menor de referencia, es muy sugestivo de exposición significativa a un pesticida organofosforado (Cabrera Ortiz & Varela Rodríguez, 2009).

A pesar de que en el caso de las intoxicaciones agudas los síntomas son muy característicos, la exposición prolongada a concentraciones subclínicas se considera que es una problemática en la cual se tienen que tomar otras medidas preventivas ya que esta se asocia a deterioro cognitivo, alteraciones reproductivas, cáncer, diabetes, alteraciones neuroconductuales y del neurodesarrollo, malformaciones congénitas y enfermedades cardiovasculares, respiratorias y neurodegenerativas, como el Parkinson y el Alzheimer, entre otras (Zúñiga-Venegas et al., 2021).

I. 1 Antecedentes:

La OMS estima que la incidencia de intoxicaciones por pesticidas en los países en desarrollo se ha duplicado durante los últimos 10 años. En 1982 se estimó que los países en desarrollo representaban sólo el 15% del uso mundial de plaguicidas y que más del 50% de los casos de intoxicación por plaguicidas ocurrieron en estos países debido a su mal uso, sin embargo, las implicaciones de los residuos de pesticidas en el estado de la salud humana aún no se han documentado exhaustivamente (Abdollahi et al., 2004).

Se realizó una investigación en Ecuador en la cual se tomaron 95 muestras a trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas (carbamatos y organofosforados), en la cual se encontró que un 42 % de ellos presentaron niveles de actividad de la colinesterasa eritrocitaria por debajo de los valores normales ya que el valor medio de

actividad de la colinesterasa eritrocitaria de los agricultores expuestos a plaguicidas fue de 3154,99 U/L, mientras que del grupo de control 3625,41 U/L, reflejando una diferencia significativa entre los dos grupos existiendo una inhibición provocada por los compuestos de dichos plaguicidas afectando el nivel de la actividad de las colinesterasas (Vista de Determinación de Colinesterasa Eritrocitaria En Trabajadores Agrícolas Expuestos a Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos, n.d.).

Se han realizado estudios para correlacionar la exposición a pesticidas organofosforados y los daños fisiológicos que estos puedan llegar a causar midiendo los valores de las colinesterasas (acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa) por el método de Ellman, tales como estudios de enfermedades metabólicas que se han ligado a personas con una exposición aguda a pesticidas del grupo organoclorado principalmente, sin embargo no en muchos estudios se le ha dado el enfoque del deterioro cognitivo que estos pesticidas pueden causar en los agricultores que se encuentran expuestos directamente. Más del 80% de los pesticidas utilizados en el mundo son organofosforados.

Se realizó un estudio llevado a cabo en Tailandia, se analizó a un total de 98 participantes, a quienes se les tomó muestras de sangre con el fin de investigar la posible correlación entre los niveles de colinesterasas y el deterioro cognitivo. Para evaluar este último, se utilizó el Examen del Estado Mental Tailandés (TMSE), reconocido como el cuestionario principal para esta evaluación en dicho país. Los resultados obtenidos revelaron que los agricultores presentaron puntuaciones más bajas en el TMSE en comparación con aquellos que no se dedicaban a la agricultura, sugiriendo una asociación positiva entre el deterioro cognitivo y el empleo en el sector agrícola.

Asimismo, se observó una correlación positiva entre la baja actividad de la acetilcolinesterasa y el deterioro cognitivo en la muestra estudiada. Por otra parte, se señaló la relación directa entre los efectos tóxicos de los pesticidas organofosforados y la enfermedad de Alzheimer. Estos pesticidas parecen incrementar la formación de radicales libres y desequilibrar las proteínas, así como alterar la capacidad de las membranas mitocondriales para liberar citocromo C, activar la producción de ceramidas e incrementar los niveles de calcio intracelular, y activar las calpaínas. Todos estos procesos podrían desembocar en apoptosis neuronal y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Anurak et al., 2023).

Determinados pesticidas organofosforados tienen un efecto inhibitor más específico sobre la BChE que sobre la AChE, sin embargo, una mayor exposición a diversos pesticidas organofosforados y carbamatos, cuando estos se cuantifican por intensidad y duración, está altamente correlacionada con la inhibición de BChE. Sin embargo, la inhibición de BChE no se corresponde directamente con los efectos biológicos de los organofosforados sobre el sistema nervioso. En el caso de exposición crónica a organofosforados, la inhibición de AChE es más sensible que la inhibición de BChE (Anurak et al., 2023).

Por otro lado, se ha señalado que la disminución de la actividad de AChE es un rasgo característico principal y un marcador biológico esencial de la exposición a organofosforados en estudios previos. Cuando los compuestos organofosforados se unen a la colinesterasa y bloquean su hidrólisis, habrá una rápida acumulación de la colinesterasa que resulta en síntomas neurológicos (pérdida de coordinación, convulsiones, parálisis y posiblemente la muerte) (Abdollahi et al., 2004).

Aunque la inhibición de la butirilcolinesterasa no ha demostrado inducir manifestaciones clínicas, puede emplearse como un indicador sensible de exposición a la mayoría de los compuestos organofosforados y otros agentes inhibidores de la colinesterasa. Resulta útil para evaluar la eliminación del pesticida del cuerpo (Cabrera Ortiz & Varela Rodríguez, 2009).

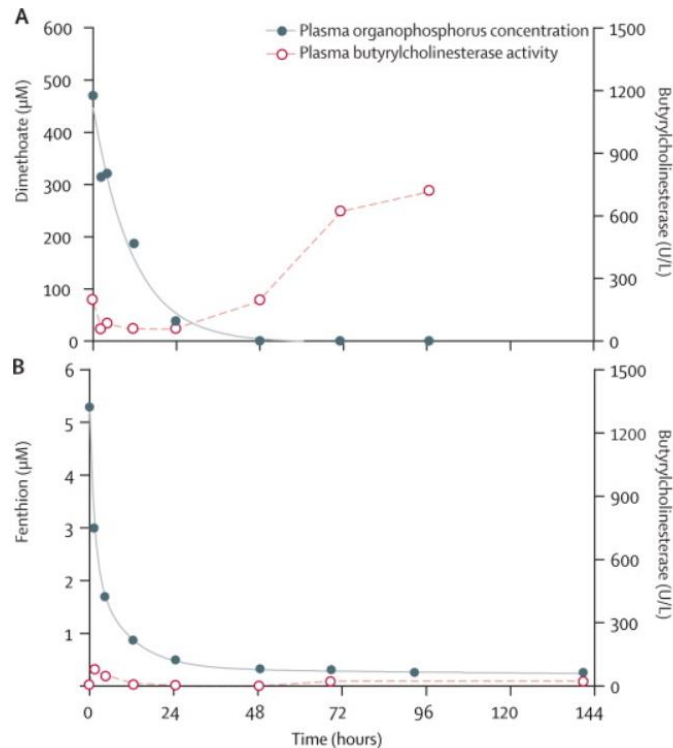


Figura 1. Gráfica de intoxicación por dimetoato (A) y por fentión (B).

El dimetoato es hidrófilo y se excreta rápidamente del cuerpo. Por lo tanto, la actividad de la butirilcolinesterasa plasmática comienza a aumentar nuevamente dos días después de la ingestión. Por el contrario, el fentión es soluble en grasa y se redistribuye lentamente en la sangre después de la distribución inicial en la grasa. Como resultado, el fentión es detectable en la sangre durante muchos días y la actividad de la butirilcolinesterasa permanece inhibida igualmente (Eddleston et al., 2008).

Se realizó un estudio en Chile en cual se reclutó a 156 participantes de los cuales 78 pertenecían al grupo de exposición ambiental (EE) y los 78 restantes al grupo con exposición ocupacional (OE), la asociación entre los biomarcadores de efecto biológico y el deterioro cognitivo persistió entre el grupo de EE después de eliminar los factores de confusión.

En el grupo de expuestos ambientalmente, se observó una conexión significativa entre la inhibición de al menos el 30% de la actividad enzimática de la BChE y una reducción del 10% o más en el rendimiento en diversas pruebas que evaluaron seis de las ocho áreas cognitivas. En cuanto a la inhibición de la AChE en este grupo de exposición ambiental, se encontró una asociación significativa en tres pruebas que evaluaron la atención y una relacionada con la función ejecutiva. Por otro lado, en el grupo de exposición ocupacional, la inhibición de la BChE en un 30% o más se asoció con un bajo rendimiento en una prueba de atención, mientras que la superación del estándar para la AChE se relacionó con un rendimiento disminuido en pruebas de memoria y atención, respectivamente (Ramírez-Santana et al., 2020).

I.2 Justificación:

Estudios anteriores han demostrado que la exposición a pesticidas organofosforados está directamente relacionada con el deterioro cognitivo, sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúen el impacto que estos tienen en el desempeño cognitivo de los agricultores expuestos directamente, así como de los residentes del área agrícola.

La exposición crónica a pesticidas organofosforados en México se ha convertido en una problemática de salud pública de gran importancia, existiendo un incremento considerable en la incidencia de intoxicaciones crónicas al noroeste del país por lo que se necesitan tomar medidas para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Se requiere que se brinde la educación necesaria y la concientización sobre la repercusión que estos pueden llegar a causar en la salud de las personas de por vida ya que en la mayoría de los casos los agricultores no utilizan el equipo adecuado para su protección o no hay un correcto manejo del material utilizado posterior al rocío de estos pesticidas por la falta de información sobre el tema.

