

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA**  
**PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS**  
**AMBIENTALES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

## **DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS**  
**Y LA PARAOXONASA 1 (PON1) Y ALTERACIONES NEUROCOGNITIVAS EN**  
**NIÑOS Y ADOLESCENTES DE UNA COMUNIDAD AGRÍCOLA DE SAN LUIS**  
**POTOSÍ**

PRESENTA:

**MA. DEL ROCÍO RAMÍREZ JIMÉNEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

DRA. LETICIA GUADALUPE YÁÑEZ ESTRADA

**ASESORES:**

DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ

DRA. REGINA MONTERO MONTOYA

**ENERO 2015**



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA  
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

## DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS  
Y LA PARAOXONASA 1 (PON1) Y ALTERACIONES NEUROCOGNITIVAS EN  
NIÑOS Y ADOLESCENTES DE UNA COMUNIDAD AGRÍCOLA DE SAN LUIS  
POTOSÍ**

PRESENTA:

**MA. DEL ROCÍO RAMÍREZ JIMÉNEZ**

COMITÉ TUTELAR:

**DIRECTOR:** DRA. LETICIA YÁÑEZ ESTRADA

**ASESOR:** DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ

**ASESOR:** DRA. REGINA MONTERO MONTOYA

**SINODALES:**

**PRESIDENTE:** DRA. LETICIA YÁÑEZ ESTRADA

**SECRETARIO:** DRA. JAQUELINE CALDERÓN HERNÁNDEZ

**VOCAL:** DRA. REGINA MONTERO MONTOYA

**VOCAL:** DR. LEONARDO MÁRQUEZ MIRELES

**VOCAL:** DR. JORGE A. ALEGRIA TORRES

*[Handwritten signatures in blue ink over horizontal lines]*

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

**PROYECTO REALIZADO EN:**

**LABORATORIO DE GÉNERO, SALUD Y AMBIENTE  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**CON FINANCIAMIENTO DE:**

**PROMEP SES-2009-UASLP-CA-45, CONACYT-MÉXICO**

**A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:**

**EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA EXPOSICIÓN A INSECTICIDAS EN POBLACIÓN INFANTIL:  
MARCADORES BIOQUÍMICOS, MOLECULARES Y NEUROPSICOLÓGICOS**

**AGRADEZCO A CONACYT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS**

**Becario No. 166170**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS  
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

**CON APOYO DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (IPN) A TRAVÉS DEL  
COMITÉ TÉCNICO PARA EL OTORGAMIENTO DE BECAS DE ESTUDIO, APOYOS  
ECONÓMICOS Y LICENCIAS CON GOCE DE SUELDO (COTEBAL)**

## **DEDICATORIA**

A ti luz de mi vida donde quiera que te encuentres.

A mis padres, esposo y amigos por su afecto y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Comité Tutelar y sinodales: Dra. Leticia Yáñez Estrada, Dra. Jaqueline Calderón Hernández, Dra. Regina Montero Montoya, Dr. Leonardo Márquez Mireles y Dr. Jorge Alegría Torres por su asesoría e invaluable aportaciones y por su valioso tiempo.

A los niños de la comunidad de El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, México que participaron en este proyecto.

A la M. en C. Rebeca Mejía Saucedo, Q.F.B. Leticia Carrizales Yáñez, Q.F.B. Esperanza de la Cruz, Q.F.B. Lilia Llamasares Azuara y a la Dra. Fernanda Martínez Salazar, por su apoyo en la realización de los análisis de laboratorio.

A la Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo y a su equipo de trabajo, por su apoyo en la aplicación de las pruebas neuropsicológicas.

A la Q.F.B. Blanca Sánchez Alvarado por su apoyo en la realización del muestreo.

A mis amigas y compañeras del Laboratorio de Género, Salud y Ambiente: Rebeca, Mayte, Andrea, Yosa, Karime y Cristy, por su amistad, solidaridad y apoyo.

## ÍNDICE

Introducción general-----	7
Capítulo I Implementación de un método analítico para la determinación de metabolitos urinarios dialquifosfato por CG/EM, usando dos agentes derivatizantes-----	10
Capítulo II Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México--	48
Capítulo III Polymorphisms and activity of PON1 in Mexican children and adolescents exposed to organophosphate pesticides from an agricultural locality-----	60
Capítulo IV Exposición a plaguicidas organofosforados y alteraciones cognitivas en niños y adolescents mexicanos de una localidad agrícola-----	95
Conclusiones generales-----	135
Anexos-----	138

## Introducción general

Los beneficios que ha traído el uso de los plaguicidas a la humanidad son innegables; sin embargo, en el balance riesgo-beneficio también se deben considerar sus impactos negativos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana. En la última década, los efectos a la salud por exposiciones crónicas a bajas dosis de los plaguicidas han aumentado el interés de la opinión pública, debido a que algunos investigadores han reportado efectos inmunológicos, reproductivos, endocrinos, neurológicos y cancerígenos (De Silva y cols., 2006; Eskenazi y cols., 2008). La exposición a plaguicidas constituye un problema de salud, en particular en las localidades en niños, mujeres y hombres, que trabajan y viven en estrecha proximidad a los campos agrícolas donde estos productos son aplicados y almacenados (Fenske y col. 2000; Vida y Moretto, 2007). La evolución temporal del sistema nervioso humano sucede desde las primeras semanas de gestación hasta alrededor de los 20 años de edad (Rice y cols., 2000; Selevan y cols., 2000), por lo que el daño por la exposición a agentes neurotóxicos durante el desarrollo de éste es mayor (Grandjean, 2006). Esto sugiere que los niños son un grupo vulnerable con mayor riesgo de sufrir daños neurológicos a corto, mediano y largo plazo (Eskenazi y cols., 1999; Weiss y cols., 2004). Varios estudios en la literatura indican que los efectos adversos potenciales a la salud por la exposición a plaguicidas, son mayores para los niños que para adultos debido a sus patrones de actividad y comportamiento, alimentación y características fisiológicas asociadas con el desarrollo (Eskenazi y cols., 1999; Weiss y cols., 2004). Los plaguicidas organofosforados (OPs por sus siglas en inglés) son una clase de plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura; sus efectos clínicos debido a una intoxicación aguda están bien documentados, pero los estudios sobre sus efectos neurotóxicos crónicos no son concluyentes (Kwong, 2002; Kamel y cols. 2003, 2007; De Silva y cols., 2006).

El presente proyecto de Tesis de Doctorado formó parte del Programa Multidisciplinario e Interinstitucional "Evaluación Clínica de la Exposición a Insecticidas



en Población Infantil: Marcadores Bioquímicos, Moleculares y Neuropsicológicos” de la Red “Diagnóstico Clínico de Enfermedades Metabólicas” integrada por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (Laboratorio de Género, Salud y Ambiente de la Facultad de Medicina), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Laboratorio de Farmacia Clínica y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Farmacia) e Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS, Departamento de Neuropsicología).

El objetivo general fue caracterizar la exposición a los plaguicidas OP y evaluar su efecto sobre el desempeño cognitivo de niños en edad escolar de la localidad agrícola de El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, México, para ello el trabajo se realizó de acuerdo a las siguientes etapas:

- Evaluación de la exposición a los plaguicidas organofosforados a través de la medición de los metabolitos inespecíficos dialquilfosfatos (DAP) en orina, usando la técnica analítica de Cromatografía de gases con Espectrometría de Masas. Para lo cual previamente se implementó y validó el método analítico (Capítulo I), posteriormente se recolectaron las muestras de orina de los niños participantes, durante dos periodos de muestreo (baja y alta aplicación de plaguicidas) y se cuantificaron las concentraciones de los metabolitos DAP en las mismas. Además, durante la colecta de las muestras biológicas se registraron los parámetros antropométricos de los niños participantes y se entrevistó a sus madres sobre diversos factores sociodemográficos y de exposición a plaguicidas y otras sustancias contaminantes. Finalmente, se examinaron las diferencias en las concentraciones urinarias de los metabolitos DAP entre los periodos de aplicación de los plaguicidas y entre otras variables sociodemográficas y de exposición (Capítulo II).
- Caracterización bioquímica y molecular de la paraoxonasa 1 (PON1), enzima implicada en la desintoxicación de los plaguicidas OPs, por lo cual juega un

papel importante en la susceptibilidad individual a la toxicidad de los OPs. Para la realización de esta etapa del proyecto, se colectaron muestras sanguíneas de los niños participantes durante el período de alta aplicación de plaguicidas y se determinaron las actividades arilesterasa (AREasa) y paraoxonasa (POasa) por métodos enzimáticos y espectrofotométricos; y se determinaron los genotipos de los polimorfismos PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub> usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa por Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés). En esta etapa se examinó la relación entre la exposición a plaguicidas OP (medida como las concentraciones de los metabolitos DAP) y las actividades y polimorfismos de PON1 (Capítulo III).

- Evaluación del desempeño cognitivo de los niños participantes, mediante la aplicación de la prueba WISC-R, por un grupo de psicólogos del INNNMVS con una amplia experiencia en el área. Se evaluó la asociación de la exposición a plaguicidas OP, actividades y polimorfismos de PON1 y el desempeño cognitivo de los niños participantes (Capítulo IV).

## Capítulo I. Implementación de un método analítico para la determinación de metabolitos urinarios dialquilfosfato por CG/EM, usando dos agentes derivatizantes

**Resumen.** Los compuestos organofosforados (OPs) son ampliamente usados como plaguicidas, principalmente en la agricultura. Una forma de evaluar la exposición humana a éstos, es cuantificando sus metabolitos inespecíficos dialquilfosfato (DAP) en orina. Se implementó un método analítico para medir los seis principales metabolitos urinarios DAP, el cual consistió en una extracción líquido-líquido, en una etapa de derivatización y en el análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM). El volumen de orina utilizado fue de 200 µL. La reacción de derivatización fue llevada a cabo usando bromuro de pentafluorobencilo y cloriodopropano a 70, 80 y 90 °C por 2 h. El análogo deuterado del dietiltiofosfato (DETP-d10) fue utilizado como estándar interno. Los límites de detección del método (LDMs) de los ésteres cloropropil fosfato fueron 1.10, 0.21, 0.070 y 0.46 µg/L para los metabolitos DMTP, DETP, DMDTP y DEDTP, respectivamente; mientras que para los ésteres pentafluorobencil fosfato fueron 1.36, 1.07, 1.49, 0.98, 0.27 y 0.52 µg/L para los metabolitos DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP y DEDTP, respectivamente. Estos límites de detección son comparables a los reportados por otros estudios, en los cuales también emplearon CG/EM. Los coeficientes de variación fueron inferiores al 23%. Los porcentajes de recobro oscilaron entre 77.9% y 103.7% dependiendo del metabolito DAP y del agente derivatizante. El método implementado fue empleado para medir los metabolitos DAP en muestras de orina de niños de una localidad agrícola de México.

*Palabras clave:* método analítico, metabolitos urinarios dialquilfosfato, CG/EM, plaguicidas organofosforados, PFBBBr, CIP.

## **Implementación de un método analítico para la determinación de metabolitos urinarios dialquilfosfato por CG/EM usando dos agentes derivatizantes**

Rocío Ramírez-Jiménez<sup>a,c</sup>, Jaqueline Calderón-Hernández<sup>b</sup>, Rebeca Mejía-Saucedo<sup>c</sup>, Liliana Llamazares-Azuara<sup>d</sup> and Leticia Yáñez-Estrada<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, México*

<sup>b</sup> *Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

<sup>c</sup> *Laboratorio de Género, Salud y Ambiente, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

<sup>d</sup> *Laboratorio Renal, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

\*Autor para la correspondencia:

Facultad de Medicina,

Universidad Autónoma de San Luis Potosí,

Avenida Venustiano Carranza 2405,

San Luis Potosí, S.L.P., 78210, México

Tel.: 52 4448262347 ext. 6643; fax: 52 4448262351

*Correo electrónico:* lyanez58@hotmail.com, lyanez@uaslp.mx (L. Yáñez-Estrada)

## ABSTRACT

Organophosphate (OPs) compounds are widely used as pesticides mainly in agriculture. One way to assess human exposure to OPs is quantifying their dialkylphosphate nonspecific metabolites (DAP) in urine. A method was implemented to measure the main six DAP urinary metabolites using liquid-liquid extraction, a derivatization reaction and gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The volume of urine utilized was 200  $\mu\text{L}$ . Derivatization was performed using pentafluorobenzyl bromide and chloriodopropane at 70, 80 and 90  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h. The stable isotope analogue of the DETP (diethyl-d10) was used as internal standard. Detection limits (LOD) for chloropropyl phosphate esters were 1.10, 0.21, 0.070 and 0.46  $\mu\text{g/L}$  for DMTP, DETP, DMDTP and DEDTP, respectively; while for pentafluorobenzyl phosphate esters were 1.36, 1.07, 1.49, 0.98, 0.27 and 0.52  $\mu\text{g/L}$  for DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP and DEDTP, respectively. These detection limits are comparable to previous studies in which GC/MS was also used. The coefficients of variation were lower than 23%. The recoveries oscillated between 77.9 and 103.7% depending of the DAP metabolite and of the derivatizing agent. The method implemented was used to evaluate the exposure to OPs in Mexican children from an agricultural locality.

*Keywords:* analytical method; urinary dialkylphosphate metabolites; GC/MS; organophosphate pesticides; PFBBBr; CIP.

## Introducción

Los compuestos organofosforados (OPs) constituyen un grupo de plaguicidas ampliamente utilizado en la actualidad, principalmente en la agricultura. Los OPs son neurotóxicos y representan el primer tipo de compuestos químicos en ser regulados como grupo, de acuerdo con la “Food Quality Protection Act” (FQPA por sus siglas en inglés), debido a su amplio uso y a que tienen un mecanismo de acción común “la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE)” (Androutsopoulos y cols., 2012). La AChE cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) el cual transmite las señales electroquímicas a través de las sinapsis neuronales y uniones neuromusculares. Los plaguicidas OP inhiben la AChE, fosforilándola y produciendo una acumulación del neurotransmisor ACh en las terminaciones nerviosas, resultando en una estimulación continua del impulso nervioso (Kwong, 2002; Costa, 2006). Una vez que la AChE ha sido fosforilada, puede ser reactivada o envejecer quedando irreversiblemente inactivada.

La toxicidad aguda de los plaguicidas OP ha sido bien documentada por varios investigadores (LaDou, 2004; De Silva y cols., 2006; Eskenazi y cols., 2008). Mientras que los efectos adversos a la salud derivados de la exposición crónica a los plaguicidas OP son menos conocidos (Kwong, 2002; Kamel y cols. 2003, 2007; De Silva y cols., 2006), entre estos efectos se incluyen: alteraciones neuroconductuales, efectos en el desarrollo, daños inmunológicos, efectos reproductivos, disrupción endocrina y reacciones alérgicas (Eskenazi y cols., 1999; Sanborn y cols., 2002; Eskenazi y cols., 2008).

Los plaguicidas OP (en su forma “tio”) son bioactivados mediante una desulfuración oxidativa catalizada por citocromo p450 para formar el oxón correspondiente, el cual es hidrolizado por la paraoxonasa 1 (PON1) obteniéndose como productos de reacción, los metabolitos inespecíficos dialquilfosfato y un metabolito específico dependiendo del plaguicida organofosforado en cuestión (Cocker y cols., 2002; Costa

y cols., 2003); una vez formados estos metabolitos, son eliminados por vía renal. En la Figura 1, se muestran las estructuras químicas de los seis principales metabolitos dialquilfosfato: dimetilfosfato (DMP), dietilfosfato (DEP), dimetiltiofosfato (DMTP), dietiltiofosfato (DETP), dimetilditiofosfato (DMDTP) y dietilditiofosfato (DEDTP).

Alrededor del 85% de los plaguicidas OP son degradados a algunos de los metabolitos dialquilfosfato. Por lo cual, diversos estudios han cuantificado estos metabolitos para evaluar la exposición a los plaguicidas OP (Aprea y cols., 1996a; Cocker y cols., 2002; Wessels y cols., 2003; Fenske y cols., 2000, 2005; Arcury y cols., 2007; Barr y cols., 2011). En la tabla 1 se presentan los principales plaguicidas OP y los metabolitos dialquilfosfato que son producidos en su reacción de hidrólisis.

Los metabolitos DAP han sido usualmente cuantificados por cromatografía de gases empleando diferentes detectores, tales como el detector fotométrico de flama (FPD por sus siglas en inglés), el detector nitrógeno-fósforo (NPD por sus siglas en inglés), el detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés) y el detector termiónico específico (Aprea y cols., 1996; Moate y cols., 1999; Oglobine y cols., 2001b; Petchuay y cols., 2008).

Actualmente, los métodos más utilizados para la determinación de metabolitos dialquilfosfato incluyen técnicas de detección como la espectrometría de masas (Park y cols., 1998; Hard y Angerer, 2000; Kupfermann y cols., 2004; Hemakanthi y cols., 2008) y la espectrometría de masas tandem (MS/MS por sus siglas en inglés) (Oglobine y cols., 2001; Bravo y cols., 2002, 2004), este tipo de detectores a diferencia de los mencionados en el párrafo anterior, permiten la confirmación de la identidad de los analitos de interés, mediante la comparación de sus espectros de masas con los obtenidos de estándares, aumentando la selectividad y sensibilidad del método analítico, particularmente cuando el análisis se realiza en el modo de "Monitoreo del Ión Selectivo (SIM por sus siglas en inglés). Ésto ha hecho posible alcanzar límites de

detección más bajos, permitiendo la medición de metabolitos DAP en poblaciones no-ocupacionalmente expuestas (Barr y cols., 2004).

Los metabolitos dialquilfosfato son moléculas polares y de baja volatilidad debido a su naturaleza iónica, por lo que es necesario derivatizarlos para aumentar su volatilidad antes de ser cuantificados por cromatografía de gases. Dado lo anterior, la derivatización es una etapa crítica. En la literatura, se ha reportado el uso de diversos agentes derivatizantes, algunos de los cuales presentan ciertas desventajas tales como alta toxicidad y peligrosidad, poca estabilidad, bajo rendimiento y en algunos casos interfieren con la determinación analítica de los metabolitos dialquilfosfato (Black y Muir, 2003).

Algunos de los primeros reactivos empleados en la derivatización de los metabolitos DAP fueron: diazoalcanos como el diazometano, el diazoetano y el diazopentano y aril-alquil triacenos. Posteriormente, se usaron otros que mejoraron el rendimiento y la respuesta analítica de los derivados obtenidos, entre éstos están: benciltolil triaceno, hexametildisilazano, trimetilclorosilano, bromuro de pentafluorobencilo (PFBBr por sus siglas en inglés) y 1-cloro-3-yodo propano (CIP) (Aprea y cols., 2002; Bravo y cols., 2002; 2004; Black y Muir, 2003). El hexametildisilazano y el trimetilclorosilano, tienen el inconveniente de que en la reacción química se emplea piridina, un disolvente altamente tóxico. De los agentes derivatizantes antes señalados, los más empleados en la actualidad son el PFBBr y el CIP, debido a algunas ventajas en comparación con otros reactivos. Por ejemplo, el PFBBr genera un producto de reacción para cada metabolito dialquilfosfato; mientras que otros agentes derivatizantes como el diazopentano, producen dos isómeros en el caso de los metabolitos DMTP y DETP, debido a que la alquilación se lleva a cabo tanto en el átomo de azufre como en el de oxígeno (Hard y cols., 2000). En la Figura 2 se muestra un esquema de las reacciones de derivatización de los metabolitos DAP con los derivatizantes PFBBr y CIP.



El objetivo de este trabajo fue implementar y validar un método analítico para la determinación de los 6 principales metabolitos urinarios dialquifosfato por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM), empleando dos agentes derivatizantes, el PFBBr y el CIP.

## **Materiales y métodos**

### *Reactivos*

Los estándares de DMP (97%), DEP (99%), DMTP (99.2%), DETP (99%), DMDTP (99.4%) y DEDTP (99%), y el estándar interno (EI) isotópicamente marcado del DETP (DETP-d10) con una pureza isotópica del 98% fueron obtenidos de Cerilliant CIL, Inc. Todos los disolventes utilizados fueron grado analítico con una pureza mayor del 98%. El 1-Chloro-3-iodopropano (CIP), el bromuro de 2,3,4,5,6-Pentafluorobencil (99%) (PFBBr) y el carbonato de potasio anhidro ( $K_2CO_3$ ) fueron adquiridos de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA).

### *“Orina blanco”*

La “orina blanco” fue preparada de acuerdo con el procedimiento descrito por Bravo y cols., (2002). Se colectó una muestra diaria, durante una semana de un donador voluntario no expuesto a OPs, éstas fueron combinadas en volúmenes iguales para formar una muestra compuesta. Con la finalidad de disminuir el efecto de matriz, la muestra compuesta fue diluida, con agua bidestilada desionizada en proporciones 1:1 (v/v); posteriormente ésta fue mezclada en una placa de agitación y filtrada bajo vacío a través de una membrana de 0.2  $\mu m$  y dividida en tres alícuotas, a las cuales posteriormente se les adicionó disoluciones estándares de los metabolitos dialquifosfato en diferentes concentraciones, para la obtención de los puntos de calibración y de las muestras control.