La exposición crónica que se presenta a estos compuestos está asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas y neurológicas a nivel mundial.

Es de gran relevancia realizar investigaciones y proyectos para recaudar más información sobre este tema y de esta forma plantear políticas y medidas a favor de los trabajadores agrícolas de nuestro país.

I.3 Hipótesis:

La exposición crónica directa y la exposición crónica indirecta a pesticidas organofosforados están asociados con el deterioro cognitivo una manifestación temprana de enfermedades neurodegenerativas debido a la inhibición de la actividad enzimática de las colinesterasas.

I.4 Objetivo general:

En este estudio se determinarán los impactos cognitivos que derivan de la exposición directa a pesticidas organofosforados, específicamente de los trabajadores agrícolas que se encuentran laborando en la ciudad de San Quintín, Baja California. Así como también de la población expuesta indirectamente, es decir, residentes del área agrícola. Los valores obtenidos se correlacionarán con la actividad enzimática de las colinesterasas y los metabolitos de los pesticidas organofosforados.

I.4.1 Objetivos específicos:

- Determinar el grado de deterioro cognitivo mediante instrumentos neuropsicológicos en voluntarios de poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa para determinar el grado de inhibición mediante kit comercial en voluntarios de poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa mediante un ensayo colorimétrico para determinar el grado de contaminación de los voluntarios.
- Determinar la serie roja de cada paciente mediante citometría de flujo para determinar la actividad específica de la acetilcolinesterasa.
- Obtener el perfil bioquímico de todos los voluntarios expuestos directa e indirectamente.
- Realización de análisis estadísticos correlacionando el impacto ambiental entre los dos grupos poblacionales mediante la correlación de los resultados de las evaluaciones de cognición con la actividad enzimática de las colinesterasas junto con los valores de la bioquímica clínica de los agricultores y la serie roja.

CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL

II.1 Exposición a pesticidas:

Actualmente, se utilizan numerosos tipos de pesticidas en la agricultura con el propósito de prevenir, controlar o eliminar plagas. Entre ellos, los pesticidas organofosforados son ampliamente utilizados siendo de los más tóxicos y de uso común. Estos afectan al ser humano al llevar a cabo la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas del cerebro y el sistema nervioso y por consecuencia, se desencadena una reducción en la actividad de dicha enzima generando síntomas de intoxicación. La fosforilación de la acetilcolinesterasa interfiere con la degradación normal de la acetilcolina, el cual es un neurotransmisor en las sinapsis nerviosas. La acumulación que se origine de acetilcolina puede provocar una sobreestimulación de las terminaciones nerviosas, manifestándose en diversos síntomas como mareos, debilidad, problemas respiratorios y otros efectos adversos para la salud.

En relación con el efecto tóxico de este tipo de pesticidas, es fundamental señalar que se caracterizan por inducir diversas uniones, muchas veces irreversibles, de los radicales fosfatos (fosforilación) a los sitios activos de las enzimas teniendo como consecuencia cambios estructurales y funcionales que impactan negativamente en su actividad normal (Cuaspué & Vargas, n.d.).

Los pesticidas organofosforados pueden ocasionar deterioro cognitivo mediante la estimulación colinérgica neurotóxica o mediante la inducción de inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en el sistema nervioso, entre otros mecanismos neuropatológicos (Paul et al., 2017).

Estos pesticidas provocan una disminución en la actividad de la colinesterasa a nivel plasmático y eritrocitario. Sin embargo, el nivel de la colinesterasa plasmática se recupera con rapidez, generalmente entre 15 y 30 días, mientras que el nivel de colinesterasa eritrocitaria puede tomar alrededor de 90 días en promedio para restablecerse. Es importante destacar que la actividad de la colinesterasa plasmática también puede estar reducida en pacientes con hepatitis crónica, cirrosis u otras enfermedades hepáticas, así como en casos de consumo de drogas (INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS, 2010).

II.2 Tipos de pesticidas: OPs, carbamatos:

Incluso antes de la segunda guerra mundial ya se utilizaban los compuestos organofosforados como insecticidas agrícolas. Sin embargo, su potencial toxicidad y capacidad para inactivar de manera "irreversible" la enzima acetilcolinesterasa (AChE) los convirtieron también en candidatos para su uso como agentes en la guerra química Brunton, L. L. (2018). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13th ed.). McGraw-Hill Interamericana. <https://uabc.vitalsource.com/books/9781456263577> pág. 164.

La fórmula general de estos compuestos incluye varios grupos que son importantes para su actividad:

Grupo A (grupo saliente): Puede ser un halógeno (como cloro), cianuro o tiocianato. Este grupo puede facilitar la unión del compuesto al sitio activo de la acetilcolinesterasa. Grupo B (grupo saliente de alquilo, alcoxi o ariloxi): Este grupo también influye en la interacción del compuesto con la acetilcolinesterasa y puede afectar

su actividad. Grupo C (compuestos de tionofósforo o titionofósforo): Contiene átomos de fósforo y azufre, y está relacionado con la acción inhibitoria del compuesto sobre la enzima acetilcolinesterasa. Grupo D (grupo saliente de amonio cuaternario R1): Puede ser un grupo alquilo (fosfonatos), alcoxi (fosforados) o un alquilamino (fosforamidatos). Este grupo también influye en la actividad y la selectividad del compuesto.

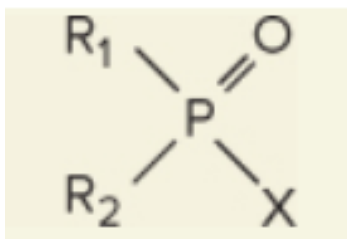


Figura 2. Fórmula general de organofosforados Brunton, LL (2018). Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13ª ed.). McGraw-Hill Interamericana. Cap.10 pág.168

La AChE es una enzima crucial que desempeña un papel fundamental en la regulación de la acetilcolina, un neurotransmisor. La inhibición prolongada de la AChE por los organofosforados resulta en una acumulación excesiva de acetilcolina en las sinapsis nerviosas, provocando una sobreestimulación de los receptores colinérgicos y dando lugar a una serie de efectos tóxicos, tanto en insectos como en mamíferos, incluyendo los seres humanos.

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y sus derivados, caracterizados por ser liposolubles y volátiles, lo que facilita su absorción en el organismo. En caso de intoxicación por organofosforados, los signos y síntomas son distintivos y conforman el síndrome colinérgico, resultante de la acumulación excesiva de acetilcolina. Estos compuestos pueden ingresar al cuerpo a través de la inhalación,

ingestión o contacto cutáneo, observándose tres cuadros clínicos diferentes provocados por estos, ya sea intoxicación aguda, síndrome intermedio o neurotoxicidad tardía.

Estudios anteriores han demostrado que el síndrome intermedio ocurre únicamente en pacientes que cuentan con una inhibición prolongada de la acetilcolinesterasa. Los principales agentes que están asociados con la aparición de este síndrome son el fenitión, dimetoato, monocrotofos y metamidofos.

Existe evidencia significativa que sugiere que existe una estrecha relación entre la exposición crónica a los organofosforados con la aparición de síntomas extrapiramidales y psiquiátricos como psicosis, ansiedad, depresión, alucinaciones y agresividad. En niños, se ha demostrado que la intoxicación por estos compuestos puede generar trastornos del desarrollo psicomotor, con alteraciones en las pruebas neuroconductuales (INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS, 2010).

Los carbamatos son inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa, a diferencia de los organofosforados, en los carbamatos, el residuo de serina en el sitio activo de la enzima se carbamila, lo que forma una unión más transitoria. Esta carbamilación es reversible, lo que significa que la inhibición de la AChE por los carbamatos tiende a ser temporal y puede revertirse más fácilmente en comparación con los inhibidores irreversibles, como los organofosforados (Susan et al., 2010).

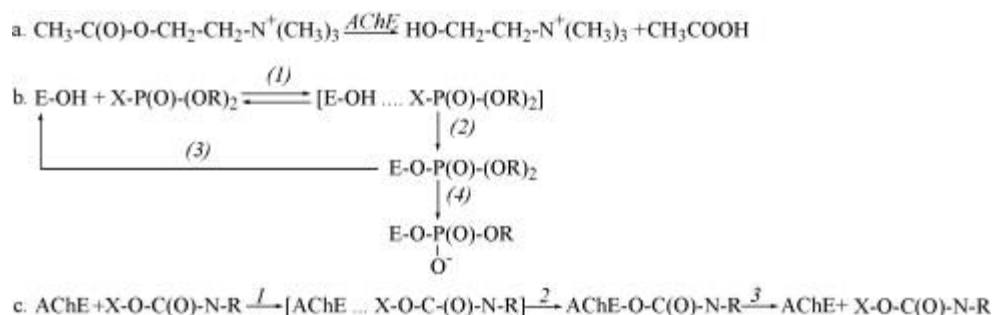


Figura 3. Papel fisiológico (a) e interacción de la acetilcolinesterasa (AChE) y otras esterasas (E) con compuestos organofosforados (b) y carbamato (c) (Jokanović, 2009).

II.3 Sistema nervioso colinérgico:

Este sistema consta de diversos componentes, y uno de ellos es la acetilcolina, que actúa como neurotransmisor regulando la actividad colinérgica parasimpática. La acetilcolina se libera a través de las neuronas colinérgicas y aquellas que interactúan con los músculos.

La síntesis de la acetilcolina es regulada por la enzima acetiltransferasa de colina, la cual forma parte de las colina-acetilinasas y participa en la biosíntesis reversible de la acetilcolina a partir de la acetil-CoA y la colina. Por otro lado, la acetilcolinesterasa (AChE) tiene como función degradar la acetilcolina, evitando su acumulación en la sinapsis.

Considerando lo mencionado anteriormente, se requiere tanto de la liberación como de la posterior recaptación de acetilcolina para que las neuronas colinérgicas puedan transmitir información a otras neuronas. Una vez liberada, la acetilcolina interactúa con receptores específicos, los cuales son nicotínicos (ionotrópicos o canales catiónicos) o muscarínicos (metabotrópicos o acoplados a la proteína G), permitiendo de esta manera que las neuronas postsinápticas reciban la información y cumplan su función efectora.

Estos dos tipos de receptores participan en procesos biológicos esenciales y se encuentran distribuidos en varias áreas del sistema nervioso central. Si existiera cualquier alteración en la expresión de la enzima que sintetiza y degrada la acetilcolina,

así como en la actividad de los receptores mencionados, podría influir en el funcionamiento de la acetilcolina y, por consecuencia, afectar a los órganos que dependen de su actividad (Durán-Cristiano & Durán-Cristiano, 2022).

II.4 Neurotransmisión colinérgica:

La acetilcolina en el cerebro desempeña un papel crucial en la señalización tanto a larga distancia, a través de neuronas, como a corta distancia, mediante interneuronas. El tipo de mensaje transmitido depende de varios factores, como el tipo de receptores presentes, el lugar de liberación de la acetilcolina, así como la ubicación y el estado de las neuronas diana en el momento de la liberación. Por lo que se puede afirmar que la acetilcolina influye en el cerebro en su totalidad, teniendo un alcance colinérgico que abarca los dominios corticales y subcorticales.

Las proyecciones colinérgicas pueden dar origen a través de dos vías principales: los sistemas colinérgicos del tronco encefálico, que involucran el soma neuronal ubicado en el núcleo tegmental pedunculopontino y el tegmento pontino laterodorsal; y los sistemas magnocelulares del prosencéfalo basal, que incluyen neuronas situadas en el núcleo septal medial. Estas vías desempeñan un papel fundamental en la transmisión de señales colinérgicas en el cerebro, participando en diversas funciones cognitivas y conductuales (Perez-Lloret & Barrantes, 2016).

II.5 Neurotransmisión colinérgica en memoria y cognición:

En el proceso de neurotransmisión colinérgica, el hipocampo desempeña un papel crucial en la memoria y la cognición ya que recibe abundantes aportes colinérgicos que se consideran esenciales para estas funciones.

Es relevante mencionar que la acetilcolina (ACh) desempeña un papel importante al modular la plasticidad a corto plazo de las sinapsis en el hipocampo. Existen estudios que se han realizado anteriormente que sugieren que esta modulación está relacionada con el aprendizaje y la memoria (Yang et al., n.d.).

II.6 Acetilcolinesterasas:

Existen dos formas moleculares de la acetilcolinesterasa (AChE) principales, estas son esenciales para su función en distintos contextos biológicos. Los oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas que son solubles y se encuentran dentro de las células, destinadas a la exportación o asociadas con la membrana externa de la célula. Esta configuración se encuentra comúnmente en tejidos donde la AChE está implicada en procesos metabólicos generales, así como las asociaciones heteroméricas de subunidades catalíticas con subunidades estructurales que son asociaciones típicas en las sinapsis neuronales. En este caso, las subunidades catalíticas se asocian con subunidades estructurales y están unidas por enlaces disulfuro a una subunidad ligada a lípidos que se encuentra en la superficie externa de la membrana celular. Esta forma específica de AChE es crucial para la función en la transmisión colinérgica en las sinapsis neuronales. Estas dos formas aseguran que la acetilcolinesterasa cumpla con sus roles específicos tanto en entornos intracelulares como en la interfaz entre las células nerviosas Brunton, L. L. (2018). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13th ed.). McGraw-Hill Interamericana. <https://uabc.vitalsource.com/books/9781456263577> cap.10, pág.164.

Las estructuras tridimensionales de la acetilcolinesterasa demuestran que el centro activo es casi centrosimétrico a cada subunidad.

La colinesterasa es una enzima perteneciente al grupo de las esterasas, que se localiza en las hendiduras sinápticas. Su función principal es la hidrólisis de la acetilcolina que es un neurotransmisor crucial. Cuando la acetilcolina se une a sus receptores, posibilita una transmisión de impulsos nerviosos en las sinapsis colinérgicas.

La colinesterasa cumple una función clave ya que inactiva la acetilcolina. Al hidrolizar la acetilcolina, la colinesterasa provoca su descomposición en componentes más simples, lo que resulta en una disminución de la cantidad de acetilcolina disponible para la transmisión de impulsos nerviosos. Esta inactivación contribuye a regular la señalización colinérgica y a controlar el tiempo de acción de la acetilcolina en la sinapsis, permitiendo de esta manera una respuesta neuronal equilibrada (Cuaspud & Vargas, n.d.).

La acetilcolina desempeña un papel esencial en diversas funciones cognitivas, tales como el sueño, la vigilancia, la atención, el aprendizaje, la memoria y el procesamiento sensorial. Los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR) tienen un papel en la modulación de la transmisión sináptica. En el sistema nervioso central, estos receptores muestran una expresión que está fuertemente relacionada con la región cerebral y el tipo de célula neuronal, lo que contribuye a la complejidad y especificidad de la modulación colinérgica (Yang et al., n.d.).

II.7 Actividad enzimática AChE:

El papel de la acetilcolinesterasa (AChE) en la terminación de la acción de la acetilcolina en las uniones de las terminaciones nerviosas colinérgicas. Cuando la AChE está funcionando normalmente, hidroliza la acetilcolina, limitando su acción y evitando

una estimulación continua de los receptores colinérgicos. Sin embargo, cuando la AChE se inhibe, ya sea de manera reversible o irreversible, la acetilcolina no se degrada eficientemente, lo que resulta en una acumulación de este neurotransmisor cerca de las terminales nerviosas colinérgicas.

Esta acumulación de acetilcolina puede inducir a una estimulación excesiva de los receptores colinérgicos en todo el sistema nervioso central y periférico. Esto podría causar diversas consecuencias, dependiendo de la ubicación específica y el tipo de receptores involucrados y puede manifestarse en síntomas y efectos adversos asociados con la sobreactividad colinérgica.

Durante el proceso de ataque enzimático de la acetilcolinesterasa (AChE), se forma un intermedio tetraédrico entre la enzima y el sustrato, que es un éster con geometría trigonal. Este intermedio se convierte en un conjugado de enzima de acetilo con la liberación concomitante de colina. La enzima de acetilo formada es lábil a la hidrólisis y se descompone para regenerar la enzima activa y producir acetato.

La acetilcolinesterasa es considerada una enzima muy eficiente debido a su capacidad para hidrolizar múltiples moléculas de acetilcolina por minuto. El dato que proporciona, indicando que una molécula de acetilcolinesterasa puede hidrolizar 6×10^5 moléculas de acetilcolina por minuto, destaca su alta eficiencia en la terminación rápida de la acción de la acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, con un tiempo de rotación notablemente rápido. Este proceso es esencial para la regulación precisa de la señalización colinérgica en el sistema nervioso Brunton, LL (2018). Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13^a ed.). McGraw-Hill Interamericana.