### *Disoluciones estándares “patrón”*

Disoluciones estándares “patrón” de 100, 500 y 1000 µg/L de cada metabolito DAP (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP y DEDTP) en 10 mL de metanol fueron obtenidas. Además, disoluciones estándares “patrón” de 100 y 500 µg/L del estándar interno fueron preparadas por dilución del reactivo DETP-d10. Las disoluciones obtenidas fueron divididas en dos alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Estas disoluciones fueron utilizadas para preparar los estándares de calibración y las muestras control.

### *Estándares de calibración y muestras control*

Seis estándares de calibración fueron preparados por dilución a partir de las disoluciones estándares “patrón” de los metabolitos dialquilfosfato individuales (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP y DEDTP) en 5 mL de “orina blanco”, de acuerdo con los siguientes intervalos de concentración: de 1 a 200 µg/L para el DMP, DMTP, DEP y DETP; de 0.25 a 50 µg/L para el DMDTP; y de 0.5 a 100 µg/L para el DEDTP. La concentración del estándar interno en las disoluciones de calibración y muestras control fue de 12.5 µg/L.

Tres muestras control fueron preparadas por dilución a partir de las disoluciones estándares “patrón” de los metabolitos dialquilfosfato individuales (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP y DEDTP) en 5 mL de “orina blanco”. a) muestra “control bajo” (CB) conteniendo de 7.5 a 10 µg/L de DMP, DEP, DMTP y DETP; de 2.5 a 3.75 µg/L de DMDTP y de 3.75 a 5 µg/L de DEDTP. b) muestra “control medio” (CM) conteniendo de 15 a 32 µg/L de DMP, DEP, DMTP y DETP; de 7.5 a 8 µg/L de DMDTP y de 7.5 a 16 µg/L de DEDTP. c) muestra “control alto” (CA) conteniendo de 30 a 80 µg/L de DMP, DEP, DMTP y DETP; de 15 a 20 µg/L de DMDTP y de 15 a 40 µg/L de DEDTP. Los estándares de calibración y las muestras control fueron divididas en alícuotas de 750 µL y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### *Preparación de la muestra*

El procedimiento empleado para la preparación de las muestras, se basó en el método descrito por Valcke y cols., (2006) con la diferencia de que éstos investigadores emplearon un volumen de muestra de 500  $\mu\text{L}$ . Se adicionó el estándar interno (DETP-d10) a una concentración de 12.5  $\mu\text{g/L}$  a alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada estándar de calibración, muestra control, blanco de método y muestra problema. Posteriormente, se adicionó 10  $\mu\text{L}$  del agente derivatizante (CIP o PFBBr) y 200 mg de carbonato de potasio y se les sometió a calentamiento a 70°C, 80°C y 90°C durante 2 h en baño seco.

Los ésteres cloropropil y pentafluorobencil fosfato fueron extraídos dos veces con 7 mL de una mezcla de cloruro de metileno en hexano (8% v/v). El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo y evaporado a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno a 30°C, en un Turvovap LV (Zymark, Hopkinton, MA). El residuo fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de cloruro de metileno/hexano y evaporado a 50  $\mu\text{L}$  bajo una corriente de nitrógeno a 30°C. Finalmente, el extracto fue transferido a un microvial cromatográfico, el cual fue sellado y analizado por CG/EM. El procedimiento de extracción de los metabolitos dialquilfosfato de las muestras de orina es resumido en la Figura 3.

### *Condiciones CG/EM*

Un cromatógrafo de gases (CG) Agilent 6850 equipado con un automuestreador Agilent 6850 y un detector selectivo de masas (EM) Agilent 5973N fueron empleados para la separación y análisis de los metabolitos dialquilfosfato. Se empleó una columna capilar HP-5MS marca J & W (Folsom, CA, USA) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película (5% fenil-95% metilpolisiloxano). Una alícuota de 2  $\mu\text{L}$  de cada extracto fue inyectado en el modo splitless. La temperatura del puerto de inyección fue mantenida en 270°C. El programa de

temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial de 60°C (mantenida por un minuto), rampa de 10°C/min hasta 135°C (mantenida por 10 min), rampa de 5°C/min hasta 160°C (mantenida por 10 min), rampa de 25°C/min hasta 250°C y finalmente una rampa de 100°C/min hasta 300°C (mantenida 4 min). Como gas acarreador se utilizó helio con una pureza de 99.999% (Praxair; Guadalajara, Jalisco, México) a un flujo constante de 0.6 mL/min. El EM fue operado en el modo de ionización de impacto de electrones a 70 eV y las temperaturas de la línea de transferencia y de la fuente de ionización fueron mantenidas en 150°C y 230°C, respectivamente. Al menos dos iones de cada metabolito dialquilfosfato fueron monitoreados en el modo “Monitoreo del Ión Selectivo” (SIM por sus siglas en inglés).

### *Cuantificación*

Las curvas de calibración de cada metabolito dialquilfosfato fueron construidas graficando las concentraciones de seis niveles (intervalo: 0.25 a 200 µg/L en orina) contra sus respectivos factores de respuesta, los cuales fueron calculados como el área bajo la curva obtenida del cromatograma del ión seleccionado de cada metabolito dialquilfosfato dividido entre el área bajo la curva obtenida del cromatograma del ión seleccionado del estándar interno (DETP-d10). Al menos cinco determinaciones repetidas fueron realizadas para cada concentración de la curva de calibración. Mediante análisis de regresión lineal se obtuvieron la pendiente y el intercepto de las curvas de calibración. Previo al análisis CG/EM de las muestras, un estándar de concentración conocida fue inyectado para verificar que la resolución cromatográfica y la masa espectral de cada metabolito dialquilfosfato fueran adecuadas.

La identificación de los metabolitos dialquilfosfato se realizó en función de sus iones moleculares y un segundo ión característico; así como de sus tiempos de retención. La cuantificación de cada metabolito se efectuó interpolando su área bajo la curva (respuesta) en la curva de calibración correspondiente.

## *Validación*

Con la finalidad de proveer resultados confiables, se realizó la validación del método analítico. Los parámetros evaluados fueron: selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección y porcentaje de recobro.

La selectividad se refiere a la capacidad de un método analítico para identificar un analito particular cuando éste se encuentra en una mezcla (EURACHEM, 1998). Para evaluarla, se prepararon disoluciones en orina blanco conteniendo una mezcla de los metabolitos dialquilfosfato (DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP y DEDTP), en tres diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/L). Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el procedimiento de preparación descrito anteriormente.

La linealidad del método se refiere a la capacidad de obtener respuestas analíticas, directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en cuestión en un intervalo específico de concentración. Este parámetro, fue determinado mediante el análisis de cinco réplicas de seis niveles de concentración en el intervalo de 0.25 a 200 µg/L dependiendo del metabolito dialquilfosfato. Las curvas de calibración fueron graficadas y se calcularon los coeficientes de correlación, pendientes e interceptos al origen para cada DAP.

El límite de detección de un método (LDM), es la mínima concentración de un analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones establecidas (EURACHEM, 1998). El LDM fue calculado para cada metabolito dialquilfosfato como  $3S_B/m$ , donde  $S_B$  fue estimada como el intercepto al origen "b" y "m" como la pendiente, ambos parámetros fueron obtenidos por análisis de regresión (Miller y Miller; 2002) de una curva de calibración construida con niveles de 0.25 a 200 µg/L dependiendo del metabolito dialquilfosfato.

Para evaluar el procedimiento de extracción, se adicionaron a partir de disoluciones “patrón”, concentraciones conocidas (en el intervalo de 2.5 a 80 µg/L) de una mezcla de DAP a alícuotas de “orina blanco” y se calculó el recobro como el cociente entre la concentración medida y la concentración adicionada de cada DAP (EURACHEM, 1998). El porcentaje de recobro obtenido fue comparado con los criterios de aceptación establecidos para este parámetro (60% a 120% para 1 a 10 µg/L y 70% a 120% para 10 a 100 µg/) por la AOAC Peer Verified Methods program (AOAC 1999, 2000).

La precisión se refiere al grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas, siendo las medidas más comunes de ésta, la “repetibilidad” y la “reproducibilidad” (EURACHEM, 1998). La primera, se obtiene con el mismo método, laboratorio y operador, empleando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos; mientras que la segunda, aunque se lleva a cabo con el mismo método, se realiza en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos. La repetibilidad fue evaluada mediante el cálculo del coeficiente de variación (%CV) de mediciones repetidas (n=5) de muestras a las que se les adicionaron diferentes concentraciones de cada uno de los metabolitos DAP. El criterio de aceptación para este parámetro fue establecido en 16% a 23%, dependiendo de la concentración analizada (AOAC 1999, 2000). Por otro lado, la reproducibilidad del método fue determinada por el %CV de la pendiente obtenida de cinco curvas de calibración independientes, de cada uno de los DAP en un intervalo de concentración de 0.25 a 200 µg/L dependiendo del DAP.

Para evaluar la estabilidad de los metabolitos DAP se prepararon muestras control en “orina blanco”, en concentraciones de 2.5 a 10 µg/L (control bajo) y de 20 a 80 µg/L (control alto) dependiendo de cada DAP. Estas muestras se dividieron en alícuotas, se almacenaron a -20°C y se analizaron durante el tiempo que duró el estudio (seis meses). Los porcentajes de error de las concentraciones medidas en las muestras “control bajo”, oscilaron de 0.1% a 28.3%, dependiendo del DAP; mientras que en las muestras “control alto” fueron de 0.5% a 18.9%. Alrededor del 60% de las

concentraciones medidas estuvieron por debajo de la concentración adicionada (intervalo: del 45% al 70%); y las que estuvieron por arriba, oscilaron del 30% al 50%, dependiendo del DAP.

El método analítico implementado fue utilizado para medir los metabolitos dialquifosfato en las muestras de orina obtenidas de niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad de una localidad agrícola de México (Ramírez-Jiménez y cols., 2014). Para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados de éstas, se incluyó una muestra control en cada lote de 11 muestras. Además de alícuotas de “orina blanco” a las cuales únicamente se les adicionó el estándar interno (blancos de método). Los blancos de método, las muestras control y las muestras problema fueron sometidas al procedimiento de extracción descrito anteriormente.

## **Resultados y discusión**

En la actualidad, los organofosforados (OPs) se encuentran entre los plaguicidas más usados en México, principalmente en la agricultura. Este tipo de plaguicidas son neurotóxicos. Una de las formas más comunes de evaluar la exposición a OPs es a través de la cuantificación de los seis principales metabolitos dialquifosfato en orina (Fenske y cols., 2005; Barr y cols., 2011). Este método proporciona una estimación de la exposición integral a plaguicidas OP (Lu y cols., 2001).

En el presente estudio, fue implementado y validado un método para la determinación de metabolitos urinarios DAP en niños y adolescentes de una localidad agrícola, basado en el procedimiento descrito por Valcke y cols., (2006). Este método, permitió la medición de los seis principales metabolitos dialquifosfato en una sola corrida cromatográfica, usando el PFBBBr como reactivo derivatizante y utilizando un volumen pequeño de muestra de orina (200 µL).

En este trabajo se emplearon, el 1-Chloro-3-iodopropano (CIP) y el bromuro de 2,3,4,5,6-Pentafluorobencilo (PFBB<sub>r</sub>), éstos son dos de los agentes derivatizantes más empleados en la alquilación de los metabolitos dialquifosfato (Bravo y cols., 2002, 2004; Valcke y cols., 2006; Hemakanthi y cols., 2008), debido a que éstos proporcionan mejores límites de detección (Reddersen y Heberer, 2003), además de algunas ventajas en comparación con otros reactivos.

La derivatización de los DAP es una reacción termosensible, ya que los metabolitos que contienen azufre son degradados a altas temperaturas a sus respectivos metabolitos oxigenados (DMP y DEP), sobreestimándose la concentración de éstos (Aprea y cols., 1996b; Moate y cols., 1999; Oglobline y cols., 2001a, 2001b). Por ello la optimización de la temperatura de reacción es crítica, principalmente para aquellos metabolitos que contienen azufre (DMTP, DMDTP, DETP y DEDTP); mientras que los metabolitos DMP y DEP requieren una temperatura más alta para la formación de la estructura éster.

Además del empleo de CIP y PFBB<sub>r</sub>, se evaluaron tres diferentes temperaturas (70°C, 80°C y 90°C) para determinar la temperatura de reacción más adecuada para la obtención de los compuestos éster de todos los metabolitos DAP. En la Tabla 2, se presenta el área bajo la curva (ABC) del pico cromatográfico obtenido, de acuerdo con el agente derivatizante y con la temperatura de reacción. Con respecto a la duración de la reacción de derivatización, además del tiempo de 2 horas, se probaron 4 horas (a 60°C), 15 horas (a 40°C) y 24 h (a temperatura ambiente, alrededor de 25°C). Los rendimientos obtenidos en estas pruebas fueron menores a las de 70°C, 80°C y 90°C por 2 h (datos no mostrados).

En el presente estudio, todos los metabolitos dialquifosfato fueron identificados cuando fue utilizado el PFBB<sub>r</sub> como agente derivatizante; no así para el caso del CIP, los metabolitos DMP y DEP no fueron identificados (Figura 4).



En el presente estudio, los ésteres de pentafluorobencilo de los metabolitos DMP y DEP presentaron un mayor rendimiento a la temperatura de 90°C/2 h; mientras que los ésteres de los demás metabolitos tuvieron mejor rendimiento cuando la reacción se realizó a la temperatura de 70°C/2 h (Tabla 2), aunque estas diferencias fueron significativas solo para los ésteres pentafluorobencil fosfato de los metabolitos DMP, DEP, DMTP y DMDTP (t-Student pareada,  $p < 0.05$ ). En el caso de los ésteres cloropropil fosfato de los metabolitos dialquilfosfato que contienen azufre, se observó una tendencia similar (Tabla 2), pero las diferencias solo fueron significativas para el DETP y marginalmente significativa para el DMTP (t-Student pareada,  $p < 0.05$ ).

Las condiciones de derivatización de 70°C/2 h de acuerdo con Valcke y cols., (2006) ofrece los mejores resultados entre la reacción completa de DMP y DEP y la menor pérdida de los metabolitos que contienen azufre. Algunos estudios previos han reportado reacciones de derivatización de metabolitos dialquilfosfato en un solo paso, pero que requirieron tiempos de reacción más largos tales como 40°C por 15 h, 60°C por 4 h y 60°C por 3 h (Hardt y Angerer, 2000; Oglobline y cols., 2001a, 2001b; Bravo y cols., 2004). Otros estudios han llevado a cabo la reacción de derivatización a dos temperaturas: a 90°C durante 2 h para obtener los ésteres de los metabolitos DMP y DEP; y a temperatura ambiente para los metabolitos que contienen azufre (Moate y cols., 1999).

En el presente estudio, los metabolitos dialquilfosfato fueron analizados usando un detector selectivo de masas en el modo de Monitoreo del Ion Selectivo (SIM) empleando al menos dos iones característicos de cada metabolito. En la Tabla 3, se presentan los tiempos de retención y los iones monitoreados para la identificación y cuantificación de los derivados cloropropil y pentafluorobencil fosfato de cada metabolito DAP. Los ésteres cloropropil fosfato tuvieron tiempos de retención de 18.45 min para el DMTP, 23.27 min para el DETP, 22.18 para el DMDTP, 26.20 min para el DEDTP y 23.00 min para el DETP-d10; los metabolitos DMP y DEP no fueron identificados. Por otro lado, los ésteres pentafluorobencil fosfato presentaron los siguientes tiempos de

retención: 16.38 min para el DMP, 21.38 min para el DEP, 23.65 min para el DMTP, 28.04 min para el DETP, 27.21 min para el DMDTP, 32.60 min para el DEDTP y 27.58 min para el DETP-d10.

En la Figura 5, se presentan los cromatogramas característicos de los ésteres cloropropil fosfato (a) y pentafluorobencil fosfato (b) de dos muestras de orina a las que se les adicionaron disoluciones patrón de una mezcla de los DAP. Todos los derivados DAP-PFB fueron identificados, mientras que los ésteres cloropropil fosfato del DMP y DEP no fueron identificados.

Los espectros de masas se obtuvieron mediante el procesamiento de disoluciones estándar individuales de 500 µg/L en metanol y muestras de “orina blanco” a las cuales se les adicionó 500 µg/L de cada metabolito DAP. Los derivados éster obtenidos, fueron analizados por CG/EM en el modo SCAN. En la Figura 5, a manera de ejemplo se presentan los espectros de masas de los esterios cloropropil y pentafluorobencil fosfato del metabolito DMTP.

Las curvas de calibración fueron obtenidas representando gráficamente la relación de la respuesta cromatográfica de cada metabolito. El método mostró una buena linealidad para cada metabolito, los coeficientes de correlación oscilaron entre 0.989 a 0.999 y 0.993 a 0.997 para los derivados DAP-CIP y DAP-PFB, respectivamente. En la Tabla 4, se presentan los parámetros de calibración de los ésteres cloropropil y pentafluorobencil fosfato de los metabolitos DAP.

Para fines de comparación, las curvas de calibración del par de ésteres DAP-CIP y DAP-PFB de los metabolitos DMTP, DMDTP, DETP y DEDTP fueron representadas en una misma gráfica (Figura 6). Las pendientes de las curvas de calibración de los ésteres cloropropil fosfato fueron mayores que las de sus correspondientes derivados DAP-PFB, lo que implica que la sensibilidad del método fue mayor cuando se empleó

el CIP; sin embargo, los metabolitos DMP y DEP no pudieron ser identificados cuando se empleó este derivatizante.

En la Tabla 4 se muestran los LDMs, con respecto a los ésteres cloropropil fosfato, éstos oscilaron de 0.10 a 1.10  $\mu\text{g/L}$ , mientras que los de los ésteres pentafluorobencil fosfato, estuvieron entre 0.27 y 1.49  $\mu\text{g/L}$ . Estos LDMs fueron más altos, que aquellos reportados por otros estudios que utilizaron la técnica CG/EM-EM: 0.04 a 0.5  $\mu\text{g/L}$  (Oglobine y cols., 2001b) y 0.1 a 0.6  $\mu\text{g/L}$  (Bravo y cols., 2004), debido a la mayor selectividad y sensibilidad que se logra con un detector doble de masas. Por otro lado, los LDMs de este estudio, fueron menores que los reportados por otros autores que emplearon CG-FPD (Oglobine y cols., 2001a) y similares a los reportados por Hardt y Angerer (2000), quienes usaron un equipo similar (CG/EM).

En la Tabla 5, se presentan los porcentajes de recobro y coeficientes de variación del método analítico en función del agente derivatizante empleado (CIP y PFBBr). Las concentraciones de los controles analizados fueron de 3.5 a 15  $\mu\text{g/L}$  y de 2.5 a 80  $\mu\text{g/L}$  cuando se emplearon como derivatizantes el CIP y el PFBBr, respectivamente. Se obtuvieron mejores porcentajes de recobro (86% a 104%) cuando se utilizó el CIP, que cuando se empleó el PFBBr (78% a 97%). Con respecto a los coeficientes de variación, estos oscilaron de 2.1% a 15.2% para el CIP y de 5.3% a 17.8% para el PFBBr, todos los datos estuvieron dentro del criterio de aceptación establecido (AOAC 1999, 2000).

Los resultados obtenidos tanto del porcentaje de recobro como del coeficiente de variación, cuando se empleó tanto el CIP como el PFBBr como agentes derivatizantes, son comparables con aquellos reportados por otros estudios. Hardt y Angerer (2000), reportaron recobros que oscilaron de 71% a 114% y coeficientes de variación de 7.9 a 17%, empleando extracción líquido-líquido y análisis CG/EM. Por otro lado, Bravo y cols., (2002) reportaron coeficientes de variación menores del 20% y Oglobline y cols., (2001a, 2001b) del 4% al 14%; en estos estudios se utilizaron la destilación azeotrópica y la liofilización para la preparación de la muestra y el análisis CG/EM-EM

para la cuantificación de los metabolitos dialquilfosfato. Además, Aprea y cols., (1996) reportaron coeficientes de variación del 8% al 12% y Moate y cols., (1999) de hasta 46% con un % de recobro que osciló de 58% a 119%.

En el presente estudio, el volumen de orina usado en la preparación de la muestra fue pequeño (200  $\mu$ L), el empleo de volúmenes más grandes podría requerir el uso de técnicas como la liofilización, para eliminar el agua de éstas (Oglobline y cols., 2001; Bravo y cols., 2004) antes de la etapa de derivatización, paso clave para asegurar una reacción completa en la formación de la estructura éster (Aprea y cols., 1996).