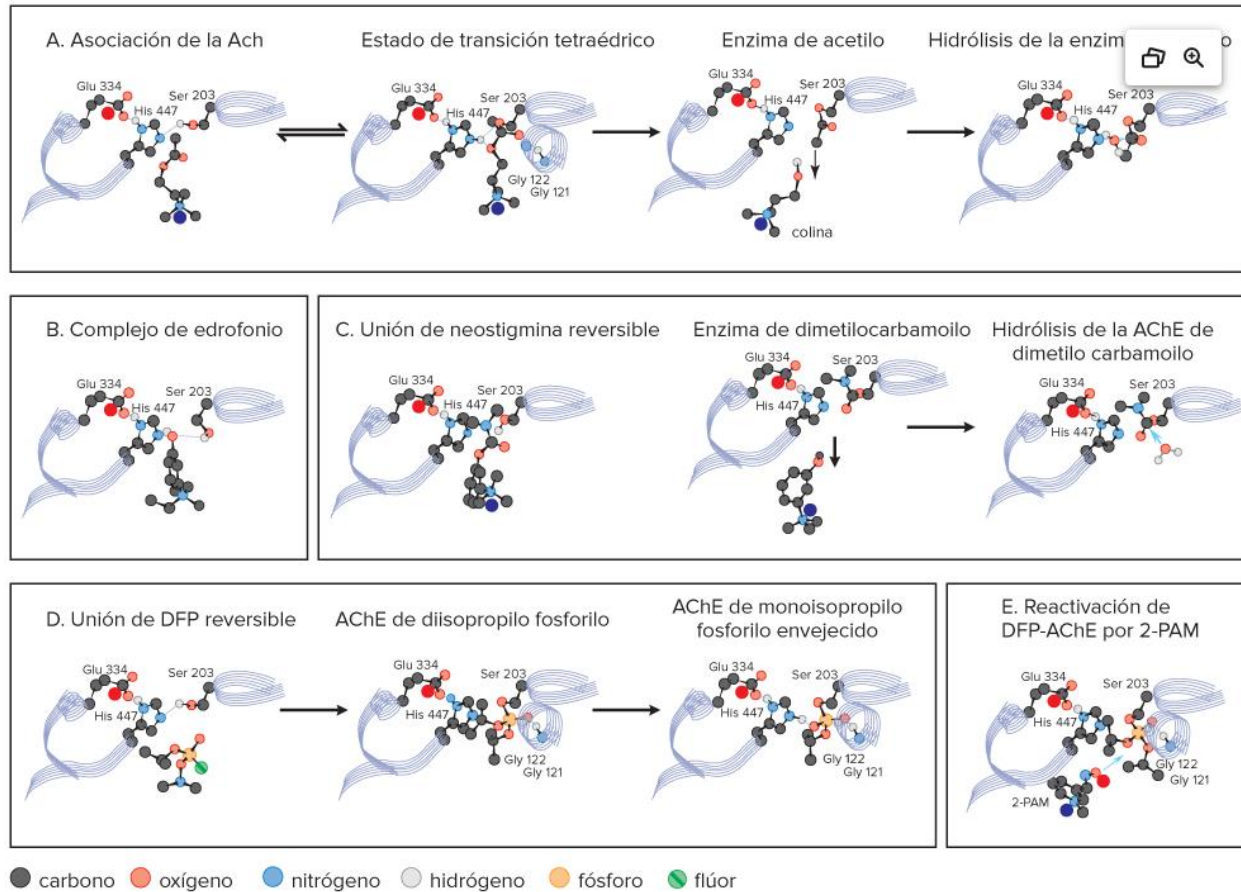


Figura 4. Goodman y Gilman. Pasos implicados en la hidrólisis de la ACh por AChE y en la inhibición y reactivación de la enzima. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13ª ed.). McGraw-Hill Interamericana pág.166.

II.8 Actividad enzimática de BChE colinesterasas Wiener lab:

La butirilcolinesterasa es una colinesterasa con una especificidad menor a la acetilcolinesterasa, no se encuentra en las sinapsis nerviosas. Esta se sintetiza en el hígado y se encuentra por lo general en la glía, el plasma en donde metaboliza los esteres circulantes y otros tejidos Katzung, B. G. (2019). Farmacología básica y clínica (14th ed.). McGraw-Hill Interamericana. <https://uabc.vitalsource.com/books/9781456267827>. Cap.6 pág.95

Cuando existen casos de alteración hepática, se observa una disminución en la concentración de la butirilcolinesterasa en comparación con los hepatocitos no

afectados. Esta enzima muestra una actividad máxima en la hidrólisis de la succinilcolina, aunque también desempeña un papel en la degradación de la acetilcolina (Vásquez & Osorio, 2000).

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Equipos y reactivos

III.1.1 Equipos:

- i. Mindray BS-200
- ii. Zybio de hematología
- iii. Thermo Scientific Fotómetro para microplacas multiskan FC
- iv. Vortex genie 2
- v. Microcentrífuga

III.1.2 Reactivos:

- i. Kit comercial acetilcolinesterasa de Sigma Aldrich
- ii. Agua tridestilada
- iii. Butirilcolinesterasa (Wiener Lab)
- iv. Reactivos Zybio
- v. Reactivos de hematología marca Zybio
- vi. Reactivos de bioquímica clínica marca Pointe Scientific y Wiener Lab.

III.2 Metodología

III.2.1 Diseño del estudio:

Estudio transversal exploratorio que simultáneamente determinó información sobre la exposición directa o indirectamente a los plaguicidas organofosforados y las consecuencias. Se realizó un muestreo de conveniencia no probabilístico en el distrito de Venustiano Carranza, una zona rural del valle de San Quintín; se seleccionaron los siguientes dos grupos, con diferentes grados de exposición a plaguicidas: exposición directa, correspondiente a trabajadores agrícolas con exposición ocupacional y diaria a plaguicidas organofosforados; exposición indirecta, correspondiente a los residentes que viven en las proximidades de las actividades agrícolas y que, por tanto, estarían

expuestos ambientalmente a los plaguicidas o personas con familiares trabajando en la agricultura expuestos directamente a los pesticidas. Para reclutar a los voluntarios en el estudio, éstos deberán ser mayores de 18 años y menores de 55 años pertenecientes a ambos géneros y residentes de la zona geográfica de muestreo al menos 12 meses. Los niveles de exposición se estimaron a partir de un cuestionario completado por los voluntarios.

III.2.2 Criterios de inclusión y exclusión:

Se consideraron hombres y mujeres adultos de entre 18 y 55 años. Los criterios de inclusión del grupo de exposición directa serán al menos 1 año de contacto diario y manipulación directa de plaguicidas en un contexto de trabajo. Los criterios de inclusión del grupo de exposición indirecta serán al menos 1 año de vivir cerca de áreas agrícolas que aplican pesticidas, pero sin manipulación directa.

Los criterios de exclusión incluyen alcoholismo, adicción a las drogas, diagnóstico de enfermedad psiquiátrica y trastornos neurodegenerativos o neurológicos. También se excluyen a las personas en tratamiento con fármacos que afectan al sistema nervioso central, ya que estos fármacos pueden alterar los resultados neuropsicológicos y, por lo tanto, afectar los resultados del estudio. También es requerido que se cuente con una escolaridad mínima de 3 años de educación básica cursados, por ello se excluirán a personas que tengan condición de analfabetismo, o bien, si cuentan con alguna condición física que pueda afectar el correcto desempeño en las pruebas neuropsicológicas como déficits sensoriales no corregidos en la visión o audición. Finalmente, también se excluyen a los voluntarios zurdos para descartar el sesgo producido por un desarrollo atípico en la asimetría cerebral.

Los criterios de eliminación se incluyen a las personas que no quieran ser puncionados para obtener la muestras y pacientes que se retiren del estudio o no quieran contestar los instrumentos de evaluación.

III.2.3 Declaración ética:

Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue sometido para su aprobación al Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California con número 1500/2022-2. Los participantes recibieron explicaciones sobre el estudio y su propósito en español. Preparamos un consentimiento informado escrito y verbal, que incluía el propósito de la investigación, la duración esperada de la entrevista y una declaración a los participantes que no correrán ningún riesgo debido al estudio, que podrán retirarse de la entrevista en cualquier momento y no recibir ningún pago por su participación. Les leímos esta declaración a cada participante del estudio durante el proceso de solicitud de su permiso para participar en el estudio.

III.2.4 Recolección de datos:

Se realizó un viaje al distrito Venustiano Carranza de San Quintín Baja California, México, para recolectar datos y muestras de sangre y orina de los voluntarios. La prueba para las evaluaciones neuropsicológicas, se llevaron a cabo con todos los voluntarios para evaluar su deterioro cognitivo. Las evaluaciones neuropsicológicas son a través de la aplicación de instrumentos de diagnóstico que se puede incorporar fácilmente a las entrevistas clínicas de rutina; son un instrumento de detección y orientación diagnóstica en la disciplina de la neurología y la psicología. Recopilamos información sobre el estado sociodemográfico y socioeconómicos de los voluntarios. Los datos sobre uso de plaguicidas fueron tomados de

la Agenda Técnica Agrícola de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Abastecimiento (SAGARPA).

III.2.5 Evaluaciones neuropsicológicas:

Los voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión fueron evaluados individualmente a través de dos evaluaciones neuropsicológicas que determinaron el estado mental general, la memoria, la atención, habilidades de concentración, la fluidez verbal, habilidades de visuoconstrucción y la memoria visual. Las pruebas fueron administradas por el mismo evaluador capacitado con experiencia en el área de psicometría.

- Para la valoración del estado cognitivo general se aplicó la prueba Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA por sus siglas en inglés) la cual es un instrumento considerablemente breve de cribado, que es útil en la examinación de los siguientes dominios cognitivos: habilidades visoespaciales/funcionamiento ejecutivo, atención, memoria, abstracción, lenguaje y orientación en tiempo y espacio. Su duración es aproximada de 15 minutos y cuenta con una adecuada confiabilidad intra observador (0,95) y con una consistencia interna de 0.89 siendo igualmente favorable. Según una validación mexicana de este instrumento, se determinó como punto de corte ≥ 24 , lo cual reflejó una sensibilidad del 98% y especificidad del 93% para diagnosticar el deterioro cognitivo (Aguilar-Navarro et al., 2018). Adicionalmente este instrumento ha mostrado tener ventajas por encima de otros de la misma naturaleza breve (Ciesielska et al., 2016).

- Trail Making Test (TMT) en la modalidad A y B, este instrumento mide la velocidad psicomotora, escaneo visual, atención, secuenciación y flexibilidad mental (Spreeen & Strauss, 1998). En la A en la cual el objetivo es unir consecutivamente números distribuidos desordenados en una hoja de papel, lo más rápido posible dibujando líneas sin levantar el lápiz del papel. Mientras que, en la parte B requiere que se unan en orden ascendente y alternando tanto números como letras. Este instrumento fue sometido a validación y estandarización, reflejando adecuada confiabilidad (Arango-Lasprilla, Rivera, Longoni, et al., 2015). Esta prueba ha sido previamente utilizada en estudios similares obteniendo resultados favorables (Baldi et al., 2011; Roldán-Tapia et al., 2005 & Ross et al., 2010).

III.2.6 Recolección y preparación de muestras:

Se utilizó el sistema vacutainer para tomar 3 mL de sangre venosa en tubos con anticoagulante K₂EDTA. La muestra se separa en plasma y eritrocitos mediante centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. Las muestras de glóbulos rojos se lavaron 3 veces en solución salina isotónica fría (0,9%, v/p) y luego se hemolizaron los eritrocitos mediante centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm en agua tridestilada en una proporción de 10uL de muestra en 390uL de agua tridestilada (dilución 40 veces). Todas las muestras recolectadas se procesaron inmediatamente para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa de acuerdo con el método modificado de Ellman.

Por otro lado, para las determinaciones en suero y los parámetros a determinar de la química clínica se utilizó el sistema vacutainer para tomar 5ml de sangre venosa en tubos con activador de la coagulación y gel separador.

III.2.7 Determinación de la actividad enzimática (AChE):

Para la medición de la actividad de la acetilcolinesterasa se utilizó un kit comercial (Sigma-Aldrich MAK119) con el método de Ellman modificado. Las muestras fueron recolectadas, preparadas y almacenadas en el campo antes de ser llevadas al laboratorio para su análisis final, realizando la hemólisis de los eritrocitos como se indica en el punto III.2.6. De ese hemolizado se tomaron 6uL y se colocaron en 234 uL del buffer (dilución 40 veces) incluido en el Kit (**Apéndice 1**). Posteriormente se cuantificaron las absorbancias iniciales y finales en el espectrofotómetro Thermo Scientific multiskan aplicando la **Ecuación 1** para la determinación de la actividad enzimática.

$$\frac{(A_{412})_{\text{final}} - (A_{412})_{\text{initial}} \times n \times 200}{(A_{412})_{\text{calibrator}} - (A_{412})_{\text{blank}}}$$

Ecuación 1

III.2.8 Determinación de la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa (BChE):

Para determinar la colinesterasa plasmática, se utilizó un método colorimétrico (Wiener Lab) el cual cuantificó la actividad enzimática en el equipo de química sanguínea Mindray BS-200.

III.2.9 Determinación de la hemoglobina total:

El ensayo para la determinación de la hemoglobina total (cianometahemoglobina) se realizó con el equipo automatizado de biometrías hemáticas Zybio, utilizando sus respectivos reactivos de la empresa Zybio.

III.2.10 Evaluación de marcadores bioquímicos:

Los niveles de todos los otros parámetros de la bioquímica clínica se midieron por métodos colorimétricos utilizando reactivos Pointe scientific y Wiener Lab en el equipo de química sanguínea Mindray BS-200.

III.2.11 Análisis Estadístico

Se utilizó el programa SPSS versión 25 para analizar nuestras variables dependientes e independientes. En la **tabla 1**, de datos sociodemográficos, se empleó el estadístico chi cuadrado para comparar grupos en variables categóricas. La **tabla 2 y 3**, que evalúa nuestra variable dependiente, el deterioro cognitivo, también utilizó el chi cuadrado. En la **tabla 4**, donde se presentan los marcadores bioquímicos evaluados, se compararon las medias utilizando el estadístico ANOVA factorial. La serie roja mostrada en la **tabla 5** fue analizada mediante ANOVA factorial. Para la **tabla 6**, se realizó ANOVA factorial para comparar las medias de los grupos evaluados. En la **tabla 7**, se llevaron a cabo correlaciones de Pearson para evaluar la relación entre las variables continuas en nuestra muestra. Esto nos permitió identificar posibles asociaciones entre las diferentes variables estudiadas y su impacto en el deterioro cognitivo. Nuestros resultados son respaldados por la investigación de Jae-Yeop ya que ellos encontraron que en general existe una tendencia hacia una asociación entre la exposición a pesticidas y el deterioro cognitivo en los agricultores adultos de las zonas rurales (Kim et al., 2019).

El uso del programa SPSS nos permitió realizar un análisis detallado y riguroso de nuestras variables, lo que nos llevó a obtener resultados significativos que contribuyen al conocimiento del deterioro cognitivo en el campo.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo evaluaciones de las características sociodemográficas de los participantes expuestos directamente (ED). De este grupo, el 90% se dedica a ocupaciones agrícolas, mientras que el 10% está involucrado en actividades industriales. Además, se examinó el grupo de participantes con exposición indirecta (EI), compuesto por residentes del área agrícola.

Entre las características sociodemográficas de los participantes expuestos directamente, se observó que el 72.7% eran hombres y el 45.9% mujeres. Además, el 58.7% de los participantes se encontraban en el rango de edad de 18 a 35 años, mientras que el 39.4% tenían entre 36 y 55 años.

En el grupo expuesto indirectamente, se observó que el 54.1% correspondía a mujeres y el 27.3% a hombres. Respecto a la distribución por edad, el 41.3% se ubicaba en el rango de 18 a 35 años, mientras que el 60.6% se encontraba en el rango de 36 a 55 años.

No se observó una diferencia significativa en las variables sociodemográficas entre los grupos expuestos directa e indirectamente, con la excepción de la ocupación. El 90% de los participantes expuestos directamente se dedican a la agricultura, mientras que el 90.2% de los participantes expuestos indirectamente trabajan en el ámbito industrial.

Entre los participantes expuestos, el 46.5% tienen educación primaria, mientras que la mayoría de este grupo posee educación secundaria (56.6%). En cuanto al estado civil, el 46.7% son solteros, el 56.6% están en unión libre y el 50% están casados.

Se empleó la prueba estadística de chi-cuadrado para analizar nuestras variables categóricas, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre ellas (tabla 1).

Tabla 1. Variables sociodemográficas de la población estudiada. Los datos se representan como frecuencia y porcentaje. Las diferencias se observan entre grupos utilizando chi cuadrada. Se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Variable	Expuestos Directamente (n=50)		Expuestos Indirectamente (n=46)		p
	N	%	N	%	
Edad (Años)					0.072
18-35	37	74	26	56.52	
36-55	13	26	20	43.48	
Género					0.027
Femenino	34	68	40	86.96	
Masculino	16	32	6	13.04	
Educación					0.325
Primaria	20	40	23	50	
Secundaria	30	60	23	50	
Estado marital					0.587
Soltero	7	14	8	17.39	
Unión libre	30	60	23	50	
Casado	13	26	13	28.26	
Divorciado	0	0	1	2.17	
Viudo/a	0	0	1	2.17	
Ocupación					0.000
Agrícola	45	90	0	0	
Industrial	5	10	46	100	

Tabla 2. Deterioro cognitivo. Los datos se representan como frecuencia y porcentaje. Las diferencias se observan entre grupos utilizando chi cuadrada. Se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Variable	Expuesto D(n=50)		Expuesto I (n=46)		p
	N	%	N	%	
Test MoCA					
Normal	5	10	6	13	0.640
Deterioro Cognitivo	45	90	40	87	
Test TMT A					
Normal	17	34	17	37	0.092
Deterioro Cognitivo	33	66	29	63	

Test TMT B	28	56	23	50	0.346
Normal	22	44	23	50	
Deterioro Cognitivo					

Tabla 3. Datos comparativos de los distintos grados de deterioro cognitivo medidos por los test TMT A para evaluar la atención selectiva, coordinación psicomotora y velocidad de procesamiento visual. TMT B para evaluar la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva. Las diferencias se observan entre grupos utilizando chi cuadrada. Se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Variable	Expuesto D(n=50)		Expuesto I (n=46)		<i>p</i>
	N	%	N	%	
Test TMT A					0.724
Normal	17	34	17	36.96	
D.C. Leve	6	12	8	17.39	
D.C. Severo	26	52	21	45.65	
Test TMT B					0.526
Normal	28	56	23	50	
D. C. Leve	7	14	6	13.04	
D. C. Severo	15	30	17	36.96	

El test MoCA que evalúa habilidades visoespaciales/funcionamiento ejecutivo, atención, memoria, abstracción, lenguaje y orientación en tiempo y espacio fue evaluado mediante análisis de chi-cuadrado, agrupando los datos en variables dicotómicas. En la **tabla 2** se evidencia que los resultados no alcanzan significancia estadística ($p= 0.640$). Se observa, además, que ambos grupos presentan un alto nivel de deterioro cognitivo. Si bien este hallazgo era esperado en los participantes expuestos directamente, se anticipaba un menor grado de deterioro cognitivo en aquellos expuestos de forma indirecta debido al tipo de exposición.