El método implementado en este trabajo, fue empleado para evaluar la exposición a plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes que viven en una localidad agrícola de México (Ramírez-Jiménez y cols., 2014). Para ello, se colectaron muestras de orina de niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad durante dos períodos de aplicación de plaguicidas. Debido a que no se dispuso de materiales de referencia estándar (SRM por sus siglas en inglés), se prepararon muestras de “orina blanco” adicionadas con los metabolitos DAP de interés en dos niveles de concentración. Control bajo: conteniendo 2.5  $\mu$ g/L de DMDTP, 5.0  $\mu$ g/L de DEDTP y 10  $\mu$ g/L de DMP, DEP, DMTP y DETP. Control alto: conteniendo 20  $\mu$ g/L de DMDTP, 40  $\mu$ g/L de DEDTP y 80  $\mu$ g/L de DMP, DEP, DMTP y DETP. Éstas fueron divididas en alícuotas y almacenadas a -20°C. En cada lote de 11 muestras se incluyó una de estas muestras control, para asegurar la confiabilidad de los resultados. Los porcentajes de recobro oscilaron de 71.7% a 118.4% y los coeficientes de variación de 6.5% a 17.1% para el control bajo; mientras que para el control alto, los porcentajes de recobro y variación fueron de 74.3% a 114.8% y de 5.0% a 11.6%, respectivamente. Los porcentajes de recobro estuvieron dentro de la media  $\pm$  2DE.

Para el análisis de las muestras de orina, se seleccionó al PFBBR como agente derivatizante, debido a que éste tiene la ventaja de generar solamente un producto de reacción con cada metabolito (Oglobline y cols., 2001a). Similarmente a Hemakanthi y

cols., (2008), se observó que el exceso de PFBBr en la muestra es indeseable, ya que produce una pérdida de sensibilidad en el sistema CG/EM después de la inyección de un lote de alrededor de 50 muestras, debido a que este reactivo daña los componentes de la fuente, la columna y el detector, por lo cual una etapa de limpieza previa al análisis CG/EM, es recomendable para eliminar el exceso de PFBBr.

El DMTP fue el principal metabolito dialquilfosfato detectado en las muestras de orina de los niños y adolescentes en ambos periodos de muestreo; en el periodo de baja aplicación de plaguicidas, la frecuencia de éste fue de 92.1% y en el período de alta aplicación fue de 99.1% (Ramírez-Jiménez y cols., 2014). En la Figura 7, se muestra un cromatograma de la muestra de orina de un niño, cuya vivienda se encuentra cerca de los campos agrícolas.

En conclusión, los resultados aquí presentados, indican que fue mejor el PFBBr que el CIP como agente derivatizante; además de que el método analítico fue confiable y los LDMs fueron lo suficientemente bajos para determinar la exposición a OPs en niños y adolescentes mexicanos no ocupacionalmente expuestos, residentes en una localidad agrícola.

### **Declaración de Conflicto de Intereses**

Los autores declaran que no tienen competencia de intereses financieros.

### **Reconocimientos**

Este estudio fue apoyado por PROMEP SES-2009-UASLP-CA-45, CONACYT-México (Beca tesis No. 19922) y por el Instituto Politécnico Nacional a través del COTEBAL.

## Referencias

- Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M., 2012. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*. Doi: 10.1016/j.tox.2012.09.011.
- AOAC/FAO/IAEA/IUPAC., 1999. Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level concentrations of Organic Chemicals.
- AOAC International, 2000. Method Validation Programs (OMA/PVM Department), including Appendix D: Guidelines for collaborative Trends study procedures to validate characteristics of a method of analysis.
- Aprea, C., Sciarra, G., Lunghini, L., 1996a. Analytical method for the determination of urinary alkylphosphates in subjects occupationally exposed to organophosphorus pesticides and in the general population. *J. Anal. Toxicol.* 20, 559-563.
- Aprea, C., Sciarra, G., Orsi, D., Boccalon, P., Sartorelli, P., Sartorelli, E., 1996b. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). *Sci. Total Environ.* 177, 37-41.
- Aprea, C., Colosio, C., Mammone, T., Minoia, C., Maroni, M., 2002. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 769, 191-219.
- Arcury, T. A., Grzywacz, J. G., Barr, D. B., Tapia, J., Chen, H., Quandt, S. A., 2007. Pesticide Urinary Metabolite Levels of Children in Eastern North Carolina Farmworker Households. *Environ Health Perspect*, 115, 1254–1260.
- Barr, D.B., Needham, L. L., 2002. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J Chromatogr B* 778, 5–29.
- Barr, D. B., Wong, L., Bravo, R., Weerasekera, G., Odetokun, M., Restrepo, P., et al., 2011. Urinary Concentrations of Dialkylphosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2004. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 3063-3098.
- Black, R.M., Muir, B., 2003. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. *J. Chromatogr. A*, 1000, 253–281.
- Bravo, R., Driskell, W.J., Whitehead, R.D., Needham, L.L., and Barr, D.B., 2002. Quantification of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS/MS with isotope dilution method. *J Anal Toxicol.* 26, 245–252.
- Bravo, R., Caltabiano, L.M., Weerasekera, G., Whitehead, R.D., Fernandez, C., Needham, L.I., Bradman, A. and Barr D.B., 2004. Measurement of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine using lyophilization with gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 14, 249–259.
- Cocker, J., Mason, H.G., Garfitt, S.J., Jones, K., 2002. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol Lett* 134, 97-103.

- Costa, L.G., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2003. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 37–45.
- Costa, L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366, 1-13.
- Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R., 1999. Exposure of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect* 107(suppl 3), 409–419.
- EURACHEM, Eurachem Guide, 1998. Europa Analytical Chemistry. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Disponible en <http://www.eurachem.ul.pt>
- Fenske, R.A., Lu, C., Simcox, N.J., Loewenherz, J.T., Moate, T.F., Allen, E.H., Kissel, J.C., 2000. Strategies for assessing children's organophosphorus pesticide exposures in agricultural communities. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 10, 662–671.
- Fenske, R.A., Lu, C., Curl, C.L., Shirai, J.H., Kissel, J.C., 2005. Biologic Monitoring to Characterize Organophosphorus Pesticide Exposure among Children and Workers: An Analysis of Recent Studies in Washington State. *Environ Health Perspect* 113, 1651-1657.
- Hardt, J., Angerer, J., 2000. Determination of dialkyl phosphates in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 24, 678-684.
- Hemakanthi De Alwis, G.K., Needham, L.L., Barr, D.B., 2008. Determination of Dialkylphosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides in Human Urine by Automated Solid-Phase Extraction, Derivatization, and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology.* 32, 722-727.
- Hernandez, F., Sancho, J.V., and Pozo, O.J. 2002. Direct determination of alkyl phosphates in human urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1766–1773.
- Horwitz, W., and Albert, R.J., 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 89(4), 1095- 1109.
- Kapka-Skrzypczak, L., Cyranka, M., Skrzypczak, M., Kruszewski, M., 2011. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure –state of the art *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 18(2), 294-303
- Kupfermann, N., Schmoldt, A., Steinhart, H., 2004. Rapid and Sensitive Quantitative Analysis of Alkyl Phosphates in Urine after Organophosphate Poisoning. *Journal of Analytical Toxicology.* 28, 242-248.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 24:144–149.
- Lu, C., Knutson, D. E., Fisker-Anderssen, J., Fenske, R., 2001. Biological monitoring survey of organophosphorus pesticide exposure among preschool children in the Seattle metropolitan area. *Environ Health Perspect*, 109(3), 299–303.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall, Madrid, 2002. Pp. 113-126.

- Moate, T.F., Lu, C., Fenske, R.A., Hahne, R.M.A., Kalman, D.A., 1999. Improved cleanup and determination of dialkylphosphates in the urine of children exposed to organophosphorus insecticides. *J Anal Toxicol* 23, 230–236.
- Oglobline, A.N., Elimelakh, H., Tattam, B., Geyer, R., O'Donnell, G.E., Holder, G. 2001a. Negative ion chemical ionization GC/MS-MS analysis of dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in urine of non-occupationally exposed subjects. *Analyst* 126, 1037–1041.
- Oglobline A.N., O'Donnell G.E., Geyer R., Holder G.M., and Tattam B., 2001b. Routine gas chromatographic determination of dialkylphosphate metabolites in the urine of workers occupationally exposed to organophosphorus insecticides. *J Anal Toxicol* 25, 153–157.
- Park, S.S., Pyo, H., Lee, K., Park, S., Park, T.K., 1998. The analysis of Common Metabolites of Organophosphorus Pesticides in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* 19 (1), 45–50
- Petchuay, Ch., Thoumsang, S., Visuthismajarn, P., Vitayavirasak, B., Buckley, B., Hore, P., Borjan, M., Robson, M., 2008. Analytical Method Developed for Measurement of Dialkylphosphate Metabolites in Urine Collected from Children Non-Occupationally Exposed to Organophosphate Pesticides in an Agricultural Community in Thailand. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81, 401–405.
- Ramírez-Jiménez, R., Mejía-Saucedo, R., Calderón-Hernández, J., Montero-Montoya, R., Yáñez-Estrada, L., 2014. Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1(4), 87–97.
- Reddersen, K., Heberer, T., 2003 Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC–MS) detection. *J. Sep. Sci.* 26, 1443–1450.
- Rossé, A.D., Harynuk, J.J., 2010. Methodology for the derivatization and quantification of dialkyl phosphate esters in petroleum samples. *Anal. Methods*, 2, 1176–1179
- Sanborn, M.D., Cole, D., Abelsohn, A., Weir, E., 2002. Identifying and managing adverse environmental health effects: 4. Pesticides. *CMAJ*, 166 (11), 1431–1436.
- Valcke, M., Samuel, O., Bouchard, M., Dumas, P., Belleville, D., Tremblay, C., 2006. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada. *Int Arch Occup Environ Health*, 79, 568-577.
- Wessels, D., Barr, D. B., Mendola, P., 2003. Use of Biomarkers to Indicate Exposure of Children to Organophosphate Pesticides: Implications for a Longitudinal Study of Children's. *Environ Health Perspect*, 111(16), 1939-1946.



Tabla1

Plaguicidas OP más comunes y sus metabolitos dialquilfosfato inespecíficos

Plaguicida organofosforado	Metabolito dialquilfosfato					
	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
Azinfos metílico	x	x	x			
Cloretoxifos				x	x	
Clorpirifos				x	x	
Clorpirifos metílico	x	x				
Coumafos				x	x	
Diclorvos (DDVP)	x					
Diazinón				x	x	
Dicrotofos	x					
Dimetoato	x	x	x			
Disulfotón				x	x	x
Etión				x	x	x
Fenitrotión	x	x				
Fentiión	x	x				
Isazafo metílico	x	x				
Malatión	x	x	x			
Metidatión	x	x	x			
Paratión metílico	x	x				
Naled	x					
Oxidemetón metílico	x	x				
Paratión				x	x	
Forato				x	x	x
Fosmet	x	x	x			
Pirimifós metílico	x	x				
Sulfotep				x	x	
Temefos	x	x				

Tabla1  
Continuación

Plaguicida organofosforado	Metabolito dialquilfosfato					
	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
Terbufos				x	x	x
Tetraclorvinfos	x					

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato.  
Fuente: Wessels y cols., 2003.

Tabla 2

Área bajo la curva (ABC) obtenida del pico cromatográfico de acuerdo al agente derivatizante y a la temperatura de reacción empleada.

DAP	Temperatura de reacción	DAP-CIP			DAP-PFB		
		ABC	Comparación	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	ABC	Comparación	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
DMP	70°C	NI	NI	NI	238 ± 128	70 < 80	0.139
	80°C	NI	NI	NI	344 ± 206	70 < 90	0.076
	90°C	NI	NI	NI	550 ± 287	80 < 90	0.048
DMTP	70°C	421 ± 212	70 > 80	0.051	1624 ± 977	70 > 80	0.016
	80°C	295 ± 161	70 > 90	0.089	1332 ± 913	70 > 90	0.647
	90°C	275 ± 132	80 > 90	0.367	1570 ± 803	80 < 90	0.064
DMDTP	70°C	1402 ± 811	70 > 80	0.161	576 ± 421	70 > 80	0.018
	80°C	1261 ± 699	70 > 90	0.219	534 ± 410	70 > 90	0.41
	90°C	1192 ± 609	80 > 90	0.344	553 ± 377	80 < 90	0.456
DEP	70°C	NI	NI	NI	1081 ± 860	70 < 80	0.037
	80°C	NI	NI	NI	1556 ± 1022	70 < 90	0.02
	90°C	NI	NI	NI	1781 ± 1032	80 < 90	0.001
DETP	70°C	1497 ± 949	70 > 80	< 0.001	1065 ± 769	70 > 80	0.062
	80°C	1320 ± 945	70 > 90	0.114	991 ± 736	70 > 90	0.048
	90°C	1194 ± 758	80 > 90	0.371	920 ± 712	80 > 90	0.035

Tabla 2

Continuación

DAP	Temperatura de reacción	DAP-CIP			DAP-PFB		
		ABC	Comparación	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	ABC	Comparación	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
DEDTP	70°C	1747 ± 1222	70 > 80	0.313	618 ± 440	70 > 80	0.37
	80°C	1628 ± 1070	70 > 90	0.185	610 ± 452	70 > 90	0.331
	90°C	1639 ± 1129	80 < 90	0.784	605 ± 458	80 > 90	0.27

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato. DAP-CIP: ésteres cloropropil fosfato. DAP-PFB: ésteres pentafluorobencil fosfato. ABC: Área bajo la curva del pico cromatográfico expresada como media ± desviación estándar (n = 3). NI: metabolito dialquilfosfato no identificados. <sup>a</sup> Evaluado por la prueba *t*-Student pareada (*p*<0.05).

Tabla 3

iones y tiempos de retención usados para la identificación y cuantificación de los derivados DAP-CIP y DAP-PFB de los metabolitos dialquilfosfato

Metabolito	DAP-CIP		DAP-PFB	
	Tiempo de retención (min) <sup>a</sup>	Iones (m/z)	Tiempo de retención (min) <sup>a</sup>	Iones (m/z)
DMP	NI	NI	16.38 ± 0.05	306, 110
DMTP	18.45 ± 0.62	218, 142	23.65 ± 0.08	322, 110
DMDTP	22.18 ± 0.33	234, 158	27.21 ± 0.16	338, 157
DEP	NI	NI	21.38 ± 0.09	334, 258
DETP	23.27 ± 0.32	246, 170	28.04 ± 0.14	350, 138
DEDTP	26.20 ± 0.36	262, 186	32.60 ± 0.25	366, 185
DETP-d10	23.00 ± 0.35	256, 180	27.58 ± 0.17	360, 148

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato. DAP-CIP: ésteres cloropropil fosfato. DAP-PFB: ésteres pentafluorobencil fosfato. Temperatura de reacción empleada para la obtención del éster: 70°C/2 h. <sup>a</sup> Valor expresado como la media ± desviación estándar (n = 3). NI: metabolito dialquilfosfato no identificado.

Tabla 4

Linealidad y límites de detección del método obtenidos al emplear los agentes derivatizantes CIP y PFBBr.

Parámetro	DMP	DEP	DMTP	DETP	DMDTP	DEDTP
DAP-CIP						
m	NI	NI	0.309	0.521	1.235	1.287
b	NI	NI	0.181	0.045	0.056	0.099
r	NI	NI	0.989	0.999	0.999	0.998
LDM (µg/L)	NI	NI	1.10	0.21	0.070	0.46
DAP-PFB						
m	0.132	0.289	0.206	0.205	0.436	0.247
b	0.022	0.018	0.087	0.004	0.008	0.003
r	0.995	0.997	0.993	0.997	0.997	0.997
LDM (µg/L)	1.36	1.07	1.49	0.98	0.27	0.52

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato. DAP-CIP: ésteres cloropropil fosfato. DAP-PFB: ésteres pentafluorobencil fosfato. Temperatura de reacción empleada para la obtención del éster: 70°C/2 h. m = pendiente de la curva. b = intercepto. r = coeficiente de correlación. LDM = límite de detección del método. Estándar interno (DETP-d10): 12.5 µg/L. Intervalo lineal: 1 a 200 µg/L (DMP, DEP, DMTP y DETP); 0.5 a 100 µg/L (DEDTP); y 0.25 a 50 µg/L (DMDTP). Valores expresados como la media aritmética (n = 5). NI: metabolito dialquilfosfato no identificado.

Tabla 5

Porcentajes de recobro y coeficientes de variación de muestras control, empleando dos agentes derivatizantes (CIP y PFBBR).

Metabolito	Control	DAP-CIP			DAP-PFB		
		µg/L	% recobro	%CV	µg/L	% recobro	%CV
DMP	bajo	NI	NI	NI	10	77.9	8.2
	medio	NI	NI	NI	32	93.3	15.4
	alto	NI	NI	NI	80	96.9	9.7
DEP	bajo	NI	NI	NI	10	81.6	9.9
	medio	NI	NI	NI	32	95.9	5.3
	alto	NI	NI	NI	80	88.8	5.8
DMTP	bajo	7.5	85.9	15.2	10	80.2	17.8
	medio	15	92.6	4.6	32	93.2	9.4
	alto	30	95.9	5.0	80	92	5.7
DETP	bajo	7.5	96	7.1	10	82.8	8.4
	medio	15	94.6	4.8	32	91.8	10.6
	alto	30	97.3	4.0	80	93.5	5.4
DMDTP	bajo	3.75	97.9	12.2	2.5	94.4	16.4
	medio	7.5	96	2.1	8	90.3	5.8
	alto	15	100.1	5.7	20	92.9	12.4
DEDTP	bajo	3.75	103.7	12.2	5	92.1	10.0
	medio	7.5	94.6	5.6	16	87.6	11.8
	alto	15	94.2	3.3	40	97.3	8.1

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato. DAP-CIP: ésteres cloropropil fosfato. DAP-PFB: ésteres pentafluorobencil fosfato. Temperatura de reacción empleada para la obtención del éster: 70°C/2 h. Valores expresados como la media aritmética (n = 5). NI: metabolito dialquilfosfato no resuelto.

## Leyenda de Figuras

### Figura 1

Estructuras químicas de los 6 principales metabolitos dialquilfosfato.

DMP: dimetilfosfato; DMTP: dimetiltiofosfato; DMDTP: dimetilditiofosfato; DEP: dietilfosfato; DETP: dietiltiofosfato; DEDTP: dietilditiofosfato.

### Figura 2

Reacciones de derivatización de los metabolitos dialquilfosfato con: a) 1-Chloro-3-iodopropano (CIP) y b) Bromuro de pentafluorobencilo (PFBBR).

R = CH<sub>3</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Fuente: Bravo y cols., 2002, 2004.

### Figura 3

Procedimiento de preparación de las muestras urinarias para el análisis de metabolitos dialquilfosfato.

HEX/DCM: hexano/cloruro de metileno. EI: Estándar interno (DETP-d10).

### Figura 4

Cromatogramas de los ésteres cloropropil fosfato (a) y pentafluorobencil fosfato (b), de dos muestras de orina adicionadas con una concentración conocida con disoluciones patrón de la mezcla de metabolitos dialquilfosfato

Dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y dietilditiofosfato (DEDTP).

### Figura 5

Espectros de masas de los derivados del DMTP a) Cloropropil fosfato (DMTP-CIP); y b) Pentafluorobencil fosfato (DMTP-PFB).

DMTP: metabolito dimetiltiofosfato



### Figura 6

Curvas de calibración de los derivados cloropropil fosfato y pentafluorobencil fosfato de los metabolitos: a) Ésteres pentafluorobencil y cloropropil fosfato del DMTP, b) Ésteres pentafluorobencil y cloropropil fosfato del DMDTP, c) Ésteres pentafluorobencil y cloropropil fosfato del DETP; y d) Ésteres pentafluorobencil y cloropropil fosfato del DEDTP.

DMTP: dimetiltiofosfato, DMDTP: dimetilditiofosfato, DETP: dietiltiofosfato, DEDTP: dietilditiofosfato.

### Figura 7

Cromatograma de una muestra de orina de un niño ocupacionalmente no expuesto, residente de una localidad agrícola de México.

Dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP) y estándar interno (EI).

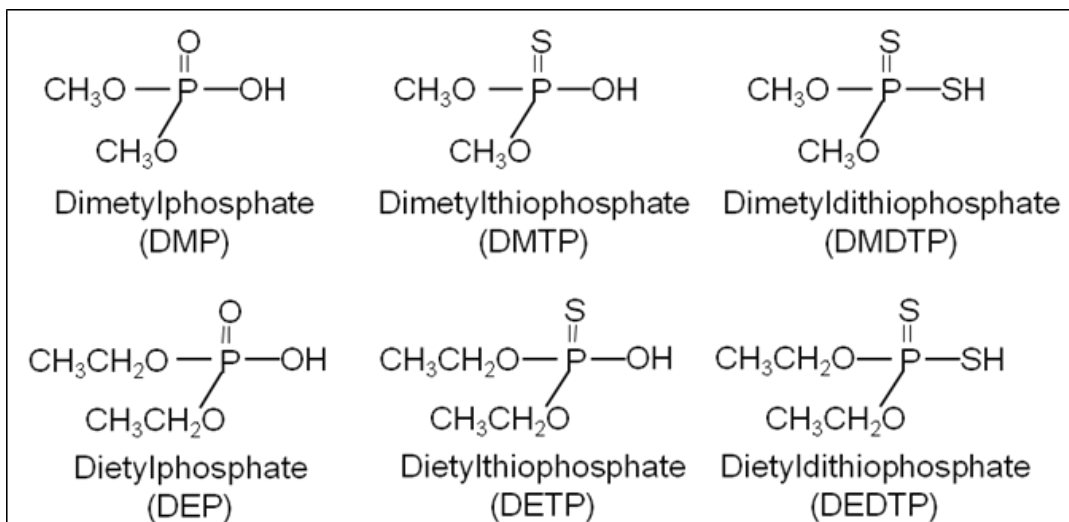


Figura 1

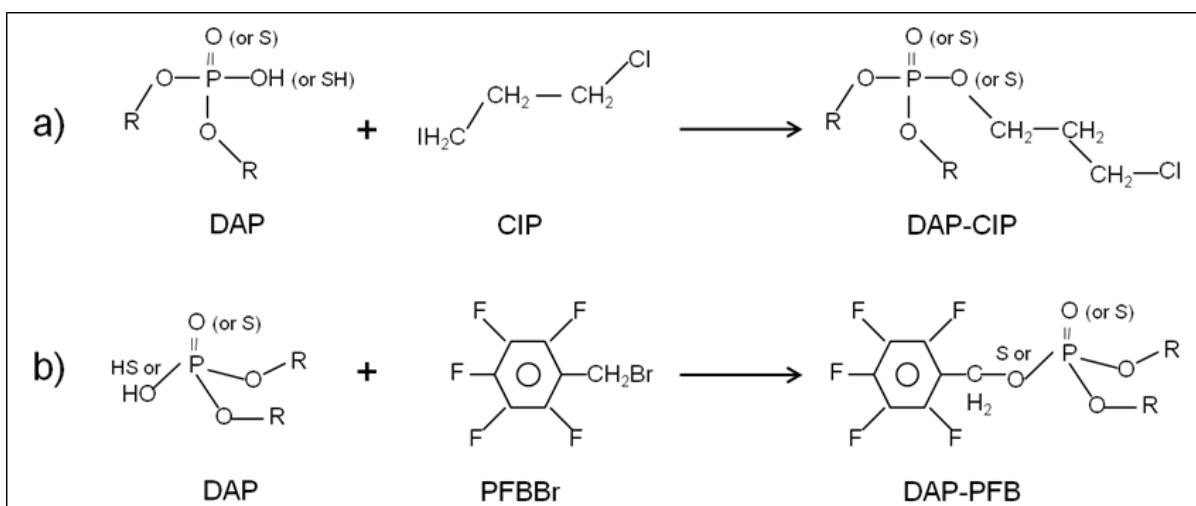


Figura 2

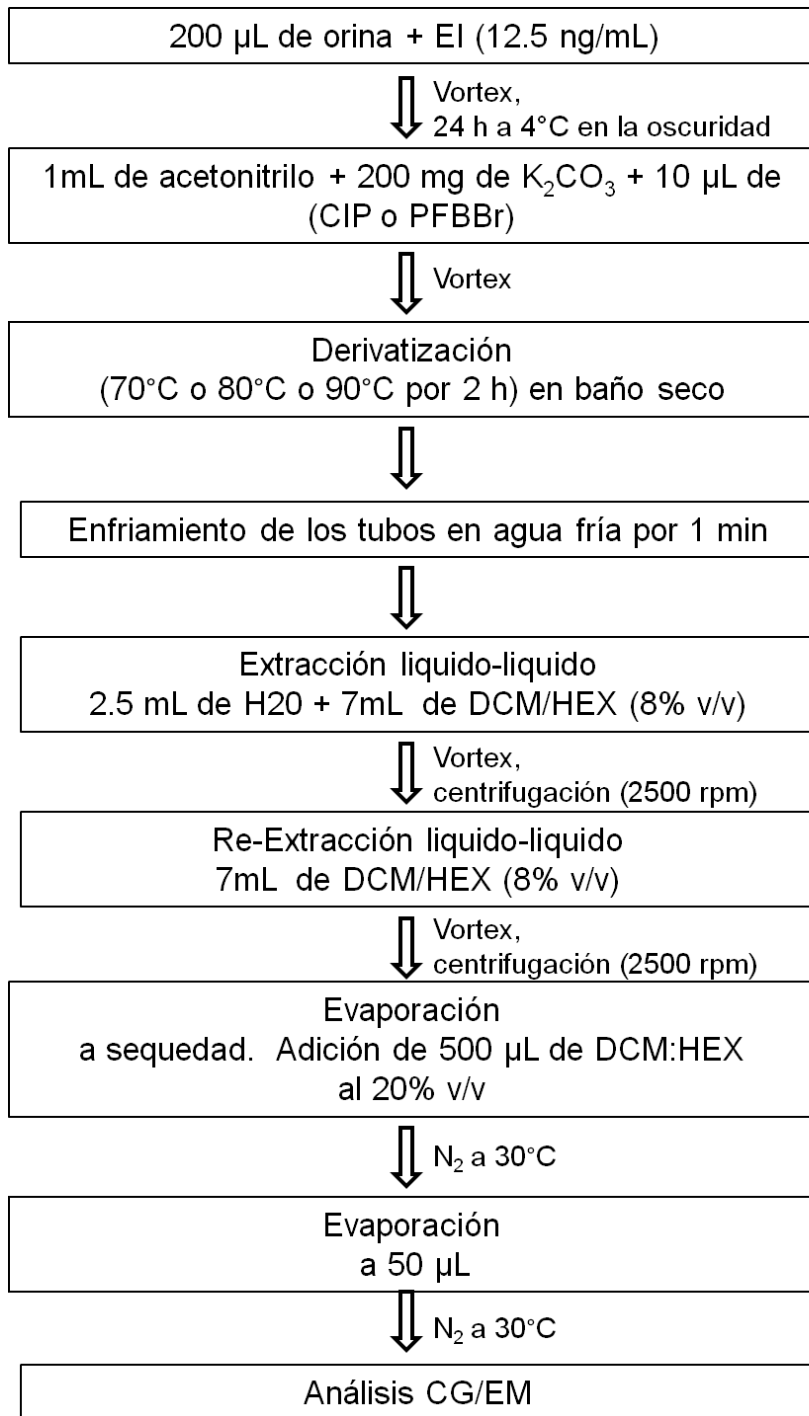


Figura 3

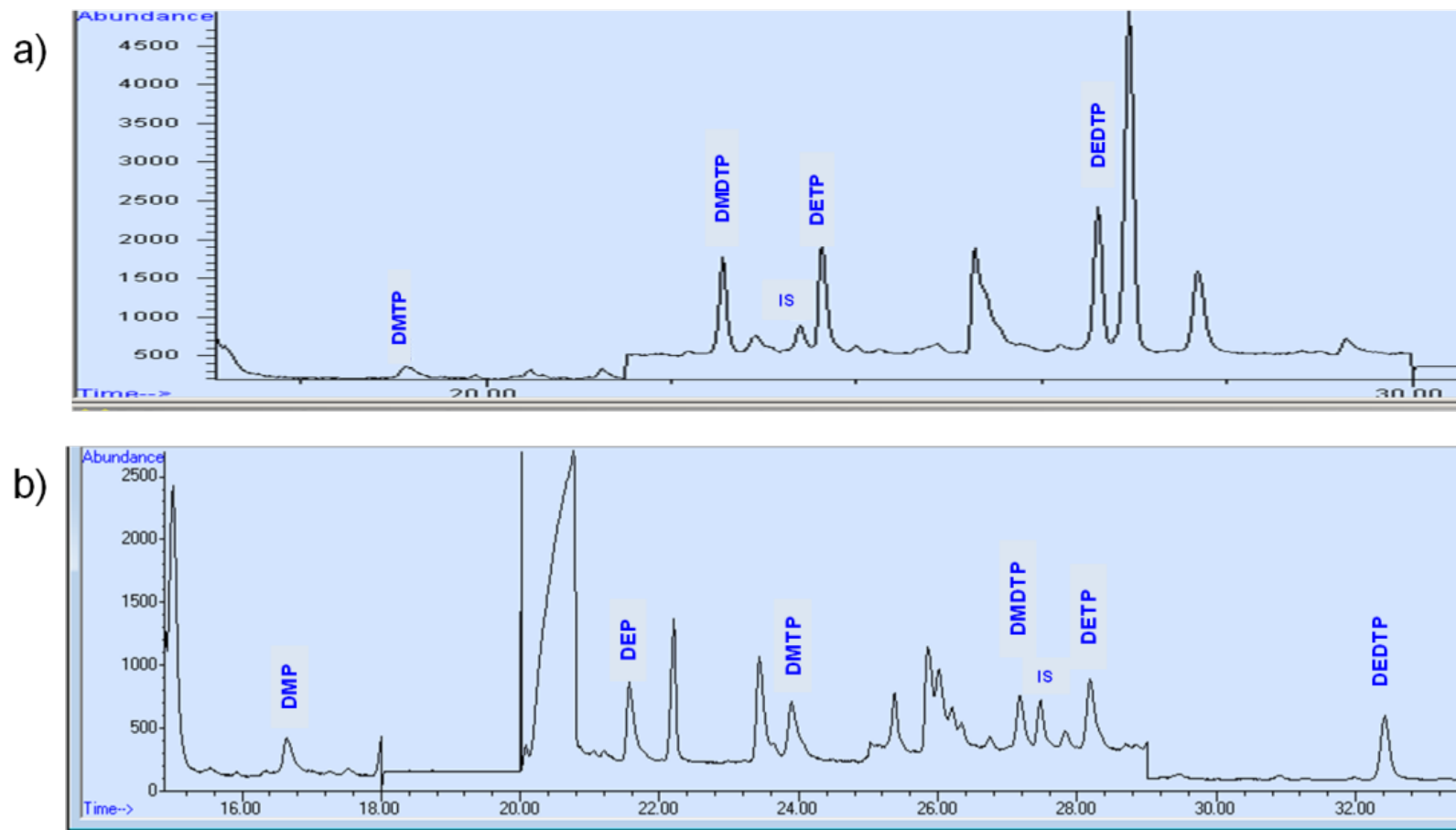


Figura 4

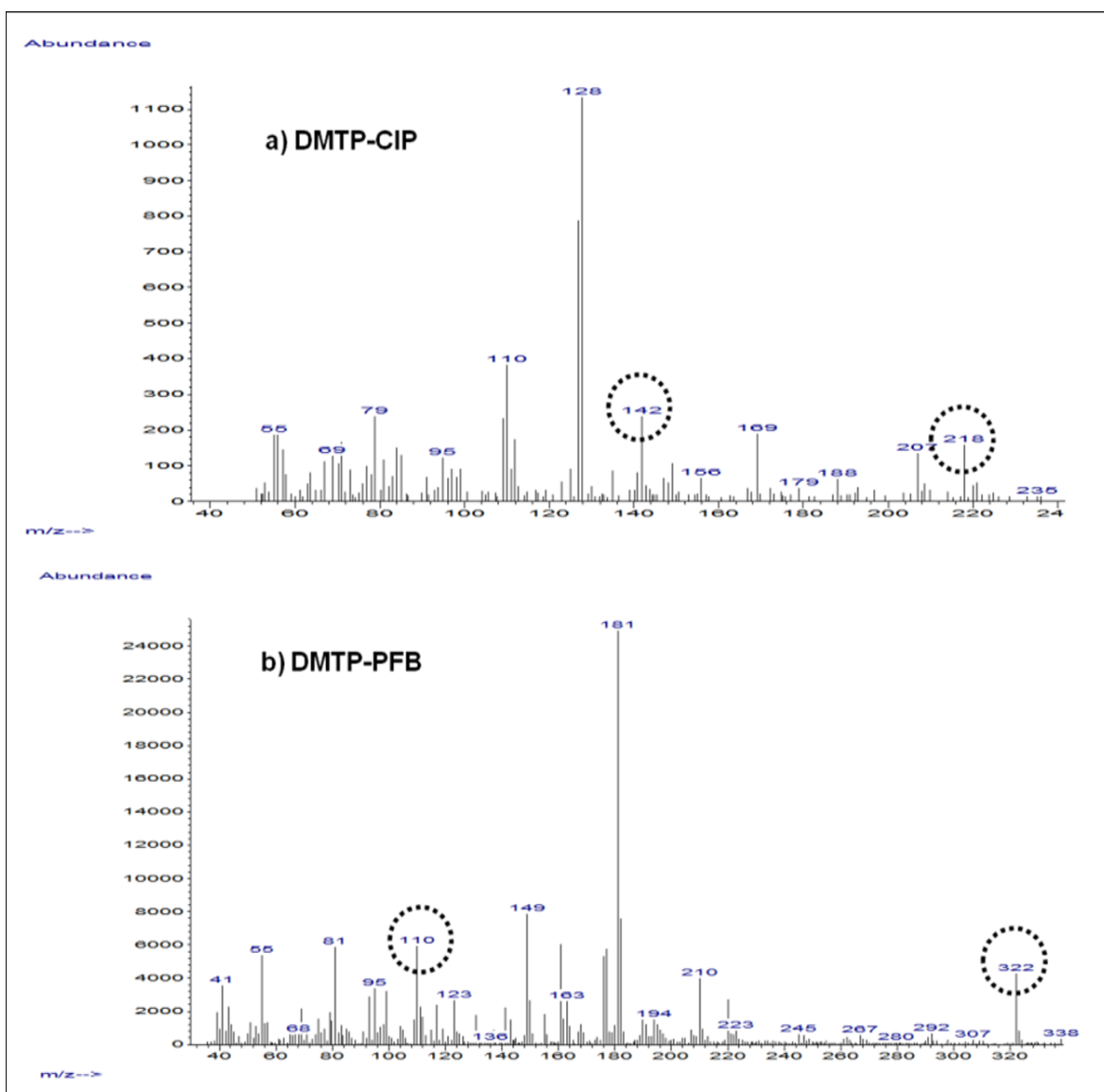


Figura 5

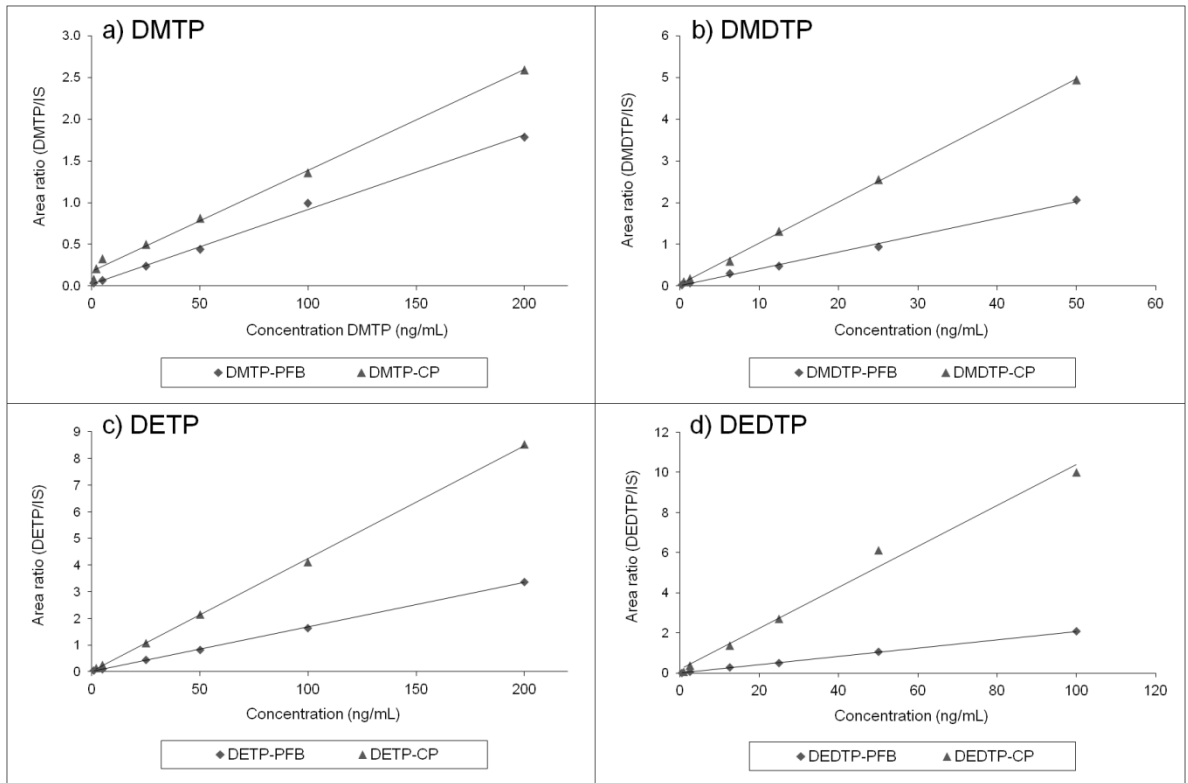


Figura 6

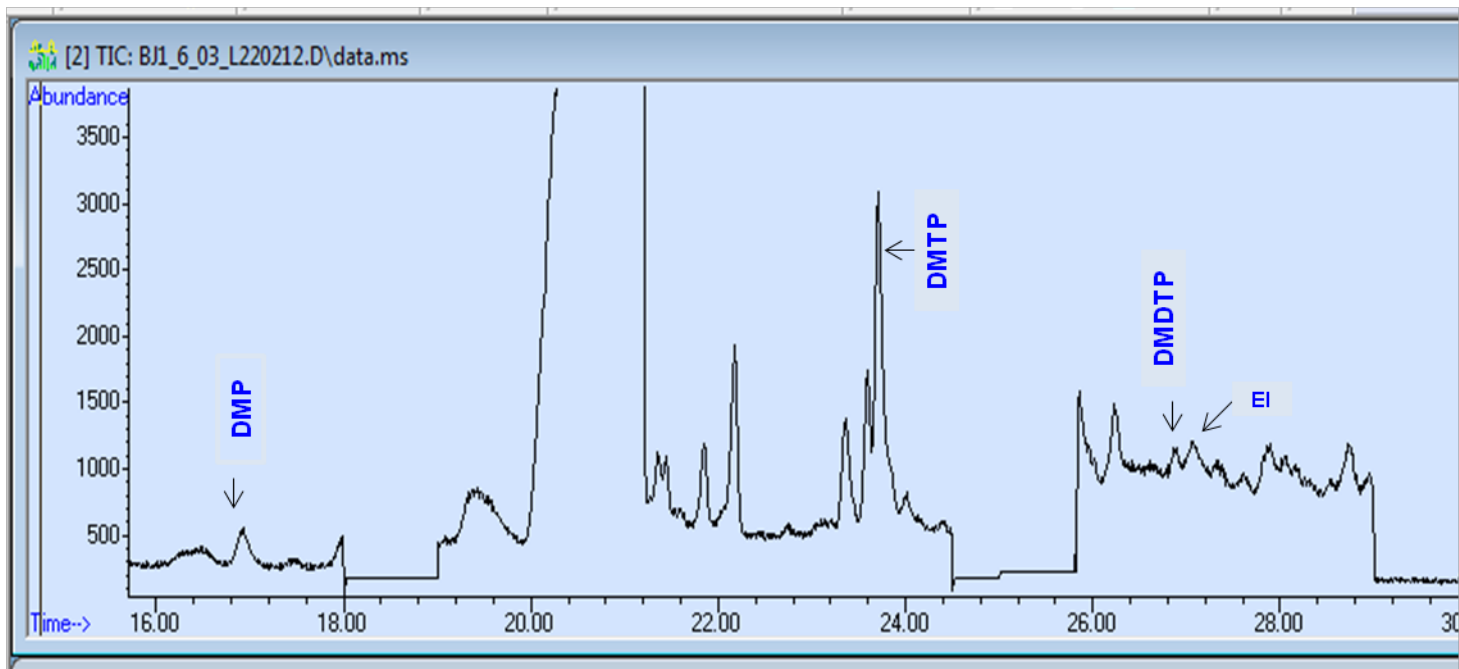


Figura 7



## **Capítulo II. Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México**

**Resumen.** Los plaguicidas organofosforados son los más usados en México. El objetivo de este trabajo fue evaluar la exposición a estos plaguicidas neurotóxicos en 110 niños y adolescentes (6 a 14 años) de una zona agrícola, mediante la determinación urinaria de los metabolitos dialquilfosfatos en dos periodos de aplicación de plaguicidas. El metabolito predominante fue el dimetiltiofosfato y el menos detectado fue el dietilditiofosfato. En el periodo de alta exposición, las concentraciones totales de metabolitos dimetilfosfatos y dietilfosfatos (mediana: 161.2 y 56.3 nmol/L, respectivamente) fueron mayores que las del periodo de baja exposición. Además, nuestros resultados sugieren que la proximidad de campos agrícolas al hogar y escuela de los niños pueden ser factores importantes en la exposición a los plaguicidas organofosforados.

*Palabras clave:* localidad agrícola, metabolitos dialquilfosfatos, exposición, niños, organofosforados, México.

# Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México

Rocío Ramírez-Jiménez<sup>1,2</sup>, Rebeca Mejía-Saucedo<sup>2</sup>, Jaqueline Calderón-Hernández<sup>3</sup>, Regina Montero-Montoya<sup>4</sup>, Leticia Yáñez-Estrada<sup>2</sup>

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán<sup>1</sup>, Laboratorio de Género, Salud y Ambiente, Facultad de Medicina<sup>2</sup>, Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina<sup>3</sup>,

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas<sup>4</sup>

Instituto Politécnico Nacional<sup>1</sup>, Universidad Autónoma de San Luis Potosí<sup>2,3</sup>, Universidad Nacional Autónoma de México<sup>4</sup>  
Jiquilpan, Mich.<sup>1</sup>; San Luis Potosí, S.L.P.<sup>2,3</sup>; México, D.F.<sup>4</sup>; México

mdramirez@ipn.mx, mizpah22@yahoo.com.mx, capimoh@gmail.com, dorinda@biomedicas.unam.mx, lyanez@uaslp.mx

**Abstract**— Organophosphate pesticides are the most commonly used pesticides in Mexico. The objective of this study was to assess exposure to these neurotoxic pesticides in 110 children and adolescents (6 to 14 years old) of an agricultural region, through the determination of urinary dialkylphosphate metabolites in two periods of pesticide application. The predominant metabolite was the dimethylthiophosphate while the diethylthiophosphate was the least detected. The total concentrations of the dimethylphosphate and diethylphosphate metabolites (median, 161.2 and 56.3 nmol/L, respectively) during the period of high pesticide exposure were higher than in the low exposure. Moreover, our findings suggest that the proximity of the farmlands to the home and school of the children can be important factors in their exposure to organophosphate pesticides.

**Keyword**— *Agricultural community, dialkylphosphates, exposure, children, organophosphate, México.*

**Resumen**— Los plaguicidas organofosforados son los más usados en México. El objetivo de este trabajo fue evaluar la exposición a estos plaguicidas neurotóxicos en 110 niños y adolescentes (6 a 14 años) de una zona agrícola, mediante la determinación urinaria de los metabolitos dialquilfosfatos en dos periodos de aplicación de plaguicidas. El metabolito predominante fue el dimetiltiofosfato y el menos detectado fue el dietiltiofosfato. En el periodo de alta exposición, las concentraciones totales de metabolitos dimetilfosfatos y dietilfosfatos (mediana: 161.2 y 56.3 nmol/L, respectivamente) fueron mayores que las del periodo de baja exposición. Además, nuestros resultados sugieren que la proximidad de campos agrícolas al hogar y escuela de los niños pueden ser factores importantes en la exposición a los plaguicidas organofosforados.

**Palabras claves**— *comunidad agrícola, dialquilfosfatos, exposición, niños, organofosforados, México.*

## I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organofosforados (OF) son un grupo de plaguicidas neurotóxicos ampliamente usados en la agricultura y constituyen el primer tipo de compuestos en ser regulado como grupo bajo la FQPA (Food Quality Protection Act) debido a su amplio uso y a que presentan un mecanismo de acción común: la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) [1].

Varios estudios indican que los efectos adversos potenciales a la salud, por la exposición a este grupo de plaguicidas, son mayores para los niños que para los adultos debido a sus patrones de actividad y comportamiento, a la alimentación y a las características fisiológicas asociadas con el desarrollo [2-3]. Algunos estudios epidemiológicos realizados en poblaciones infantiles, han reportado una asociación entre la exposición a este tipo de agroquímicos y efectos neurológicos [4-5].

Los plaguicidas OF pueden ser metabolizados formando de uno a seis metabolitos inespecíficos dialquilfosfato (DAP), los cuales son dimetilfosfato (DMP), dietilfosfato (DEP), dimetiltiofosfato (DMTP), dietiltiofosfato (DETP), dimetilditiofosfato (DMDTP) y dietilditiofosfato (DEDTP) [6-7]. La medición de estos metabolitos en orina refleja la exposición acumulada a este tipo de compuestos [8-

10]. Existen reportes en la literatura que han evaluado la exposición a OF, cuantificando las concentraciones urinarias de metabolitos DAP en niños que viven en zonas rurales [11-14] y en comunidades urbanas [15-21].

La exposición a plaguicidas constituye un problema de salud, principalmente en comunidades donde sus habitantes trabajan y viven en estrecha proximidad a los campos agrícolas, donde este tipo de compuestos son aplicados y almacenados [22-24].

En México, los organofosforados son el grupo de plaguicidas más usados en la agricultura y en el control de plagas urbanas; sin embargo, no hay datos oficiales sobre la cantidad y tipo de agroquímicos usados [25-26]. A pesar de que el uso de varios OF, como paratión metílico, metamidofos, clorpirifos etílico, mevinfos, monocrotofos y azinfos metílico, entre otros, ha sido prohibido o severamente restringido en otros países [27], en México su empleo en comunidades rurales y urbanas sigue siendo intensivo [26,28]. Por otro lado, los estudios sobre la evaluación de la exposición a este tipo de plaguicidas en poblaciones mexicanas son limitados [29-30], particularmente en niños de comunidades agrícolas [31]; no obstante que la población de niños en México asciende a 39 millones (29% de la población total), de los cuales casi el 26.6% vive en comunidades rurales [32].

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la exposición a OF en niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad que viven en una zona agrícola, mediante la cuantificación urinaria de los metabolitos DAP, en dos periodos de aplicación de estos plaguicidas; así como, determinar la influencia de variables como edad, sexo, proximidad de la vivienda al campo agrícola y uso residencial de plaguicidas, entre otras, sobre las concentraciones de estos metabolitos.

## II. METODOLOGÍA

### A. Población y sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo en un grupo de niños y adolescentes que viven en la comunidad de El Refugio. Esta comunidad se localiza en el municipio de Ciudad Fernández en una de las zonas agrícolas más importantes del Estado de San Luis Potosí, México, en donde se aplican diferentes tipos de plaguicidas principalmente piretroides, carbamatos, organoclorados y organofosforados. Respecto a estos últimos, entre los más usados se encuentran el clorpirifos etílico, diazinón, malatión, metamidofos, paratión metílico, dimetoato, acefato, etión y monocrotofos. El estudio se efectuó en dos estaciones del año: en primavera en uno de los meses con mayor aplicación de plaguicidas (mayo 2010) y durante el invierno en uno de los meses con menor aplicación de plaguicidas (febrero 2011).

En este estudio se incluyeron niños y adolescentes que asistían a dos de las principales escuelas de Educación Básica de la comunidad, una localizada en el centro y la otra ubicada en la periferia y más cercana a los campos agrícolas.

En el primer muestreo (mayo 2010: periodo de alta aplicación de plaguicidas) participaron 110 niños y adolescentes, de 6 a 14 años de edad con un tiempo de residencia en la comunidad  $\geq 5$  años y clínicamente sanos (de acuerdo al análisis bioquímico-clínicos, datos no mostrados). En el segundo muestreo (febrero 2011: periodo de baja aplicación de plaguicidas), hubo una tasa de deserción del 10% y solo 99 niños continuaron participando. Los padres de los niños participantes firmaron una carta de consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UASLP. El trabajo descrito en este manuscrito fue realizado de conformidad con las directrices nacionales e institucionales para la protección de los sujetos humanos.



### B. Colecta de muestras

En el periodo de mayor aplicación de plaguicidas, se colectó la primera orina de la mañana durante 5 días consecutivos y en el periodo de menor aplicación, solo se colectaron muestras en el día uno y en el día cinco. Las muestras de orina fueron tomadas en frascos de plástico, de boca ancha y estériles y fueron transportadas al laboratorio a 4°C, donde fueron divididas en alícuotas y almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

En ambos periodos de muestreo, se registró la edad, el peso y la estatura de los niños y los adolescentes y se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) usando el software AnthroPlus v1.0.4. Las madres de los participantes fueron entrevistadas para registrar información relacionada con la historia clínica familiar, escuela a la que asiste el niño, la ocupación de los padres, la proximidad de campos agrícolas al hogar, la exposición residencial a plaguicidas, frecuencia de consumo de alimentos de origen vegetal y estilo de vida de los niños.

### C. Análisis de metabolitos dialquilfosfatos

La determinación de los seis metabolitos dialquilfosfato en orina: dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP), dietilditiofosfato (DEDTP) fue realizada conforme al método descrito por Valcke et al. [19]. Las muestras fueron derivatizadas usando bromuro de pentafluorobencilo y carbonato de potasio a 70°C durante 2h. Los ésteres obtenidos fueron extraídos con una mezcla de hexano/cloruro de metileno y concentrados bajo una corriente de nitrógeno a 50 µL. Como estándar interno se empleó el dietiltiofosfato deuterado.

La cuantificación de los metabolitos se realizó en un Cromatógrafo de Gases Agilent (modelo 6850 Network System) acoplado a un Espectrómetro de Masas Agilent (modelo 5973 Network), operado en los modos de ionización electrónica y de monitoreo del ión selectivo (GC-MS-EI-SIM por sus siglas en inglés).

Las concentraciones de creatinina urinaria fueron determinadas usando el método colorimétrico fundamentado en la reacción de Jaffe (procedimiento de creatinina No. 555, Sigma Diagnostics, St Louis, Mo).

### D. Análisis estadístico

Las concentraciones de los metabolitos individuales están expresadas en µg/L y en nmol/L para la sumatoria de los metabolitos dimetil (DMPs): DMP, DMTP y DMDTP y dietil (DEPs): DEP, DETP y DEDTP. Para estimar la concentración total de metabolitos DAPs, se sumaron los valores obtenidos de DMPs más DEPs. Todas las concentraciones fueron ajustadas por creatinina. Para fines estadísticos, los niveles <LD fueron sustituidos por LD/√2 [33].

Las concentraciones de los metabolitos dialquilfosfato no se ajustaron a una distribución normal (evaluada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov). Para evaluar las diferencias entre grupos se emplearon las pruebas de U-Mann Whitney y Kruskal-Wallis. Las variables: edad, sexo, IMC, tiempo de residencia en la comunidad, escuela a la que asiste el niño y el adolescente, exposición materna durante la gestación a agroquímicos, ocupación del padre, participación del niño o del adolescente en actividades agrícolas, exposición residencial a plaguicidas, proximidad de campos agrícolas al hogar, y frecuencia de ingesta de alimentos de origen vegetal, se incluyeron como covariables. Para comparar las concentraciones de los metabolitos dialquilfosfato entre los periodos de baja y de alta aplicación de plaguicidas se empleó la prueba de rango con signo de Wilcoxon.

El análisis estadístico fue realizado con el software "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) versión 18 para "Windows™ (SPSS Inc. Chicago, IL), considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## III. RESULTADOS

Las características de la población de estudio en los periodos de alta exposición (AE) y baja exposición (BE) a plaguicidas son mostradas en la Tabla I. La edad promedio de los participantes fue de  $9.7 \pm 1.9$  años de edad, el 50.9% fueron varones y el 80.9% ha vivido siempre en la comunidad de estudio. Con base a los puntos de corte de la International Obesity TaskForce (IOTF por sus siglas en inglés), el 20% de los niños presentaron obesidad. Por otro lado, el 40.9% de los niños estuvieron expuestos a plaguicidas en el hogar durante el mes previo al estudio; y solo el 14.5% no vive en proximidad a campos agrícolas.

Tabla I. Características de la población de estudio.

Características		Periodo AE (n =110)	Periodo BE (n = 99)
Número de niños por escuela			
	Escuela ubicada en el centro de la comunidad	48 (43.6)	42 (42.4)
	Escuela ubicada en la periferia de la comunidad (en proximidad a campos agrícolas)	60 (54.5)	55 (55.6)
Edad (años)	Media $\pm$ DE (min-max)	$9.7 \pm 1.9$ (6 - 14)	$10.2 \pm 1.8$ (7 - 15)
	6 a 11 años	96 (87.3)	91 (91.9)
	$\geq 12$ años	14 (12.7)	8 (8.1)
Sexo	Femenino	54 (49.1)	48 (48.5)
	Masculino	56 (50.9)	51 (51.5)
Índice de masa corporal (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	Media $\pm$ DE (min-max)	$17.6 \pm 3.7$ (12.4-32.5)	$17.9 \pm 3.6$ (12.6-31.2)
	debajo del peso saludable	20 (18.2)	19 (19.2)
	peso saludable	61 (55.5)	53 (53.5)
	sobrepeso	22 (20)	20 (20.2)
	obesidad	7 (6.4)	7 (7.1)
Tiempo de residencia en la localidad (años)	Media $\pm$ DE (min-max)	$9.1 \pm 2.5$ (3.0-13.9)	$9.0 \pm 2.4$ (3.0-13.9)
	<5 años	6 (5.5)	5 (5.1)
	$\geq 5$ años	104 (94.5)	94 (94.9)
La madre estuvo expuesta a plaguicidas durante el embarazo	No	60 (54.5)	53 (53.5)
	Si	42 (38.2)	40 (40.4)
Exposición a plaguicidas en el hogar	No	61 (55.5)	56 (56.6)
	Si	45 (40.9)	41 (41.4)
Ocupación agrícola del padre	No	49 (44.5)	45 (45.5)
	Si	54 (49.1)	49 (49.5)
Ayuda el niño o el adolescente en actividades agrícolas	No	93 (84.5)	86 (86.9)
	Si	15 (13.6)	13 (13.1)
Proximidad de campos agrícolas al hogar (m)	No	16 (14.5)	16 (16.2)
	>60 a 250 m	9 (8.2)	8 (8.1)
	>15 a 60 m	24 (21.8)	23 (23.2)
	$\leq 15$ m	59 (53.5)	52 (52.5)

Los datos son expresados como n (%) a menos de que se indique lo contrario. n: número de muestra. DE: Desviación estándar.

Los límites de detección (LD) del método analítico fueron: 1.36, 1.49, 0.27, 1.07, 0.98 y 0.52  $\mu\text{g/L}$  para el dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y dietilditiofosfato (DEDTP), respectivamente. Los porcentajes de recobro de los seis metabolitos fluctuaron entre el 92 y el 111%; y los coeficientes de variación entre 3.0% y 16.7%. Las curvas de calibración de los seis metabolitos fueron lineales ( $r \geq 0.993$ ).

Los porcentajes de detección de los metabolitos DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP y DEDTP en las muestras de orina en el periodo de alta aplicación de plaguicidas ( $n = 110$ ) fueron: 60%, 99.1%, 41.8%, 86.4%, 70.9% y 20%, respectivamente; mientras que en el periodo de baja aplicación ( $n = 99$ ) las frecuencias de detección fueron menores (Tabla II). En ambos periodos, el DMTP fue el metabolito predominante. En la Tabla 2 se presentan los estadísticos descriptivos (media, desviación estándar, percentiles, mínimo y máximo) de las concentraciones de los metabolitos dialquilfosfato.

Tabla II. Metabolitos urinarios dialquilfosfatos en niños y adolescentes mexicanos en dos periodos de aplicación de plaguicidas

Metabolito	Periodo	% >LD	Media (DE)	Mínimo	Percentiles					Máximo
					p5	p25	p50	p75	p95	
DMP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	60	2.3 (5.1)	<LD	<LD	<LD	0.91	2.4	9.4	40.2
	BE	23.2	0.79 (1.8)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4.5	9.5
DMTP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	99.1	23 (14.0)	<LD	8.4	16.1	20.1	24.9	42.8	121.4
	BE	92.1	15 (17.1)	<LD	<LD	10.2	12.5	16.9	33.8	166.4
DMDTP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	41.8	0.70 (1.6)	<LD	<LD	<LD	<LD	0.61	4.4	11
	BE	18.2	0.38 (1.1)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2.4	7.2
DEP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	86.4	7.6 (6.4)	<LD	<LD	4.7	6.9	9.9	18	51
	BE	71.7	4.0 (3.9)	<LD	<LD	<LD	3.2	6.1	11	23
DETP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	70.9	2.3 (2.9)	<LD	<LD	<LD	1.3	2.9	10	14
	BE	45.5	1.4 (2.2)	<LD	<LD	<LD	<LD	2.1	4.8	9.7
DEDTP ( $\mu\text{g/L}$ )	AE	20	0.40 (1.1)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3.1	7.2
	BE	14.1	0.37 (1.0)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4.0	4
DMPs (nmol/L)	AE		183 (138)	<LD	60	120	161	194	375	1222
	BE		116 (129)	<LD	<LD	72	93	129	246	1219
DEPs (nmol/L)	AE		65 (54)	<LD	<LD	36	56	87	165	347
	BE		37 (34)	<LD	<LD	<LD	31	53	102	150
DAPs (nmol/L)	AE		248 (157)	<LD	60	155	231	301	493	1292
	BE		153 (142)	<LD	<LD	92	131	179	324	1275

<LD: Menor al límite de detección. DE: Desviación estándar.

El DMTP presentó las concentraciones más altas en ambos periodos de muestreo, el valor de la mediana en el periodo de alta exposición fue de 20.1  $\mu\text{g/L}$ ; mientras que en el de baja exposición fue de 12.5  $\mu\text{g/L}$ . Sin embargo, el valor máximo de este metabolito fue mayor en el periodo de baja exposición que en el de alta exposición (166.4  $\mu\text{g/L}$  y 121.4  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente). En ambos periodos de muestreo, el metabolito con los niveles más bajos fue el DEDTP. En el periodo de alta exposición, el valor de la mediana de los metabolitos totales DMPs (suma molar de DMP, DMTP y DMDTP), DEPs (suma molar de DEP, DETP y DEDTP) y DAPs (suma de DMPs y DEPs) fue: 161.2, 56.3 y 231.4 nmol/L, respectivamente; mientras que en el periodo de baja exposición fue alrededor de 1.7 veces menor. Sin embargo, los valores máximos de DMPs y DAPs fueron similares en ambos periodos.



En la Tabla III se presentan las concentraciones de metabolitos dialquilsulfato ajustados por creatinina urinaria. Las concentraciones de los metabolitos dialquilsulfatos en el periodo de alta exposición, fueron significativamente mayores a las del periodo de menor exposición, excepto para el DETP y para el DEDTP (prueba de rango con signo de Wilcoxon,  $p > 0.05$ ).

Tabla III. Metabolitos urinarios dialquilsulfatos ajustados por creatinina en niños y adolescentes mexicanos en dos periodos de aplicación de plaguicidas

Metabolito	Periodo	p*	Media (DE)	Mínimo	Percentiles					Máximo
					p5	p25	p50	p75	p95	
DMP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	<0.0001	2.1 (4.2)	<LD	<LD	<LD	0.70	2.4	7.3	32
	BE		0.69 (1.6)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3.9	9.8
DMTP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	<0.0001	20 (11)	<LD	5.3	13	17	25	41	72
	BE		13.8 (12)	<LD	<LD	9.4	12	15	25	103
DMDTP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	0.042	0.53 (1.2)	<LD	<LD	<LD	<LD	0.56	3.5	6.7
	BE		0.32 (1.0)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2.7	7.0
DEP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	<0.0001	6.6 (5.3)	<LD	<LD	3.9	5.9	9.0	14	39
	BE		3.7 (3.6)	<LD	<LD	<LD	3.3	5.7	11	17
DETP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	0.123	2.0 (2.5)	<LD	<LD	<LD	1.2	2.4	8.4	11
	BE		1.2 (1.8)	<LD	<LD	<LD	<LD	2.2	5.0	9.9
DEDTP ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	AE	0.363	0.49 (1.8)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3.3	16
	BE		0.35 (1.0)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3.1	5.1
DMPs (nmol/g creatinina)	AE	<0.0001	158 (106)	<LD	38	95	133	193	373	729
	BE		106 (94)	<LD	<LD	67	92	121	229	752
DEPs (nmol/g creatinina)	AE	<0.0001	57 (49)	<LD	<LD	31	48	73	143	273
	BE		33 (30)	<LD	<LD	<LD	27	48	94	137
DAPs (nmol/g creatinina)	AE	<0.0001	216 (130)	<LD	38	132	198	255	472	770
	BE		139 (107)	<LD	<LD	81	123	170	313	786

DE: Desviación estandar. <LD: Menor al límite de detección. \*Evaluada por prueba de rango con signo de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ).