Este hallazgo resulta alarmante, ya que sugiere que las personas expuestas de forma indirecta podrían estar recibiendo niveles similares de pesticidas a aquellos que

trabajan directamente en el campo. Considero que sería pertinente realizar comparaciones con un grupo control, es decir, individuos no expuestos a los pesticidas, para evaluar de manera más precisa el impacto de esta exposición en la salud cognitiva.

Además, se aplicó el análisis de chi-cuadrado para evaluar los resultados de los Test de Conexión de Letras y Números (TMT) en sus modalidades A y B. En la **tabla 3** se observa que los resultados no muestran significancia estadística ($p=0.724$) y ($p=0.526$) para la modalidad A y la modalidad B, respectivamente, ya que los resultados son muy similares en ambos grupos. Es importante recordar que la modalidad A evalúa la atención selectiva, coordinación psicomotora y velocidad de procesamiento visual, mientras que la modalidad B se asocia con la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva (Hasegawa & Annaka, 2022). Esta similitud en los resultados podría sugerir que tanto la exposición directa como la indirecta a los pesticidas podrían influir de manera similar en las capacidades cognitivas de los individuos.

Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas clínicas a nuestros participantes con el objetivo de determinar la relación entre niveles fuera de los rangos normales de referencia de las marcas comerciales Wiener Lab (Argentina) y Pointe Scientific (USA), y su correlación con el nivel de deterioro cognitivo. Se cuantificaron los parámetros de diferentes biomarcadores de la química clínica. En este caso, se evaluaron para la función hepática la bilirrubina total e indirecta, así como la AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina y LDH.

Tabla 4. Bioquímica clínica de la población estudiada. Los datos se representan en frecuencia y porcentaje. Las diferencias se observan entre grupos utilizando el estadístico ANOVA factorial. Se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Parámetro	Expuestos Directamente (n=50)	Expuestos indirectamente (n= 46)	<i>t</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>
	(Media±DE), %	(Media±DE), %			
ALP (UI/L)	(92.32±16.95)	(92.80±42.21)	0.01	94	0.940
Normal (100-400)	34	26.09			
Bajo	66	73.91			
LDH	(142.80±33.08)	(122.11±32.20)	9.62	94	0.003
Normal (103-227)	98	93.48			
Bajo	2	6.52			
Bilirrubina total (mg/dL)	(0.84±0.43)	(1.25±0.72)	11.80	94	0.001
Alto	12	47.83			
Normal (0.2-1.2)	86	52.17			
Bajo	2	-			
Bilirrubina directa (mg/dL)	(0.13±0.06)	(0.11±0.06)	2.36	94	0.128
Alto	6	2.17			
Normal (<2)	90	89.13			
Bajo	4	8.70			
ALT (UI/L)	(22.50±15.35)	(20.15±12.25)	0.68	94	0.412
Alto	12	6.52			
Normal(<38)	84	89.13			
Bajo	4	4.35			
AST (UI/L)	(43.32±18.63)	(39.74±10.63)	1.31	94	0.256
Alto	44	30.43			
Normal (<40)	56	69.57			
GGT (UI/L)	(24.52±20.46)	(20.24±20.59)	1.04	94	0.310
Alto	18	8.70			
Normal (8-54)	80	78.26			
Bajo	2	13.04			
Albúmina (g/dL)	(4.41±0.38)	(3.71±0.76)	33.40	94	0.000
Alto	10	2.17			
Normal (3.5-4.8)	88	80.43			
Bajo	2	17.39			
Proteínas totales (g/dL)	(7.84±0.42)	(6.88±1.35)	23.34	94	0.000
Alto	46	19.57			
Normal (6.1-7.9)	54	63.04			
Bajo		17.39			
Fósforo (mg/DI)	(4.00±1.77)	(4.46±1.30)	2.08	94	0.153
Alto	30	39.13			
Normal (4-7)	54	56.52			
Bajo	16	4.35			

En la **tabla 4**, se observa una diferencia significativa exclusivamente en los niveles de bilirrubina total y LDH ($p < 0.001$). La bilirrubina es un parámetro bioquímico cuyos niveles elevados pueden indicar la presencia de daño hepático. Este aumento puede estar relacionado con la exposición prolongada a pesticidas organofosforados, ya que el metabolismo de estos compuestos tiene lugar principalmente en el hígado (Tang et al., 2006). Por otro lado, el lactato deshidrogenasa es una enzima presente principalmente en los músculos, el hígado, los riñones y los eritrocitos. Este marcador es útil para detectar o monitorear enfermedades que afectan el hígado, los pulmones, los riñones y otras patologías.

En cuanto a la albúmina, fósforo y proteínas totales, únicamente la albúmina y las proteínas totales mostraron significancia estadística ($p < 0.001$). Por otro lado, el fósforo se encontró dentro de los rangos normales para ambos grupos. La albúmina es una proteína sintetizada principalmente por el hígado y es la más abundante en el plasma. Además de su función de transporte de diversas sustancias, la albúmina también sirve como un indicador de daño hepático, junto con otros parámetros (Gonzalez et al., 2022). El aumento en los niveles plasmáticos de proteínas totales está correlacionado con un aumento en los niveles de albúmina en sangre, que puede ser causado por deshidratación, la causa más común, o por daño hepático (Gonzalez et al., 2022). Este último puede confirmarse o descartarse mediante un análisis más completo.

No se observó diferencia significativa en los niveles de ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina directa, AST, GGT, albumina, fósforo y globulinas ($p=0.412$; $p=0.940$; $p=0.128$; $p=0.256$; $p=0.310$; $p=0.000$; $p=0.153$; $p=0.047$) respectivamente.

En este caso, se utilizó el estadístico ANOVA, seleccionado por ser un método adecuado para examinar las diferencias en las medias de tres o más grupos.

A los participantes se les realizó una biometría hemática para evaluar la serie roja y observar diferencias entre los grupos y el dato de la hemoglobina, se utilizó para corregir la actividad enzimática de la AChE.

Tabla 5. Serie roja. Los datos se representan en frecuencias y porcentajes. Las diferencias se observan entre grupos utilizando el estadístico ANOVA factorial. Se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Parámetro	Expuestos Directamente (n=50)	Expuestos Indirectamente (n= 46)	<i>t</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>
	(Media±DE), %	(Media±DE), %			
Hemoglobina (g/dL)	(13.81±1.57)	(12.99±1.66)	6.20	93.93	0.015
Normal (13.80-18.50)	56	34.78			
Bajo	44	65.22			
Eritrocitos (x 10⁶/μl)	(4.88±0.49)	(4.65±0.66)	3.87	81.30	0.052
Normal (4.39-6.10)	82	73.91			
Bajo	18	26.09			
Hematocrito (%)	(43.68±4.63)	(40.93±5.50)	7.08	91.05	0.009
Alto	14	2.17			
Normal (35.40-49.40)	84	84.78			
Bajo	2	13.04			
Plaquetas (x 10³/μl)	(287.78±49.66)	(313.57±115.02)	2.01	55.48	0.152
Alto	2	10.87			
Normal (147-384)	98	89.13			

La **tabla 5**, muestra los resultados de la citometría, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los parámetros de hematocrito ($p=0.009$) y hemoglobina ($p=0.015$) sugiriendo una posible interacción entre la actividad de la acetilcolinesterasa y la serie roja de la sangre tomando en cuenta que estos parámetros están directamente relacionados con la actividad de la acetilcolinesterasa.

Por otro lado, los eritrocitos ($p=0.052$) estuvieron muy cerca de ser estadísticamente significativos esto por que usualmente se considera que los eritrocitos y las variables anteriores se correlacionan.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de plaquetas ($p=0.152$) entre los grupos. Esto podría atribuirse a que, aunque tanto las plaquetas como los eritrocitos se originan a partir del mismo precursor en la médula ósea, las plaquetas tienen una función diferente y no están tan directamente relacionadas con la actividad de la acetilcolinesterasa como los eritrocitos (Martínez, 2010). Las plaquetas están principalmente involucradas en la coagulación sanguínea, mientras que los eritrocitos son responsables del transporte de oxígeno a los tejidos (Martínez, 2010). Por lo tanto, estas diferencias podrían reflejar la complejidad de los procesos biológicos y las diferentes funciones de los componentes sanguíneos en relación con la actividad de la acetilcolinesterasa.

Tabla 6. La actividad de la AChE y BChE enzimas en la población estudiada. Los datos fueron analizados mediante ANOVA factorial y los resultados se expresan como media \pm DE y se indica como importancia significativa $p < 0.05$.

Parámetro	Expuestos Directamente (Media \pm DE)	Expuestos Indirectamente (Media \pm DE)	<i>p</i>
Hb (g/dL)			
Total	13.80 (1.56)	12.98 (1.56)	0.015
AChE (U/g Hb)			
Total	67.21 (36.58)	64.44 (504.50)	0.351
Actividad AChE (U/L)			
Total	12559.64 (6201.07)	10654.72 (6542.49)	0.146
BChE (U/L)			
Total	8697.14 (1416.80)	7724.80 (2275.70)	0.013

La actividad de la AChE y la BChE (**tabla 6**), fueron utilizadas en este estudio para ser biomarcadores que evalúan el efecto de la exposición ambiental y ocupacional a los pesticidas organofosforados ya que es considerado un gran indicador evaluando la magnitud de la exposición (Anurak et al., 2023). La media de la actividad de la AChE fue de 12559.64 ± 6201.07 y 10654.72 ± 6542.49 (U/L) en los expuestos directamente y los expuestos indirectamente, respectivamente. ($p=0.146$), indicando que no hay una diferencia significativa entre estos dos grupos cuando se dividen por tipo de exposición. Sin embargo, la actividad específica no demuestra diferencias significantes entre grupos, aunque haya diferencias significantes entre grupos cuando los valores de hemoglobina son analizados ($p=0.015$).