Las concentraciones de DMPs, DEPs y DAPs de acuerdo al sexo del niño no fueron estadísticamente diferentes (U-Mann Whitney,  $p < 0.05$ ) en ambos periodos. En el periodo de alta exposición, el valor de la mediana de DEPs fue superior en los niños mayores de 11 años de edad que en los de 6 a 11 años (79.4 y 52.2 nmol/L, respectivamente; U-Mann Whitney,  $p = 0.041$ ); sin embargo, el valor máximo se detectó en el grupo de 6 a 11 años de edad. En ambos periodos de muestreo, los niños que asistían a la escuela ubicada en la periferia de la comunidad y colindante con campos agrícolas, tuvieron concentraciones significativamente mayores de DMPs, DEPs y DAPs que aquellos niños que asistían a la escuela localizada en el centro de la comunidad (U-Mann Whitney,  $p < 0.05$ ). En el periodo de alta exposición, los niños cuyos padres realizaban actividades agrícolas presentaron concentraciones mayores de DEPs y DAPs (U-Mann Whitney,  $p = 0.044$  y  $p = 0.030$ , respectivamente) y de DMPs (valores ajustados por creatinina urinaria; U-Mann Whitney,  $p = 0.030$ ). En el periodo de alta exposición, los niños que viven cerca de los campos agrícolas (a una distancia  $\leq 15\text{m}$ ) presentaron concentraciones mayores de DMPs comparados con los que viven a una distancia superior a 15 m (Kruskal Wallis,  $p = 0.041$ ). Las concentraciones de DEPs y DAPs ajustadas por creatinina, fueron estadísticamente mayores en los niños cuya vivienda se ubicaba a  $\leq 15\text{m}$  de los campos agrícolas.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los dialquifosfatos, de acuerdo a la exposición residencial a plaguicidas, al consumo y frecuencia de alimentos de origen vegetal y a la participación del niño o del adolescente en actividades agrícolas.

#### IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontraron diferencias estacionales en la exposición a OF, ya que las concentraciones urinarias de los metabolitos dialquifosfato en los niños y en los adolescentes participantes, fueron mayores en el mes de mayo (periodo de alta aplicación a plaguicidas) que en el mes de febrero (periodo de baja aplicación a plaguicidas).

Pocos estudios han evaluado los patrones temporales de exposición infantil a OF; Koch et al. [23] reportaron concentraciones urinarias de metabolitos dialquifosfato superiores, en niños residentes de una comunidad agrícola durante los meses de alta aplicación de OF, con respecto a los meses de menor aplicación. Por otro lado, Fenske et al. [12] y Rodríguez et al. [34] detectaron concentraciones urinarias del metabolito del clorpirifos, tres veces más altas en niños después de la aplicación de este insecticida, comparada con un periodo de no aplicación.

La variabilidad temporal observada en las concentraciones urinarias de metabolitos dialquifosfato, puede ser atribuida a varios factores, tales como diferencias estacionales en la aplicación de los plaguicidas OF (tipos y cantidades de plaguicidas utilizados, periodos de aplicación, condiciones meteorológicas y degradación ambiental de los residuos, entre otros), exposición para-ocupacional y residencial a plaguicidas y proximidad de campos agrícolas al hogar [35-36]. Otro factor que podría influir en estas diferencias es la variabilidad intra-individual de los niños (metabolizadores lentos y rápidos) [37].

La ruta de exposición a OF puede deberse a la ingesta de alimentos, agua y bebidas contaminadas con residuos de estos compuestos, por contacto de la piel con suelo, polvo y artículos contaminados, por el uso de insecticidas en el hogar o a través de la deriva y deposición de aerosoles y vapores de estos plaguicidas [35-36, 38]. Bajo este escenario, todos los niños están potencialmente expuestos a OF; sin embargo, aquellos que viven en las comunidades agrícolas están en mayor riesgo, debido a la proximidad de sus hogares a zonas de cultivo, a la posibilidad de que sus padres lleven residuos de estos insecticidas en sus cuerpos, ropa y zapatos a la casa, después de realizar las actividades agrícolas [12, 36].

Estudios previos que han examinado las concentraciones de metabolitos dialquifosfato en relación con la proximidad de zonas agrícolas al hogar, han reportado resultados contradictorios. Por ejemplo, Lu et al. [11] encontraron concentraciones significativamente mayores de metabolitos urinarios de OF en los niños que viven en casas cerca de campos tratados con plaguicidas (<60m), en comparación con los que viven en distancias más alejadas; por el contrario, Arcury et al. [14] y Koch et al. [23] no reportaron asociaciones significativas entre estas variables. En nuestro estudio, se encontró que las concentraciones urinarias de metabolitos dialquifosfato en los niños que vivían cerca de campos agrícolas ( $\leq 15$ m), fueron mayores que las de los niños que no vivían cerca de los campos agrícolas o que vivían a una distancia >15m. Otros factores que podrían influir en estos resultados, además de la ubicación de la vivienda del niño con respecto a los campos agrícolas y al periodo del año cuando son aplicados, son las actividades y usos y costumbres del niño, por ejemplo, si los niños ayudan en las actividades agrícolas y el tiempo y la frecuencia que el niño juega en las zonas impactadas por los agroquímicos, entre otros [3, 36].

Los niños que viven en comunidades agrícolas generalmente presentan concentraciones mayores de DMPs que los niños que viven en áreas urbanas [13, 23]. En nuestro estudio, el valor de la mediana de



los metabolitos dialquilfosfato totales fue de 1.5 a 1.7 veces más alta que la reportada en diferentes estudios realizados en niños de comunidades agrícolas [22-23, 39] y urbanas de Estados Unidos de Norteamérica y Canadá [8, 16, 21]. Mientras que fue similar al reportado por Lambert et al. [13] en niños de una comunidad urbana; sin embargo, fue 1.4 a 2.7 veces menor que la reportada en niños de tres comunidades agrícolas de Oregon dedicadas a diferentes cultivos [13]. En la Tabla IV se comparan las concentraciones urinarias de los metabolitos DMPs y DEPs en niños y adolescentes de diferentes estudios.

Tabla IV. Concentraciones (mediana) de los metabolitos dmps y depts urinarios en niños y adolescentes de diferentes estudios.

Referencia	n	Edad	DMPs (nmol/L)	DEPs (nmol/L)
Lu et al., 2001 <sup>1,3</sup>	110	2-5 años	110	40
Curl e al, 2002 <sup>2,3</sup>	211	2-6 años	87	60
Koch et al., 2002 <sup>2,3</sup>	44	2-5 años	70	40
Koch et al., 2002 <sup>2,3</sup>	44	2-5 años	60	40
Barr et al., 2004 <sup>1,4</sup>	471	6-11 años	91	16
Lambert et al., 2005 <sup>2,3</sup>	52	2-6 años	230	-
Lambert et al., 2005 <sup>2,3</sup>	29	2-6 años	250	-
Lambert et al., 2005 <sup>2,3</sup>	33	2-6 años	440	-
Lambert et al., 2005 <sup>1,3</sup>	61	2-6 años	150	-
Oulhote et al., 2013 <sup>1,4</sup>	1030	6-11 años	62	25
Bradman et al., 2013 <sup>2,3</sup>	25	2-5 años	94	57
Este estudio <sup>2,4</sup>	110	6-14 años	161	56
Este estudio <sup>2,4</sup>	99	6-14 años	93	31

<sup>1</sup> En población urbana o población general. <sup>2</sup> En comunidad agrícola. <sup>3</sup> En niños menores de 6 años. <sup>4</sup> En niños de 6-11 años o más.

La principal limitante de este estudio se relaciona con el uso de los metabolitos dialquilfosfato como biomarcadores de exposición a OF, ya que la medición de éstos, no proporciona información sobre la identidad del compuesto padre al que se ha estado expuesto, aunado a lo anterior, estos metabolitos pueden ser producto de la degradación en el ambiente incorporándose a diferentes matrices (agua, suelo, alimentos) [40-41]; no obstante lo anterior, las concentraciones urinarias de los metabolitos dialquilfosfato, proporcionan una medida integrada de la exposición a estos insecticidas [6].

En conclusión, este estudio proporciona información relevante sobre la exposición temporal a plaguicidas OF en niños y adolescentes de una comunidad agrícola mexicana. En nuestro conocimiento este es el primer estudio en México con este enfoque.

Se requieren de estudios adicionales con un diseño longitudinal que permita evaluar tanto la exposición crónica a plaguicidas organofosforados, como la identificación de las rutas de exposición.

#### RECONOCIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por PROMEP SES-2009-UASLP-CA-45, CONACYT-México (Beca tesis No. 19922) y por el Instituto Politécnico Nacional a través del COTEBAL.

## REFERENCIAS

- [1] Androutopoulos, V. P., Hernandez, A. F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A. M. (2012). A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*, doi: 10.1016/j.tox.2012.09.011.
- [2] Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R. (1999). Exposure of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect*, 107(3), 409-419.
- [3] Weiss, B., Amier, S., Amier, R. W. (2004). Pesticides. *Pediatrics*, 113, 1030-1038.
- [4] Engel, S. M., Berkowitz, G. S., Barr, D. B., Teitelbaum, S. L., Siskind, J., Meisel, S. J., et al. (2007). Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am J Epidemiol*, 165, 1397-1404.
- [5] Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D. B., Johnson, C., et al. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect*, 115, 792-798.
- [6] Wessels, D., Barr, D. B., Mendola, P. (2003). Use of Biomarkers to Indicate Exposure of Children to Organophosphate Pesticides: Implications for a Longitudinal Study of Children's. *Environ Health Perspect*, 111(16), 1939-1946.
- [7] Egeghy, P. P., Cohen Hubal E. A., Tulve, N. S., Melnyk, L. J., Morgan, M. K., Fortmann, R. C., et al. (2011). Review of Pesticide Urinary Biomarker Measurements from Selected US EPA Children's Observational Exposure Studies. *Int J Environ Res Public Health*, 8, 1727-1754.
- [8] Barr, D. B., Bravo, R., Weerasekera, G., Caltabiano, L. M., Whitehead, R. D., Olsson, A. O., et al., (2004). Concentrations of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides in the U.S. Population. *Environ Health Perspect*, 112, 186-200.
- [9] Bradman, A., Eskenazi, B., Barr, D. B., Bravo, R., Castorina, R., Chevrier, J., et al., (2005). Organophosphate urinary metabolite levels during pregnancy and after delivery in women living in an agricultural community. *Environ Health Perspect*, 113, 1802-1807.
- [10] Bradman, A., Whitaker, D., Quirós, L., Castorina, R., Henn, B. C., Nishioka, M., et al., (2007). Pesticides and their Metabolites in the Homes and Urine of Farmworker Children Living in the Salinas Valley, CA. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 17, 331-349.
- [11] Lu, C., Fenske, R. A., Simcox, N. J., Kalman, D. (2000). Pesticide exposure of children in an agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. *Environ Res*, 84, 290-302.
- [12] Fenske, R. A., Kedan, G., Lu, C., Fisker-Andersen, J. A., Curl, C. L. (2002). Assessment of organophosphorous pesticide exposure in the diets of preschool children in Washington State. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 12, 21-28.
- [13] Lambert, W. E., Lasarev, M., Muniz, J., Scherer, J., Rothlein, J., Santana, J., et al., (2005). Variation in Organophosphate Pesticide Metabolites in Urine of Children Living in Agricultural Communities. *Environ Health Perspect*, 113, 504-508.
- [14] Arcury, T. A., Grzywacz, J. G., Barr, D. B., Tapia, J., Chen, H., Quandt, S. A. (2007). Pesticide Urinary Metabolite Levels of Children in Eastern North Carolina Farmworker Households. *Environ Health Perspect*, 115, 1254-1260.
- [15] Aprea, C., Strambi, M., Novelli, M. T., Lunghini, L., Bozzi, N. (2000). Biologic monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children. *Environ Health Perspect*, 108, 521-525.
- [16] Lu, C., Knutson, D. E., Fisker-Anderssen, J., Fenske, R. (2001). Biological monitoring survey of organophosphorus pesticide exposure among preschool children in the Seattle metropolitan area. *Environ Health Perspect*, 109(3), 299-303.

- [17] Curl, C. L., Fenske, R. A., Elgethun, K. (2003). Organophosphorus Pesticide Exposure of Urban and Suburban Preschool Children with Organic and Conventional Diets. *Environ Health Perspect*, 111, 377–382.
- [18] Heudorf, U., Angerer, J., Drexler, H. (2004). Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of Pyrethroid and organophosphorus. *Int Arch Occup Environ Health*, 77, 67-72.
- [19] Valcke, M., Sammel, O., Bouchard, M., Dumas, P., Belleville, D., Tremblay, C. (2006). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada. *Int Arch Occup Environ Health*, 79, 568-577.
- [20] Muñoz-Quezada, M.T., Iglesias, V., Lucero, B., Steenland, K., Barr, D.B., Levy, K., et al., (2012). Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environ Int*, 47, 28–36.
- [21] Oulhote, Y., Bouchard, M. F. (2013). Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Behavioral Problems in Canadian Children. *Environ Health Perspect*, 121, 1378–1384.
- [22] Curl, C. L., Fenske, R. A., Kissel, J. C., Shirai, J. H., Moate, T. F., Griffith, W., et al. (2002). Evaluation of Take-Home Organophosphorus Pesticide Exposure among Agricultural Workers and Their Children. *Environ Health Perspect*, 110, 787-792.
- [23] Koch, D., Lu, C., Fisker-Andersen, J., Jolley, L., Fenske, R. A. (2002). Temporal Association of Children's Pesticide Exposure and Agricultural Spraying: Report of a Longitudinal Biological Monitoring Study. *Environ Health Perspect*, 110, 829-833.
- [24] Thompson, B., Coronado, G. D., Grossman, J. E., Puschel, K., Solomon, C. C., Curl, C. L., et al. (2003). Pesticide take-home pathways among children of agricultural workers: study design, methods and baseline findings. *J Occup Environ Med*, 45, 42-53.
- [25] Quintanilla-Vega, B., Pérez-Herrera, N., Rojas-García, E. (2010). Epidemiological studies of anticholinesterase pesticide poisoning in Mexico. In: *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. Satoh T, Gupta RC(Eds). John Wiley & Sons, Inc, 471–479.
- [26] Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., and Quintanilla-Vega, B. (2011). Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol Mech Methods*, 21(9), 681–691.
- [27] Rotterdam Convention. (2008). Anex III. Disponible en: [http://www.pic.int/Portals/5/ResourceKit/A\\_General%20information/b.Overview/OVERVIEW\\_En09.pdf](http://www.pic.int/Portals/5/ResourceKit/A_General%20information/b.Overview/OVERVIEW_En09.pdf)
- [28] CICOPLAFEST. (2004). Comisión Intersecretarial para el Control del proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo de Plaguicidas 2004. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- [29] Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M.E., Félix-Gastélum, R., et al., 2009. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ Int*, 35, 1155–1159.
- [30] Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco-Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., et al., (2010). Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol Appl Pharmacol*, 249(1), 16–24.
- [31] Gamlin, J., Diaz Romo, P., Hesketh, T. (2006). Exposure of young children working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. *Child Care Health Dev*, 33(3), 246-8.
- [32] INEGI. (2010). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo de Población y Vivienda 2010. Disponible en: <http://www.inegi.gob.mx>
- [33] Barr, D.B., Barr, J.R., Driskell, W.J., Hill, R.H., Ashley, D.L., Needham, L.L., et al. (1999). Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicol Ind Health*, 15(1–2), 168–179.



- [34] Rodríguez, T., Younglove, L., Lu, C., Funez, A., Weppner, S., Barr, D., et al., (2006). Biological Monitoring of Pesticide Exposures among Applicators and Their children in Nicaragua. *Int J Occup Environ Health*, 12, 312-320.
- [35] Fenske, R. A., Lu, C., Curl, C. L., Shirai, J. H., Kissel, J. C. (2005). Biologic Monitoring to Characterize Organophosphorus Pesticide Exposure among Children and Workers: An Analysis of Recent Studies in Washington State. *Environ Health Perspect*, 113, 1651-1657.
- [36] Vida, P., Moretto, A. (2007). Pesticide exposure pathways among children of agricultural workers. *J Public Health*, 15, 289-299.
- [37] Au, W. W., Oh, H. Y., Grady, J., Salama, S. A., Heo, M. Y., 2001. Usefulness of Genetic Susceptibility and Biomarkers for Evaluation of Environmental Health Risk. *Environ. Mol. Mutagen*, 37, 215-225
- [38] Quandt, S. A., Hernández-Valero, M. A., Grzywacz, J. G., Hovey, J. D., Gonzales, M., Arcury, T.A. (2006). Workplace, Household, and Personal Predictors of Pesticide Exposure for Farmworkers. *Environ Health Perspect*, 114, 943-952.
- [39] Bradman, A., Kogut, K., Eisen, E. A., Jewell, N. P., Quirós-Alcalá, L., Castorina, R. et al., (2013). Variability of Organophosphorous Pesticide Metabolite Levels in Spot and 24-hr Urine Samples Collected from Young Children during 1 Week. *Environ Health Perspect*, 121, 118-124.
- [40] Lu, C., Bravo, R., Caltabiano, L.M., Irish, R.M., Weerasekera, G., Barr, D.B. (2005). The presence of dialkylphosphates in fresh fruit juices: Implication for organophosphorus pesticide exposure and risk assessments. *J Toxicol Environ Health*, 68, 209-227.
- [41] Zhang, X., Driver, J. H., Li, Y., Ross, J. H., Krieger, R. I. (2008). Dialkylphosphates (DAPs) in fruits and vegetables may confound biomonitoring in organophosphorus insecticide exposure and risk assessment. *J Agric Food Chem*, 56, 10638-10645.

### **Capítulo III. Polymorphisms and activity of PON1 in Mexican children and adolescents exposed to organophosphate pesticides from an agricultural community**

**Resumen.** La paraoxonasa 1 (PON1) es una enzima, la cual interviene en la desintoxicación de ciertos plaguicidas organofosforados (OPs) y previene la oxidación de las LDL. Pocos estudios han evaluado la asociación entre la exposición a OPs y PON1 en niños y adolescentes. Nosotros determinamos los metabolitos urinarios dialquilfosfato (DAP) y las actividades arilesterasa (AREasa) y paraoxonasa (POasa) y los polimorfismos PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub> en 107 niños y adolescentes (6-14 años de edad) que viven en una localidad agrícola. Cuestionarios respecto a aspectos sociodemográficos y otras variables de interés fueron aplicados a las madres de los niños. Las frecuencias de los alelos L y Q fueron 84% y 38%, para PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub>, respectivamente. El valor de la mediana para los DAPs fue 229.2 nmol/L (<LOD, 1292.2). Las concentraciones de DAPs ajustadas por creatinina no presentaron diferencias significativas de acuerdo a los polimorfismos de PON1. La variabilidad de las actividades AREasa y POasa fue explicada considerando ambos polimorfismos (PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub>) en un 12.7% y 42.2%, respectivamente. La disminución de la actividad AREasa [ $\beta = -4.4$  (95% CI,  $-8.6$  to  $-0.32$ )] estuvo asociada con un incremento en las concentraciones de DAPs (ajustada por creatinina y estratificada por tertiles). Diferencias significativas en el valor de la mediana fueron observadas con respecto a la ocupación del padre y a la proximidad de campos agrícolas al hogar ( $p < 0.05$ ). Además, los niños que viven cerca de campos agrícolas mostraron menor actividad AREasa que los niños que no viven cerca de ellos. Nuestros resultados sugieren que los niños que viven en localidades agrícolas podrían estar en mayor riesgo de exposición a plaguicidas OP. Se deben realizar esfuerzos para reducir la exposición a estos compuestos.

**Keywords:** metabolitos dialquilfosfatos, actividad y polimorfismos de PON1, localidad agrícola; niños; México.

## **Polymorphisms and activity of PON1 in Mexican children and adolescents exposed to organophosphate pesticides from an agricultural locality**

Rocío Ramírez-Jiménez <sup>a,g</sup>, Jaqueline Calderón-Hernández <sup>b</sup>, Marina Lacasaña <sup>c,d</sup>, Regina Montero-Montoya <sup>e</sup>, Antonio Monroy-Noyola <sup>f</sup>, Jorge Alegria-Torres <sup>g</sup> and Leticia Yáñez-Estrada <sup>h\*</sup>

<sup>a</sup> *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, México*

<sup>b</sup> *Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

<sup>c</sup> *Escuela Andaluza de Salud Pública (Andalusian School of Public Health), Spain*

<sup>d</sup> *CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) (CIBRE of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Spain*

<sup>e</sup> *Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México*

<sup>f</sup> *Laboratorio de Neuroprotección y Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México*

<sup>g</sup> *Universidad de Guanajuato, México*

<sup>h</sup> *Laboratorio de Género, Salud y Ambiente, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

\*Corresponding author:

Faculty of Medicine,

Universidad Autónoma de San Luis Potosí,

Avenida Venustiano Carranza 2405,

San Luis Potosí, S.L.P., 78210, México

Tel.: 52 4448262347 ext. 6643; fax: 52 4448262351

Email address: lyanez58@hotmail.com, lyanez@uaslp.mx; (L. Yáñez-Estrada)

## ABSTRACT

Paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme, which takes part in detoxification of certain organophosphate (OPs) and prevents LDL oxidation. Few studies have assessed the association between the exposure to OPs and PON1 in children and adolescents. We determined urinary dialkylphosphate metabolites (DAP) and PON1 activity (arylesterase and paraoxonase) and polymorphisms (PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub>) in 107 children and adolescents (6-14 years old) living in an agricultural locality. Questionnaires about sociodemographic aspects and other variables of interest were also applied. Frequencies of L and Q alleles were 84% and 38%, for PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub>, respectively. Median value for DAPs was 229.2 nmol/L (<LOD, 1292.2). No significant differences in DAPs concentrations were observed according to PON1 polymorphisms. The variability of arylesterase and paraoxonase activities was jointly explained by both polymorphisms (PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub>) in 12.7% and 42.2%, respectively. Decreasing in the AREase activity [ $\beta=-4.4$  (95% CI, -8.6 to -0.32)] was associated with an increase in DAPs concentrations (adjusted by creatinine and stratified by tertiles). Significant differences were observed in median value of DAPs with respect to father's occupation and to the proximity of homes to farmland ( $p<0.05$ ). In addition, the children living close to farmland show less AREase activity, than children who do not live close to them. Our results suggest that children who live in agricultural localities may be at a greater risk of exposure to OP pesticides. Efforts to reduce exposure to these compounds must be addressed.

*Keywords:* dialkylphosphates; PON1 activity and polymorphisms; farming town; children; Mexico

## 1. Introduction

Organophosphates pesticides (OPs) are among the most used pesticides currently, these compounds are neurotoxic and its main toxicity mechanism is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), though they also act at other levels (Androutsopoulos et al., 2012).

One of the most common ways to assess OP pesticide exposure is through quantification of six dialkylphosphate metabolites in urine; these metabolites are dimethylphosphate (DMP), diethylphosphate (DEP), dimethylthiophosphate (DMTP), diethylthiophosphate (DETP), dimethyldithiophosphate (DMDTP) and diethyldithiophosphate (DEDTP) (Fenske et al., 2005; Barr et al., 2011). Various researchers have used the measurement of these metabolites to estimate exposure to OP pesticides in children and adolescents (Lambert et al., 2005; Valcke et al., 2006; Arcury et al., 2007).

Genetic variations affecting individual susceptibility are of particular interest in relation with the development of diseases associated with exposure to environmental contaminants. Among the responsible genes for this susceptibility are those of enzymes that metabolize and detoxify toxic substances (Au et al., 2001). An important enzyme in the detoxification of the OPs (oxones) is paraoxonase 1 (PON1), which is a calcium-dependent esterase associated to high-density lipoproteins (HDL), formed by 354 aminoacids (Costa et al., 2003). PON1 has a key role in human susceptibility to OPs toxicity. Numerous PON1 polymorphisms have been identified (Harel et al. 2004), PON1<sub>Q192R</sub>, in particular, is important because it affects the catalytic efficiency of the enzyme, which is substrate-dependent (Davies et al. 1996; Costa et al., 2003). This polymorphism consists in the substitution of a glutamine (Q-allele) by an arginine (R-allele) (Adkins et al., 1993; Humbert et al., 1993). *In vitro* assays have shown that PON1<sub>R192</sub> allozyme hydrolyzes the paraoxon and chlorpyrifos-oxon more efficiently than PON1<sub>Q192</sub>; while other OPs, such as diazoxon are hydrolyzed more rapidly by PON1<sub>Q192</sub> (Davies et al., 1996; Humbert et al., 1993; Li et al., 2000). Nevertheless, *in*



*vivo* studies indicate that both allozymes hydrolyze much like diazoxon (Li et al., 2000); and that PON1<sub>R192</sub> allozyme provided better protection to chlorpyrifos-oxon than PON1<sub>Q192</sub> (Cowan et al., 2001). On the other hand, PON1<sub>L55M</sub> polymorphism [a leucine (L-allele) substitution by methionine (M-allele)] has been associated with differences in PON1 serum levels, reporting that PON1<sub>55L</sub> allozyme shows higher PON1 levels than PON1<sub>M55</sub> (Blatter-Garin et al., 1997; Costa et al., 2003). This effect on enzyme expression is also relevant for OPs metabolism.

Moreover, some studies have shown PON1 participation in lipid metabolism, reporting that PON1<sub>R192</sub> isoform is less efficient in the hydrolysis of oxidized low density lipoproteins (LDL) than PON1<sub>Q192</sub> isoform, suggesting that individuals with this isoform could be more susceptible to suffering from atherosclerosis and cardiovascular disease (Aviram et al., 2000; Wang et al., 2011).

PON1 activity and genotypic distribution vary widely in humans. Inter-individual variability of PON1 activity fluctuates 10 to 40 times, while the variation among individuals with the same PON1<sub>192</sub> genotype is at least 13 times (Richter and Furlong, 1999; Costa et al., 2003). Researchers have emphasized the importance of PON1 status in susceptibility to organophosphorus insecticides as well as a risk factor for cardiovascular diseases (Richter and Furlong, 1999; Richter et al., 2009). PON1 status includes PON1 levels and PON1<sub>Q192R</sub> functional genotype. PON1 status can be determined through a bi-dimensional substrate assay, in which PON1 hydrolysis rates toward two substrates, for example, phenylacetate (arylesterase activity) and paraoxon (paraoxonase activity) are shown in graphs (Richter and Furlong, 1999; Richter et al., 2009).

Children are particularly vulnerable to toxic effects of pesticides due to physiological mechanisms immature detoxification (Weiss et al., 2004; Sly and Flack, 2008). Recent studies have reported that PON1 levels are lower in children than those of adults (Chen et al., 2003; Huen et al., 2010). There are few studies that have assessed PON1 activity and polymorphisms in Mexican populations (Rojas-García et al., 2005; López-Flores et

al., 2009); especially in children living in farming localities (Gonzalez et al., 2012); however the population of children in Mexico reaches 32.5 million (29% of the total population), of which 26.6% live in rural localities (INEGI, 2010).

The objective of this study was to determine PON1 activities (arylesterase and paraoxonase) and polymorphisms (PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub>) as well as urinary dialkylphosphate metabolites concentrations in Mexican children from an agricultural locality. Moreover, we examined the relationship between PON1 activity and polymorphisms and dialkylphosphate metabolites.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Study design and population*

A cross-sectional study was conducted with children and adolescents residing in El Refugio locality during the period with the highest amount of pesticide application (May-August). This locality is located in the municipality of Ciudad Fernandez in one of the most important agricultural zones of the State of San Luis Potosi, Mexico, in which different types of pesticides are applied (OPs, pyrethroids, carbamates, organochlorines). Ethyl chlorpyrifos, diazinon, malathion, methamidophos, methyl parathion, dimethoate, acephate, ethion and monocrotophos are among OPs most used.

Before selecting children to participate, a meeting was held with parents in two Elementary Schools, whose authorities agreed to take part in the study. During the meeting, objectives, methods and duration of the project were explained. The study population consisted of a convenience sample of 107 children and adolescents (51 girls and 56 boys) ranging from 6 to 14 years old, who had resided in the locality for at least 5 years and were clinically healthy (reported by the mother). The sample size of this study has statistical potential of more than 80% and a 95% significance level (Epi Info™ 7). Parents of participants signed an informed consent form prior to samples collection

and application of questionnaires. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, UASLP.

## *2.2 Sample collection*

Sampling was carried out during spring in a month with the highest pesticide application (May 2010). Blood samples were collected (8.5 mL) by venipuncture, using a BD Vacutainer® tube with EDTA and another without anti-coagulant to analyze genetic polymorphisms and PON1 enzyme activities, respectively. To determine enzyme activities, blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min to obtain the serum. To analyze dialkylphosphate metabolites, urine specimens were collected during five days (morning urine). Equal volumes of urine from each day were mixed to form a composite sample which was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis.

An interview with parents was conducted in order to obtain information on general sociodemographic characteristics, family history, parents occupation, illnesses, mother's obstetric history, consumption of alcohol and tobacco by parents, exposure to pesticides of children and their mothers (during pregnancy), consumption of foods of vegetable origin and lifestyle of participating children. Mothers were interviewed using a questionnaire with 80 questions and required around 20 min to be completed.

Anthropometric measurements were registered (age, weight and height). Body Mass Index (BMI) and Body Mass Index for Age (BMI-for-age) were calculated through AnthroPlus v1.0.4 software

## *2.3 Analysis of dialkylphosphate metabolites*

Exposure to organophosphate pesticides was assessed by measurement of six urinary dialkylphosphate metabolites: dimethylphosphate (DMP), dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphate (DMDTP), diethylphosphate (DEP), diethylthiophosphate (DETP), and diethyldithiophosphate (DEDTP). Analysis was

performed according to the method described by Valcke et al., (2006). Urine samples were spiked with an isotopically labeled internal standard and derivatized using pentafluorobenzyl bromide and potassium carbonate at 80°C for 2 h. Pentafluorobenzyl esters were extracted with a mixture of hexane/methylene chloride and were concentrated under nitrogen stream. Analysis was performed using a gas chromatograph (Agilent 6850)-mass spectrometer (Agilent 5973N) system with an electron impact ionization source operating in single ion monitoring mode (GC-MS-EI-SIM). Urinary creatinine concentration was determined using a colorimetric method based on the Jaffe reaction (Creatinine Procedure No. 555, Sigma Diagnostics, St Louis, Mo).

Limits of detection (LOD) were 1.36, 1.49, 0.27, 1.07, 0.98 and 0.52 µg/L for DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, and DEDTP, respectively. Average recoveries of the six metabolites ranged from 92 to 111%. Repeatability and reproducibility coefficients of variation of analytic method were between 3.0 to 10.3% and 7.7 to 16.7 %, respectively. The calibration curves of the all metabolites were linear ( $r \geq 0.993$ ).

#### *2.4 Determination of PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub> polymorphisms*

DNA was extracted using Fermentas Life Science® Genomic DNA Extraction Kit and Bio-rad Laboratories® Aquapure™ Genomic DNA kits according to manufacturer's instructions. PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub> polymorphisms were determined using polymerase chain reaction technique for restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), according to the procedure described by Humbert et al., (1993). The primer sequences for PON1<sub>Q192R</sub> were: 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' and for PON1<sub>L55M</sub> were: 5'-GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG-3' 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'. PCR was done with 25 µL of reaction mixture containing 100 ng of DNA template, 15pmol of each primer, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1×Taq Buffer ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 200 mM dNTPs and 1 U TaqDNA polymerase (Fermentas Life Sciences) employing a Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 thermocycler. PCR amplification consisted of 5 min of

denaturalization at 94°C, followed by 35 cycles (denaturation at 92°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds), and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were digested at 55°C for 1 h using BspPI (*A/w*, Fermentas Life Science) for PON1<sub>Q192R</sub> and at 37°C for 1 h using *Hin*III (*Nla* III, Fermentas Life Science) for PON1<sub>L55M</sub>. Digested fragments were separated by electrophoresis in acrylamide gels at 7.5% and 20% for PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub>, respectively; and visualized with ethidium bromide.

### 2.5 Determination of enzyme activities

Arylesterase (AREase) and salt-stimulated paraoxonase (POase-NaCl) activities were measured spectrophotometrically using phenylacetate and paraoxon, respectively, according to the method by Gan et al., (1991) y Humbert et al., (1993). AREase activity was determined in serum at 25°C and pH 8.0 with phenylacetate (1 mM), Tris–HCl (10 mM) and CaCl<sub>2</sub> (1 mM); phenol produced was measured at 270 nm for 3 minutes, the activity was calculated using 1310 molar extinction coefficient and was expressed in µmol/min/mL (Gan et al. 1991). POase-NaCl activity (salt-stimulated paraoxonase) was determined through monitoring paraoxon hydrolysis, adding 20 µL of problem serum to 980 µL of a solution containing 1 mM paraoxon, 10 mM Tris–HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 2.6 M NaCl at pH 8.0; the rate of *p*-nitrophenol formation was monitored for 5 min at 412 nm and activity calculated using a molar extinction coefficient of 17000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> and expressed in nmol/min/mL (Humbert et al. 1993).

### 2.6 Statistical analysis

The concentrations (µg/L) of six dialkylphosphate metabolites were converted to molar concentrations (nmol/L) and summed to produce total dialkylphosphate levels (DAPs). Likewise, Dimethyl- (DMP, DMTP and DMDTP) and diethylphosphate (DEP, DETP and DEDTP) metabolites were summed to obtain total dimethylphosphate (DMPs) and total diethylphosphate (DEPs) metabolites, respectively. Metabolite levels were adjusted by

urinary creatinine concentration. Dialkylphosphate metabolite levels below the LOD were assigned a value of  $\text{LOD}/\sqrt{2}$  (Barr et al. 1999) for purpose of statistical analysis.

The genotype frequencies of the  $\text{PON1}_{\text{L55M}}$  and  $\text{PON1}_{\text{Q192R}}$  polymorphisms were determined by direct count. Chi squared tests ( $\chi^2$ ) were applied to assess the concordance of genotypic frequencies of polymorphisms with the Hardy-Weinberg equilibrium model and significance of the linkage disequilibrium between the two polymorphisms.

The AREase and POase-NaCl activities were considered dependent variables and the  $\text{PON1}_{\text{Q192R}}$  and  $\text{PON1}_{\text{L55M}}$  genotypes independent variables. The variables of age, sex, length of time residing in the locality, prenatal exposure to pesticides, father's occupation, residential exposure to insecticides, proximity of farmland to the home, among others, were included as covariables. Normality of continuous variables was assessed with a Kolmogorov-Smirnov test and variables which did not adjust to normal distribution were transformed to a natural logarithm (BMI and BMI-for-age).

The relationship between AREase and POase-NaCl activities with continuous variables (age and time of residence, among others) were assessed by means of Pearson correlation coefficients. Differences between AREase and POase-NaCl activities, according to  $\text{PON1}_{\text{Q192R}}$  and  $\text{PON1}_{\text{L55M}}$  genotypes and other categorical variables (sex, father's occupation and exposure to household insecticides, among others) were evaluated by analysis of variance (ANOVA) or *t*-test.

The urinary dialkylphosphate concentrations were not normally distributed; therefore, nonparametric tests including the Mann-Whitney *U*-test and Kruskal-Wallis were used to compare metabolite concentrations according to genotypes and activity of  $\text{PON1}$  and other variables documented in the questionnaire (sex, father's occupation, residential exposure to insecticides and proximity of farmlands to homes, among other).

Simple and multiple linear regression models were used to assess the influence of PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub> genotypes on the variability of AREase and POase-NaCl activities. Genotypes of the polymorphism were coded in dummy variables, taking RR and LL genotypes as reference for PON1<sub>Q192R</sub> and PON1<sub>L55M</sub>, respectively. Firstly, simple regression models were used to examine the influence of PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms on AREase or POase-NaCl enzymatic activities; then multiple regression linear models (MRLM) were carried out to assess the contribution of both polymorphisms on the enzymatic activities.

The association between AREase and POase-NaCl activities, dialkylphosphate metabolites, sociodemographic variables and pesticide exposure were also analyzed. Firstly, simple regression linear models were used to assess the influence of each covariable (age, sex, place of birth, time residing in the locality, proximity of farmlands to homes, father's occupation and exposure to insecticides in home, among other) on enzymatic activities. Dialkylphosphate metabolites were examined as continuous variables and stratified by tertiles. The variables with  $p \leq 0.20$  in bivariate analysis were considered in the MRLM and only those variables with  $p < 0.05$  were included in the final models.

The statistical analysis was realized with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 18 for Windows™ (SPSS Inc. Chicago, IL), considering a significance level of  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### *3.1 Characteristics of the study population*

The characteristics of the study population are shown in Table 1. The children's average age was  $9.7 \pm 1.9$  years old (6 to 14 years old), 47.7% were girls, and 88.8% were born in the study zone, of which 81.3% had lived exclusively in the study locality.

Approximately 50% of the children had relatives that have worked in activities related to agriculture and 85% reported that they lived near farmlands.

### *3.2 Concentrations of dialkylphosphate metabolites*

Table 2 shows the descriptive statistics for individual dialkylphosphate metabolites, DMPs, DEPs and DAPs in urine samples of 107 participants of 6 to 14 years old. At least, one of the six metabolites was detected in 99.1% of the samples. DMTP was found more frequently and in greater concentration among dimethylphosphate metabolites (99.1%), whereas DEP metabolite was the most frequently detected among the diethylphosphate metabolites (86.0%), and DEDTP was the metabolite detected at the lowest concentration. Median values (minimum, maximum) of DMPs, DEPs and DAPs were 162.8 (<LOD, 1222.3), 53.3 (<LOD, 347.4) and 229.2 (<LOD, 1292.2) nmol/L, respectively. DMPs metabolites were found in significantly higher concentrations than DEPs (Wilcoxon signed-rank test,  $p < 0.05$ ).

### *3.3 Polymorphisms and activities of PON1*

PON1<sub>55L</sub> and PON1<sub>55M</sub> allele frequencies were 0.84 and 0.16, respectively, and for PON1<sub>192Q</sub> and PON1<sub>192R</sub> alleles were 0.38 and 0.62, respectively. PON1<sub>L55M</sub> genotypic frequencies were 72% (LL), 23.4% (LM) and 4.7% (MM) and 10.3% (QQ), 55.1% (QR) and 34.6% (RR) for PON1<sub>Q192R</sub> (Table 3). Genotypic frequencies of two polymorphisms did not differ significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ( $p = 0.32$  for PON1<sub>L55M</sub>, and  $p = 0.21$  for PON1<sub>Q192R</sub>) and PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms did not show any significant linkage disequilibrium ( $X^2 p = 0.99$ ,  $D = -0.0035$ ).

The values of arithmetic media  $\pm$  standard deviation of AREase and POase-NaCl activities were  $54.4 \pm 18.4$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  and  $152.4 \pm 91.3$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ , respectively. A significant interindividual variability was seen in PON1 enzymatic activity; values of AREase activity fluctuates from 9 to  $101.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  and POase-NaCl activity oscillate from 8.7 to  $454.4 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mL}$ .



Average values of AREase and POase-NaCl activities, according to PON1<sub>L55M</sub> genotypes were statistically different (ANOVA,  $p < 0.05$ ); while only POase-NaCl activity was statistically different (ANOVA,  $p < 0.05$ ) for PON1<sub>Q192R</sub> genotype. Children with PON1<sub>55LL</sub> genotype presented greater AREase and POase-NaCl activities ( $58.2 \pm 17.0$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  and  $181.2 \pm 87.6$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ , respectively), while children with PON1<sub>192RR</sub> genotype showed greater POase-NaCl ( $220.2 \pm 100.9$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ ) activity.

No significant differences in dialkylphosphate metabolites concentrations were observed according to polymorphism PON1<sub>L55M</sub>. In relation to PON1<sub>Q192R</sub> only marginal significant difference was observed in levels of DEPs ( $p = 0.047$ , Kruskal-Wallis); though concentrations unadjusted for creatinine were not statistically different (data not shown).

### *3.4 Influence of polymorphisms on PON1 activities*

According to bivariate linear regression analysis, PON1<sub>L55M</sub> had a significant influence on variability of AREase activity in 10.9% ( $p = 0.02$ ); while PON1<sub>Q192R</sub> did not have any significant influence (2.2%,  $p = 0.31$ ); for the variability of POase-NaCl activity, PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> showed influence of 27.9% ( $p < 0.001$ ) and 35.3% ( $p < 0.001$ ), respectively. With the inclusion of both polymorphisms in MRLM models, these had an influence on the variability of AREase and POase-NaCl activities of 12.7% ( $p = 0.02$ ) and 42.2% ( $p < 0.001$ ), respectively.

Regarding to the contribution of PON1<sub>L55M</sub> genotypes, children with LM and MM genotypes presented significantly low AREase activity [ $\beta = -12.0$  (95% CI, -20.0 to -4.0) and  $\beta = -18.5$  (95% CI, -34.6 to -2.4), respectively] and POase-NaCl activity [ $\beta = -93.4$  (95% CI, -129.3 to -57.5) and  $\beta = -153.8$  (95% CI, -225.8 to -81.9), respectively] than LL homozygotes. With respect to PON1<sub>Q192R</sub> genotypes, children with QR and QQ genotypes presented less POase-NaCl activity [ $\beta = -91.1$  (95% CI, -122.3 to -59.9) and  $\beta = -169.3$  (95% CI, -220.1 to -118.4), respectively], than those with RR genotype (Table 4).

### *3.5 Dialkylphosphate metabolites and PON1 activities according to variables in questionnaire*

No significant differences were observed between arithmetic mean of AREase and POase-NaCl activities ( $p < 0.05$ , *t*-test) according to children's sex, the number of years of residence in the locality ( $\leq 5$  years,  $> 5$  years), mother's exposure to pesticides during pregnancy, father's occupation and proximity of home to farmland, among others.

Significant differences were observed in median values of DAPs and DMPs (adjusted for creatinine) with respect to variables: father's occupation (Mann-Whitney *U*-test,  $p < 0.05$ ) and the proximity of home to farmland (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). Also, significant differences were observed in the median of DEPs (adjusted for creatinine) according to variable "father's occupation" (Mann-Whitney *U*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 5). On the other hand, significant differences were observed in levels of DAPs and DMPs (unadjusted for creatinine) according to variables: age and whether the child accompanies a family member to farmlands, respectively; however, DEPs levels (unadjusted for creatinine) according to variable "father's occupation" were not statistically different (data not shown).