La media de la BChE fue de 8697.14 ± 1416.80 y 7724.80 ± 2275.70 (U/l), en los expuestos directamente y los expuestos indirectamente, respectivamente. ($p=0.013$), indicando que existe diferencia significativa entre estos dos grupos cuando se dividen por tipo de exposición. Existen investigaciones que muestran que la BChE está fuertemente relacionada con una mayor exposición a los pesticidas organofosforados (Anurak et al., 2023).

Tabla de correlaciones.

En esta investigación se midieron los siguientes parámetros: perfil bioquímico, hemoglobina y colinesterasas. Estos parámetros fueron evaluados para determinar el deterioro cognitivo utilizando los test MoCA y TMT A y B en cada participante.

Tabla 7. Correlaciones de las colinesterasas entre los distintos parámetros evaluados. Los datos fueron analizados mediante la correlación de Pearson y los resultados se expresan como coeficientes de correlación (r), el valor de p se muestra entre paréntesis.

Se indica como importancia significativa $p < 0.001$ y $p < 0.05$.

Parámetro	Expuestos Directamente		Expuestos Indirectamente	
	AChE	BChE	AChE	BChE
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	- 0.087 (0.548)	0.21 (0.884)	0.189 (0.209)	0.374 (0.010)
Bilirrubina Total	0.052 (0.719)	-0.092 (0.526)	-0.037 (0.810)	-0.060 (0.694)
Albúmina	0.232 (0.105)	0.177 (0.219)	0.334 (0.023)	0.542 (0.000)
Proteínas Totales	-0.119 (0.409)	0.273 (0.055)	0.427 (0.004)	0.522 (0.000)
Hemoglobina (Hb)	0.066 (0.650)	0.437 (0.002)	0.162 (0.283)	0.405 (0.005)
Hematocrito (Hto)	0.122 (0.399)	0.443 (0.001)	0.243 (0.103)	0.418 (0.004)
Eritrocitos	0.045 (0.759)	0.501 (0.000)	0.167 (0.269)	0.349 (0.017)
Plaquetas (PLT)	-0.035 (0.810)	0.701 (0.624)	0.002 (0.990)	0.060 (0.694)
Test MoCA	0.037 (0.797)	0.014 (0.924)	-0.045 (0.766)	-0.039 (0.797)
Test TMT A	-0.164 (0.256)	0.032 (0.824)	-0.028 (0.855)	-0.336 (0.022)
Test TMT B	-0.131 (0.365)	0.078 (0.528)	-0.130 (0.390)	-0.056 (0.713)

Se realizaron correlaciones de Pearson utilizando el programa SPSS 25 para analizar la relación estadística entre las colinesterasas y los parámetros de los participantes expuestos directamente, obteniendo los siguientes resultados:

Para los participantes expuestos directamente se observó una correlación negativa no significativa entre la AChE y los siguientes parámetros: LDH, proteínas

totales, plaquetas, y los test TMT A y B. En el caso de bilirrubina total, albumina, hemoglobina, hematocrito, eritrocitos y el test MoCA la correlación fue positiva, más no significativa.

Durante la evaluación de la butirilcolinesterasa (BChE) junto con la hemoglobina, el hematocrito y los eritrocitos, se encontró una correlación positiva significativa entre estos parámetros. Sin embargo, en el caso de la lactato deshidrogenasa, la albúmina, las proteínas totales, las plaquetas, así como en las pruebas MoCA y TMT A y B, se observó una correlación positiva no significativa. Además, se identificó una correlación negativa no significativa en el caso de la bilirrubina total.

Como resultado, no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre nuestras variables y la AChE en este grupo evaluado. Respecto a la BChE, solo se observó una correlación significativa con nuestras variables de hemoglobina (43%), hematocrito (44%) y eritrocitos (50%). Se ha demostrado que los niveles de acetilcolinesterasa están directamente relacionados con el tiempo de exposición a pesticidas organofosforados. Esto indica que cuando la exposición excede los 10 años, se observa un menor nivel de esta enzima, pero no necesariamente ocurre lo mismo con los niveles de butirilcolinesterasa. Sin embargo, en nuestro estudio, no hemos observado esa misma relación, ya que menos de la mitad de nuestros participantes cuentan con el tiempo de exposición suficiente mencionado en la investigación de Wongta y colaboradores (Anurak et al., 2023).

En los participantes expuestos indirectamente, se observó una correlación positiva no significativa entre la AChE y la LDH, así como con la hemoglobina, el hematocrito, los eritrocitos y las plaquetas. Además, se identificó una correlación positiva

significativa con la albúmina y las proteínas totales. Por otro lado, la bilirrubina y las pruebas MoCA y TMT A y B mostraron una correlación negativa no significativa.

Se observa que en el caso de la BChE existe una correlación positiva significativa con la LDH, la albúmina, las proteínas totales, la hemoglobina, el hematocrito y los eritrocitos. Por otro lado, la correlación es negativa y no significativa para la bilirrubina total, el test MoCA y el TMT B. Sin embargo, en el caso del test TMT A, la correlación es negativa y significativa. Únicamente las plaquetas presentan una correlación positiva no significativa.

Para este grupo, se encontró una correlación significativa entre la AChE y la albúmina (33%), así como con las proteínas totales (42%). En cuanto a las correlaciones con la BChE, se observa una correlación significativa con la LDH (37%), la albúmina (54%), las proteínas totales (52%), la hemoglobina (40%), el hematocrito (41%), los eritrocitos (34%) y el test TMT A (33%).

En la investigación de Ramírez Santana se evaluaron dos grupos: el grupo expuesto ocupacionalmente y el grupo expuesto ambientalmente. Se llevaron a cabo mediciones de biomarcadores, incluyendo la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa, así como pruebas neuropsicológicas. Se encontró consistentemente una inhibición en la actividad de la butirilcolinesterasa. En el caso del grupo expuesto ambientalmente, esta inhibición resultó ser el mejor predictor de un rendimiento reducido en pruebas de lógica (Ramírez-Santana et al., 2020). Esa evidencia respalda nuestros resultados, ya que en nuestro caso la actividad de la butirilcolinesterasa demostró ser el biomarcador con mayor especificidad, a diferencia de los resultados obtenidos con la acetilcolinesterasa.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

En esta investigación se ha observado un preocupante alto porcentaje de deterioro cognitivo severo entre los grupos de participantes evaluados. Este hallazgo resulta alarmante para el grupo poblacional. No se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos, lo que sugiere que la exposición ambiental y ocupacional a los pesticidas organofosforados podría estar asociada con el deterioro cognitivo, afectando de manera perjudicial el sistema nervioso central de manera similar.

Sin embargo, estos resultados sugieren que otras variables ambientales podrían estar influyendo en el desarrollo cognitivo de los participantes, dado que ambos grupos presentaron resultados muy similares. Es importante tener en cuenta que las pruebas de cognición aplicadas en este estudio consideran el bajo nivel de escolaridad de la población estudiada, pero incluso así no muestran un estado cognitivo acorde con su respectiva edad. Se observa una asociación entre la exposición crónica, tanto directa como indirecta, a pesticidas organofosforados y el deterioro cognitivo, así como la inhibición de las colinesterasas, principalmente la butirilcolinesterasa. No obstante, es necesario investigar más a fondo qué otras variables ambientales pueden desencadenar este marcado deterioro.

Se ha identificado una tendencia hacia la inhibición de la actividad de la butirilcolinesterasa, que es el biomarcador de referencia para este estudio. Esto permite establecer una correlación entre el deterioro cognitivo y la inhibición de una de las colinesterasas. Es plausible que esta situación se deba a una falta de capacitación y a la ausencia de un reglamento para el uso y manipulación de los pesticidas organofosforados, en caso de proporcionar el equipo adecuado y necesario para la

protección de los agricultores, se podría prevenir la intoxicación que muchas personas experimentan al manipular este tipo de pesticidas y el deterioro cognitivo que les causa.

Este estudio podría ser de utilidad para investigaciones futuras y servir como antecedente para estudios posteriores que incluyan un mayor número de participantes y abarquen otras localidades rurales.

La inhibición de las actividades de las colinesterasas se utiliza como indicador de exposición a pesticidas organofosforados en los dos grupos del estudio: el grupo expuesto directa e indirectamente. Sin embargo, los pesticidas organofosforados no son los únicos compuestos que causan una inhibición de las colinesterasas. Es probable que los participantes de este estudio hayan estado expuestos a diferentes pesticidas, no todos ellos inhibidores de la colinesterasa. Por esta razón, no podemos descartar la posibilidad de que existan otras dianas responsables de los efectos neurofisiológicos observados.

Este estudio evidencia la necesidad de mejoras en la regulación y control del uso de pesticidas en nuestro país, especialmente cuando se aplican cerca de áreas residenciales. Por lo tanto, debería contar con el respaldo de organismos que implementen una regulación más estricta para la venta y el uso de pesticidas.

CAPÍTULO VI TRABAJO FUTURO

El desarrollo de este trabajo fue una parte muy importante de un proyecto aprobado por 23^a convocatoria interna de la UABC; por lo que aún debemos continuar con el desarrollo de otras correlaciones toxicológicas para monitorear la salud ambiental de los trabajadores rurales y la población. El trabajo futuro del proyecto es realizar ensayos de genotoxicidad y analizar la exposición de los pesticidas mediante la cuantificación de metabolito en orina. El trabajo futuro del proyecto producto de esta tesis es enviar el trabajo a un congreso nacional o internacional y una vez concluido con todos los estudios una publicación en una revista de salud ambiental indicada.

CAPÍTULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., & Shadnia, S. (2004). Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(1), 29–34.
<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2003.11.002>
- Anurak, W., Surat, H., Zhen-Lin, X., Somporn, C., Mookda, P., Ratana, S., Nootchakarn, S., & Phannika, T. (2023). The Relationship of Organophosphate Pesticide Exposure and Cognitive Decline Among Residents of an Agricultural Area in Northern Thailand. *Journal of Health Research*, 37, 1–10.
<https://doi.org/10.56808/2586940X.1035>
- Cabrera Ortiz, A., & Varela Rodríguez, W. (2009). Intoxicación por organofosforados. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 161–167.
- Cuaspud, J., & Vargas, B. (n.d.). *Determinación de Colinesterasa Eritrocitaria en Trabajadores Agrícolas Expuestos a Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos*.
- Durán-Cristiano, S. C., & Durán-Cristiano, S. C. (2022). Actividad colinérgica y su papel en el sistema visual. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 96(2), 82–92.
<https://doi.org/10.24875/RMO.M21000214>
- Eddleston, M., Buckley, N. A., Eyer, P., & Dawson, A. H. (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet*, 371(9612), 597–607.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61202-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61202-1)
- Gonzalez, E., Marín, H., & Torres, G. (2022). *Uso de albúmina a largo plazo en el paciente cirrótico. Revisión sistemática*.
- Hasegawa, N., & Annaka, H. (2022). Cognitive features of adult focal epilepsy with unknown etiology revealed by the trail making test. *Epilepsy & Behavior*, 129, 108625. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2022.108625>
- INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS*. (2010).
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562010000100009
- Jaramillo-Colorado, B. E., Palacio-Herrera, F., & Pérez-Sierra, I. (2016). Residuos de pesticidas organofosforados en frutas obtenidas de plazas de mercado y supermercados en Cartagena, Colombia. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 25(4), 39–46. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14440.47363>
- Jokanović, M. (2009). Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters*, 190, 107–115.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.025>
- Martínez, L. (2010). Función de las plaquetas en tratamientos médicos-odontológicos. *Ciencia Odontológica*, 7, 150–162.

- Paul, K. C., Ling, C., Lee, A., To, T. M., Cockburn, M., Haan, M., & Ritz, B. (2017). *Cognitive decline, mortality, and organophosphorus exposure in aging Mexican Americans*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.017>
- Perez-Lloret, S., & Barrantes, F. J. (2016). Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.1>
- Ramírez-Santana, M., Zúñiga-Venegas, L., Corral, S., Roeleveld, N., Groenewoud, H., van der Velden, K., Scheepers, P. T. J., & Pancetti, F. (2020). Association between cholinesterase's inhibition and cognitive impairment: A basis for prevention policies of environmental pollution by organophosphate and carbamate pesticides in Chile. *Environmental Research*, 186, 109539. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109539>
- Susan, J., Dyk, V., & Pletschke, B. (2010). *Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.033>
- Tang, J., Rose, R. L., & Chambers, J. E. (2006). Metabolism of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, 127–143. <https://doi.org/10.1016/B978-012088523-7/50011-9>
- Vásquez, L., & Osorio, J. (2000). *Variación de la Actividad de la Enzima Butirilcolinesterasa en Usuarías de Anticonceptivos Hormonales*. 61, 271–277. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37961402>
- Vista de Determinación de Colinesterasa Eritrocitaria en Trabajadores Agrícolas Expuestos a Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos*. (n.d.). Retrieved October 15, 2023, from <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/QUIMICA/article/view/1194/1187>
- Yang, D., Ding, C., Qi, G., & Feldmeyer, D. (n.d.). *Cholinergic and Adenosinergic Modulation of Synaptic Release*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.006>
- Zúñiga-Venegas, L., Saracini, C., Pancetti, F., Muñoz-Quezada, M. T., Lucero, B., Foerster, C., & Cortés, S. (2021). Exposición a plaguicidas en Chile y salud poblacional: urgencia para la toma de decisiones. *Gaceta Sanitaria*, 35(5), 480–487. <https://doi.org/10.1016/J.GACETA.2020.04.020>

CAPITULO VIII APÉNDICES

Apéndice 1. Acetylcholinesterase Activity Assay Kit

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

Acetylcholinesterase Activity Assay Kit

Catalog Number **MAK119**
Storage at Room Temperature

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

Acetylcholinesterases (AChEs) are enzymes that hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine (ACh) to acetate and choline. AChE is located at the synaptic cleft and functions to terminate synaptic transmission by catalyzing the breakdown of ACh allowing cholinergic neurons to return to a resting state after activation. Changes in AChE activity may result from exposure to certain insecticides, which act as cholinesterase inhibitors. Inhibitors of AChE are also used to treat certain conditions such as dementia.

The Acetylcholinesterase Activity Assay kit provides a simple and direct procedure for measuring AChE levels in a variety of samples such as blood, serum, and plasma. This assay is an optimized version of the Ellman method in which thiocholine, produced by AChE, reacts with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) to form a colorimetric (412 nm) product, proportional to the AChE activity present. One unit of AChE is the amount of enzyme that catalyzes the production of 1.0 μ mole of thiocholine per minute at pH 7.5 at room temperature. This kit has a linear range of 10–600 units/L of AChE activity.

Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Assay Buffer, pH 7.5 Catalog Number MAK119A	30 mL
Calibrator, equivalent to 200 U/L Catalog Number MAK119B	4 mL
Reagent Catalog Number MAK119C	240 mg

Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- Spectrophotometric multiwell plate reader
- Clear 96 well flat-bottom plate

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

This kit is shipped, and should be stored at room temperature.

Procedure

Sample Preparation

Blood samples should be diluted 40-fold in Assay Buffer.

Tissue or cell lysates can be prepared by briefly sonicating or by homogenization in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 5 minutes. Used cleared supernatants for assay.

Best results are obtained when lysates are freshly prepared. If this is not feasible, lysates should be stored at 2–8 °C and used within 24 hours.

Assay Reaction

1. The Working Reagent should be prepared fresh and used within 30 minutes. Each reaction will require 2 mg of Reagent. To prepare Working Reagent, calculate the amount of reagent needed in total and weigh that amount into a centrifuge tube. Add 200 μ L of Assay Buffer per 2 mg of Reaction and vortex to dissolve.
2. Transfer 200 μ L of water (Assay Blank) and 200 μ L of Calibrator into separate wells of a 96 well plate. Add 10 μ L of samples into separate wells of the 96-well plate.
3. Transfer 190 μ L of the freshly prepared Working Reagent to all sample wells and tap plate briefly to mix.
4. Incubate the samples at room temperature. After 2 minutes, take the initial absorbance measurement at 412 nm (A_{412})_{initial}.
5. Continue to incubate the plate at room temperature. At 10 minutes, take the final measurement (A_{412})_{final}.

Note: This assay is based on an enzyme-catalyzed kinetic reaction. Addition of Working Reagent should be quick and mixing should be brief but thorough. Use of a multichannel pipette is recommended.

These assays can be adapted for use in standard 1 mL cuvettes. To adapt to cuvettes follow procedure as for 96 well plates but change volumes as follows: 1 mL of water, 1 mL of Calibrator, 50 μ L of sample, and 950 μ L of Working Reagent.

Calculations

AChE Activity (units/L) =

$$\frac{(A_{412})_{\text{final}} - (A_{412})_{\text{initial}}}{(A_{412})_{\text{calibrator}} - (A_{412})_{\text{blank}}} \times n \times 200$$

200 = equivalent activity (units/L) of the Calibrator when assayed is read at 2 minutes and 10 minutes

n = dilution factor (n = 40 for whole blood)

(A_{412})_{calibrator} = Absorbance of the calibrator at 10 minutes

(A_{412})_{blank} = Absorbance of the blank at 10 minutes

If the AChE activity without consideration of the dilution factor is higher than 600 units/L, dilute sample further in Assay Buffer and repeat the assay. Multiply the results by the dilution factor.

One unit of AChE is the amount of enzyme that catalyzes the production of 1.0 μ mole of thiocholine per minute at room temperature at pH 7.5. This kit has a linear range of 10–600 units/L of AChE activity.

Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Suggested Solution
Assay not working	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For UV assays, use clear plates that are UV transparent or quartz plates.
Samples with erratic readings	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings

LS,MAM 11/13-1