### *3.6 Influence of DAP metabolites and other variables on PON1 activities*

Table 6 shows the MRLM of PON1 activities adjusted by  $PON_{1L55M}$ ,  $PON_{1Q192R}$  and associated variables. Only significant variables ( $p < 0.05$ ) are included in the final models. Children who live close to farmland showed less AREase activity [ $\beta = -3.6$  (95% CI, -6.8 to -0.42)] than children who do not live close to them. Furthermore, children exposed to insecticides in their home during the month prior to the study, showed low POase-NaCl activity [ $\beta = -38.8$  (95% CI, -67.1 to -10.6)]. Decreasing AREase activity was associated with an increase of DAPs adjusted by creatinine and stratified by tertiles [ $\beta = -4.4$  (95% CI, -8.6 to -0.32)].

Also, decreasing in AREase and POase-NaCl activities were associated with an increase of DMPs levels adjusted by creatinine and stratified by tertiles [ $\beta=-6.0$  (95% CI,  $-10$  to  $-2.0$ );  $\beta=-23.9$  (95% CI,  $-39.9$  to  $-7.9$ ), respectively].

#### 4. Discussion

Although several OP pesticides such as methyl parathion, methamidophos and chlorpyrifos have been banned or severely restricted in some countries (Rotterdam Convention, ANEX III, 2008), their use in Mexican rural and urban localities is extensive (CICOPLAFEST, 2004; Sánchez-Guerra et al., 2011).

We evaluated exposure to OP pesticides through the measurement of six urinary dialkylphosphate metabolites in 107 children and adolescents (6-14 years), living in a Mexican farming locality. In the study site, the methylated organophosphates were most frequently used (malathion, dimethoate, azinphos-methyl and methyl parathion) than the ethylated organophosphates (chlorpyrifos, diazinon and ethion), therefore this is consistent with our findings that DMPs metabolites showed significantly higher concentrations than DEPs in urine samples. Median values of DMPs and DEPs metabolites (162.8 nmol/L and 58.3 nmol/L, respectively) of children participating in this study were 1.5 to 3.7 times higher than those reported in children of other farming localities (Curl et al., 2002; Koch et al., 2002; Bradman et al., 2013) around the world, and in children of American and Canadian urban localities and of general population (Lu et al., 2001; Koch et al., 2002; Barr et al., 2004; Oulhote et al., 2013). On the other hand, median values of DMPs and DEPs metabolites in children of our study were similar to those reported by other studies in children from farming localities (Curl et al., 2002; Bradman et al., 2013) and in children of an urban locality (Lambert et al., 2005); and the median value of DMPs was 1.4 to 2.7 times lower than those reported in children of three farming localities in Oregon. These comparisons should be considered with precaution, because children's age interval of some of these studies is different to children's age interval of our study.

Most children are probably exposed to OPs to some extent; however, children in agricultural localities also may be exposed through other pathways (Vida and Moretto, 2007). Children living in farming localities whose parents work with pesticides have a greater risk of exposure to OPs because of the proximity of their homes to farmland, and the possibility of their parents carrying pesticide residue on their bodies, clothes and shoes to home after performing field tasks (Vida and Moretto, 2007), as well as the intake of food and water contaminated with these agrochemicals and the use of insecticides at home (Fenske et al., 2002). Previous studies that have examined the levels of dialkylphosphate metabolites in relation to proximity to pesticide-treated farmland have reported conflicting results. For example, Lu et al. (2000) found significantly higher concentrations of urinary pesticide metabolites in children living in households that were within 200 feet of treated orchards compared to those living farther away; conversely, Koch et al. (2002) and Arcury et al. (2007) reported no significant association between these variables. In our study, the data about the proximity of farmland to home were obtained by asking mothers: How far is home from farmland? ( $\leq 15\text{m}$ ,  $>15$  to  $60\text{m}$ ,  $>60$  to  $250\text{m}$  and no exist). Children living near farmland showed significantly higher concentrations of DAPs and DMPs (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ), than children who do not live near farmland; however, these differences were not statistically significant for DEPs. Also, it has been reported that exposure to insecticides in home in farming localities is important; Quandt et al. (2004) detected residues of agricultural and residential pesticides in 95% of households monitored. In our study, 44% of surveyed mothers reported the use of mostly spray insecticides at home; however, no significant differences in DAPs, DMPs and DEPs were observed according to this variable (Mann-Whitney  $U$ -test,  $p < 0.05$ ).

Other factors influencing variability of urinary dialkylphosphate metabolites might include the location of child's home relative to spray or spray drift or the frequency with which a child plays in nearby fields, seasonal differences in application and use of pesticides, meteorological conditions and degradation of residues (Fenske et al., 2005; Vida and Moretto, 2007).

The genetic factor may also influence the variability in levels of pesticides; for some OPs, PON1 polymorphisms play a key role in individual susceptibility to toxicity of these pesticides (Costa et al., 2005). The distribution of allele frequencies of PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms shows significant variability in human populations. In our study population, L and R allele (0.84, 0.62) were the predominant alleles for PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub>, respectively. These frequencies are similar to those seen in Afro-American and Asian populations (Chen et al., 2003; Mohamed and Chia, 2008). With respect to PON1<sub>L55M</sub>, our study population has more similarity to allele frequencies seen by Rojas-García et al. (2005); while for PON1<sub>Q192R</sub>, the allele frequencies are closer to those reported in Mexican population by Moreno-Banda et al. (2009) and Lacasaña et al. (2010).

Considering the predominant genotypes frequencies (55LL/192QR with 36.5% and 55LL/192RR with 33.6%) in our study population, it might be expected that this would offer more protection against paraoxon and chlorpyrifos-oxon but it could be less efficient in oxidized-LDL hydrolysis because of the higher presence of the R-allele; however, the predominance of the L-allele confers a protective effect on the population because this allele is related to higher levels of PON1 in serum. It has been indicated that both PON1 quantity (level in plasma or serum) and quality (catalytic efficiency) are important in estimating the risk of OPs exposure intoxication or of developing cardiovascular diseases (Richter and Furlong, 1999; Li et al., 2000).

Some studies have reported that PON1<sub>L55M</sub> polymorphism is associated with differences in PON1 serum levels (Blatter-Garin et al., 1997); while the PON1<sub>Q192R</sub> polymorphism has a substrate-dependent influence on PON1 catalytic efficiency in protecting against exposure to some OPs (Davies et al., 1996; Li et al., 2000) and that also intervenes in the hydrolysis of oxidized-LDL, a key process in the risk of atherosclerosis and cardiovascular diseases (Durrington et al. 2001). POase-NaCl activity regarding PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> genotypes showed patterns similar to those reported in other studies: LL>LM>MM and RR>QR>QQ, respectively (Chen et

al., 2003; Rojas-Garcia et al., 2005). On the other hand, the AREase activity was not affected by PON1<sub>Q192R</sub> (Chen et al., 2003; Holland et al., 2006) and the pattern, for PON1<sub>L55M</sub> genotypes was similar to that of POase-NaCl activity (Chen et al., 2003).

Significant interindividual variability was observed in AREase activity of the study population (9 to 101.7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ) and POase-NaCl activity (8.7 to 454.4  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ ), a consistent result with previous studies on children and adults-(Rojas-García et al., 2005; Furlong et al., 2006; Holland et al., 2006; Huen et al., 2009).

It has been reported that contributions of the PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms to molecular phenotype (enzyme activity) differ depending on the ethnicity (Chen et al. (2005). In accordance with what was reported by Rojas-García et al., (2005), influence of the PON1<sub>L55M</sub> polymorphism on AREase activity (12%) on an adult Mexican population was similar to that observed in this study in children (10.9%); and the influence of PON1<sub>Q192R</sub> polymorphism in AREase activity (13%), our results indicate an insignificant contribution (2.2%) in concordance with what is reported by Huen et al., (2009). The joint contribution of both PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms in AREase and POase-NaCl activities of our study population (12.7% and 42.2%, respectively) differ from those reported in other population of children with different ethnicities and age ranges (Huen et al., 2010).

It has been reported that PON1 serum activity in humans is very low at birth and increases with age (Chen et al., 2003; Huen et al., 2009), being still significantly low in 7 year-old children in comparison to adults (Huen et al., 2010). The average age of children that took part in our study ( $9.6 \pm 1.9$  years old) was similar to that studied by Gonzalez et al. (2012), who reported PON1 activity in 9 year-old children and their mothers showed no significant differences, suggesting that PON1 activities at 9 years of age could be close to those of adult levels. There are no reports on AREase and POase activities which would allow us to know just how close the activities of children in our study could be to those of adults from the same locality.

PON1 genetic polymorphisms play a key role in the activity of this enzyme; however, the contribution of other factors (environmental, epigenetic, pharmacological, diet, lifestyles and certain physiological and pathological conditions) could be important in modulating PON1 activity, affecting its expression, and therefore, individual susceptibility to toxic OP pesticides and oxidative stress (Costa et al., 2005). For example, it has been suggested that the ingestion of antioxidants increases PON1 activity; but smoking decreases it (Costa et al., 2005). In the multiple linear regression analysis, factors such as the habit of smoking and the ingestion of alcohol were not included since all the mothers of the children stated that there were no smokers in the family, nor had they smoked or consumed alcohol during pregnancy. The responses were very homogeneous in regard to their eating habits. More than 90% of the mothers stated that their children's diet includes some vegetable content (fruit, cereals, legumes, other greens). Various vegetables and fruits consumed by participants in the locality are locally produced; some of these are carrots, cauliflower, potatoes, broccoli, cucumber, lettuce, squash, pumpkin, orange, watermelon and cantaloupe mainly. Furthermore, AREase and POase-NaCl activities showed no significant differences with respect to frequencies of consumption of such foods.

The influence of different pesticide exposure factors on PON1 activity was assessed in our study: the children's place of birth and time residing in the locality, if the mother remained in the locality during her pregnancy and was exposed to pesticides at that time, the participation of other relatives living in the household with the child in agricultural activities, the proximity of farmland to the child's home and exposure to residential insecticides. A negative association was seen between AREase activity and the proximity of farmlands to home; children who live close to farmland showed less AREase activity than children who do not live close to them. On the other hand, a negative association was seen between POase-NaCl activity and the exposure to residential insecticides; children exposed to this type of insecticide during the month prior to the study showed less paraoxonase activity in comparison to those who were not exposed. We also evaluated the influence of the exposure to OP pesticides on PON1 activity; a negative association was seen between AREase activity and

concentrations of DAPs metabolites stratified by tertiles; children with higher DAPs concentrations had lower AREase activity. Some studies have reported that exposure to OP pesticides can decrease PON1 activity of adults occupationally exposed to these pesticides (Hernandez et al., 2003, 2004; Kuang et al., 2006).

The main limitation of this study is related to the use of dialkylphosphate metabolites as biomarkers to estimate exposure to OPs, since determination of these metabolites does not provide information about the identity of specific OP pesticides to which a person was exposed and also may reflect exposure to preformed DAP present in the environment or food (Lu et al. 2005; Zhang et al., 2008; Weerasekera et al., 2009); however, these metabolites may provide an integrated measure of exposure to OP pesticides (Wessels et al., 2003).

In summary, urinary dialkylphosphate metabolites were measured and the PON1 genotypes and phenotypes were characterized in this study on Mexican children residing in a farming locality. The concentrations of dialkylphosphate metabolites of the participants were higher than those reported in children of other sceneries with similar age ranges (Barr et al., 2004; Oulhote et al., 2013). We observed differences in urinary concentrations of dialkylphosphate metabolites due to father's occupation and proximity of home to farmlands. Moreover, negative associations were detected between AREase activity and concentrations of DAPs metabolites. These results suggest that children of agricultural localities may be at a high risk of exposure to OP pesticides. Efforts to reduce the exposure of these children to these compounds must be realized. On the other hand, our results offer new data to existing studies on allele and genotypic variability of the PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms and on the influence of these polymorphisms on PON1 activities on children.

Future researches should include biomarkers of exposure and of susceptibility; as well as data and other biomarkers that permit to evaluate the multiple exposure pathways to OP pesticides and that allow the characterization of the type, duration, intensity, and timing of exposure; also should include precise measurements of other variables that



can influence in the analysis of results (for example, the levels of cotinine). In this study, we focus only in PON1; however cytochromes P450, together with glutathione-S-transferases and several esterases, can also detoxify OPs. As numerous genetic variants exist for all these enzymes, such genetic differences can greatly influence the toxicity of OPs (Costa et al., 2006). Subsequent studies, in addition to PON1, should also include the polymorphism of these enzymes to evaluate differential susceptibility toward OPs.

### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that they have no competing financial interests.

### **Acknowledgments**

This study was supported by PROMEP SES-2009-UASLP-CA-45, CONACYT-Mexico (scholarship-thesis agreement No. 19922) and the IPN through COTEBAL. We thank Dr. Fernanda Martinez and MSc Damianys Almenares for their collaboration in conducting the laboratory tests. The work described in the manuscript was conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects.

### **References**

- Adkins, S., Gan, K.N., Mody, M., La Du, B.N., 1993. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 598–608.
- Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M., 2012. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*. Doi: 10.1016/j.tox.2012.09.011.
- Arcury, T. A., Grzywacz, J. G., Barr, D. B., Tapia, J., Chen, H., Quandt, S. A. (2007). Pesticide Urinary Metabolite Levels of Children in Eastern North Carolina Farmworker Households. *Environ Health Perspect*, 115, 1254–1260.
- Au, W.W., Oh, H.Y., Grady, J., Salama, S.A., Heo, M.Y., 2001. Usefulness of Genetic Susceptibility and Biomarkers for Evaluation of Environmental Health Risk. *Environ. Mol. Mutagen*, 37, 215–225.

- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosdenblat, M., 2000. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid arteriosclerotic lesions; PON1 esterase and peroxidase-like activities, *Circulation* 101, 2510–2517.
- Barr, D.B., Barr, J.R., Driskell, W.J., Hill, R.H., Ashley, D.L., Needham, L.L., et al., 1999. Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicol Ind Health*, 15(1–2), 168–179.
- Barr, D. B., Bravo, R., Weerasekera, G., Caltabiano, L. M., Whitehead, R. D., Olsson, A. O., et al., 2004. Concentrations of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides in the U.S. Population. *Environ Health Perspect*, 112, 186–200.
- Barr, D. B., Wong, L., Bravo, R., Weerasekera, G., Odetokun, M., Restrepo, P., et al., 2011. Urinary Concentrations of Dialkylphosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2004. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011(8), 3063-3098.
- Blatter-Garin, M.C., James, R.W., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Froguel, P., Ruiz, J., 1997. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J. Clin. Invest.* 99, 62– 66.
- Bradman, A., Kogut, K., Eisen, E. A., Jewell, N. P., Quirós-Alcalá, L., Castorina, R. et al., 2013. Variability of Organophosphorous Pesticide Metabolite Levels in Spot and 24-hr Urine Samples Collected from Young Children during 1 Week. *Environ Health Perspect*, 121, 118–124.
- Chen, J., Kumar, M., Chan, W., Berkowitz, G., Wetmur, J.G., 2003. Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ. Health Perspect.* 111, 1403–1409.
- Chen, J., Chan, W., Wallenstein, S., Berkowitz, G., Wetmur, J.G., 2005. Haplotype-Phenotype Relationships of Paraoxonase-1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(3), 731-734.
- CICOPLAFEST. 2004. Comisión Intersecretarial para el Control del proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo de Plaguicidas 2004. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2003. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu. Rev. Med.* 54, 371–392.
- Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 541–550.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2006. Gene-Environment Interactions: Paraoxonase (PON1) and Sensitivity to Organophosphate Toxicity. *Lab Med.* 37(2), 109-114.
- Cowan, J., Sinton, C.M., Varley, A.W., Wians, F.H., Haley, R.W., Munford, R.S., 2001. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173, 1–6.

- Curl, C.L., Fenske, R.A., Kissel, J.C., Shirai, J.H., Moate, T.F., Griffith, W., Coronado, G., Thompson, B., 2002. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. *Environ. Health Perspect.* 110, A787–792.
- Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E., 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat. Genet.* 14, 334–336.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 473–480.
- Fenske, R.A., Lu, C., Barr, D., Needham, L., 2002. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ. Health Perspect.* 110, 549–553.
- Fenske, R.A., Lu, C., Curl, C.L., Shirai, J.H., Kissel, J.C., 2005. Biologic Monitoring to Characterize Organophosphorus Pesticide Exposure among Children and Workers: An Analysis of Recent Studies in Washington State. *Environ Health Perspect.* 113, 1651-1657.
- Furlong, C.E., Holland, N., Richter, R.J., Bradman, A., Ho, A., Eskenazi, B., 2006. PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacogenet Genomics* 16(3), 183–190.
- Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase: Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab. Dispos.* 19, 100–106.
- Gonzalez, V., Huen, K., Venkat, S., Pratt, K., Xiang, P., Harley, K.G., Kogut, K., Trujillo, C.M., Bradman, A., Eskenazi, B., Holland, N.T., 2012. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *J. Expo, Sci. Environ. Epidemiol* 22 (6), 641–648.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman J.L., Tawfik D.S., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Structural Mol. Biol.* 11(5), 412-419.
- Hernández, A.F., Mackness, B., Rodrigo, L., López, O., Pla, A., Gil, F., Durrington, P.N., Pena, G., Parrón, T., Serrano, J.L., Mackness, M.I., 2003. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 565–574.
- Hernández, A.F., Gómez, M.A., Pena, G., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., Pla, A., 2004. Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *J Toxicol. Environ. Health*, 67, 1095–1108.
- Holland, N., Furlong, C., Bastaki, M., Richter, R., Bradman, A., Huen, K., Beckman, K., Eskenazi, B., 2006. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ. Health Perspect.* 114, 985–991.
- Huen, K., Harley, K., Brooks, J., Hubbard, A., Bradman, A., Eskenazi, B., Holland, N., 2009. Developmental Changes in PON1 Enzyme Activity in Young Children and Effects of PON1. Polymorphisms. *Environ. Health Perspect.* 117, 1632–1638.
- Huen, K., Harley, K., Bradman, A., Eskenazi, B., Holland, N., 2010. Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244(2), 181–189.

- Humbert, R., Adler, D.A., Disteché C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E., 1993. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet.* 3, 73–76.
- Koch, D., Lu, C., Fisker-Andersen, J., Jolley, L., Fenske, R.A., 2002. Temporal Association of Children's Pesticide Exposure and Agricultural Spraying: Report of a Longitudinal Biological Monitoring Study. *Environ Health Perspect*, 110, 829-833.
- Kuang, X.Y., Zhou, Z.J., Ma, X.X., Yao, F., Wu, Q.E., Chen, B., 2006. Activity of esterases and effect of genetic polymorphism in workers exposed to organophosphorus pesticides. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 24, 333–336.
- INEGI. 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo de Población y Vivienda. Disponible en: <http://www.inegi.gob.mx>
- Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco-Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., Gamboa, R., Gonzalez-Alzaga, B., Bassol, S., Cebrian, M.E., 2010. Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249(1), 16–24.
- Lambert, W. E., Lasarev, M., Muniz, J., Scherer, J., Rothlein, J., Santana, J., et al., 2005. Variation in Organophosphate Pesticide Metabolites in Urine of Children Living in Agricultural Communities. *Environ Health Perspect*, 113, 504–508.
- Li, W.F., Costa, L.G., Richter, R.J., Hagen, T., Shih, D.M., Tward, A., et al., 2000. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenet.* 10, 767–79.
- López-Flores, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C., Sánchez-Villegas, P., Pérez-Méndez, O.A., Gamboa-Ávila, R., 2009. Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 188, 84–90.
- Lu, C., Fenske, R. A., Simcox, N. J., Kalman, D., 2000. Pesticide exposure of children in an agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. *Environ Res*, 84, 290–302.
- Lu, C., Knutson, D. E., Fisker-Anderssen, J., Fenske, R., 2001. Biological monitoring survey of organophosphorus pesticide exposure among preschool children in the Seattle metropolitan area. *Environ Health Perspect*, 109(3), 299–303.
- Lu, C., Bravo, R., Caltabiano, L.M., Irish, R.M., Weerasekera, G., Barr, D.B., 2005. The presence of dialkylphosphates in fresh fruit juices: Implication for organophosphorus pesticide exposure and risk assessments. *J Toxicol Environ Health*, 68, 209-227.
- Mohamed Ali, S. and Chia, S.E., 2008. Interethnic Variability of Plasma Paraoxonase (PON1) Activity towards Organophosphates and PON1 Polymorphisms among Asian Populations—A Short Review. *Ind. Health* 46, 309–317.
- Moreno-Banda, G., Blanco-Muñoz, J., Lacasaña, M., Rothenberg, S.J., Aguilar-Garduño, C., Gamboa, R., Pérez-Méndez, O., 2009. Maternal exposure to floricultural work during pregnancy, PON1 Q192R polymorphisms and the risk of low birth weight. *Sci. Total Environ.* 407, 5478–5485.
- Oulhote, Y., Bouchard, M.F., 2013. Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Behavioral Problems in Canadian Children. *Environ Health Perspect*, 121, 1378–1384.
- Quandt, S., Arcury, T.A., Rao, P., Snively, B.M., Camann, D.E., Doran, A.M., Yau, A.Y., Hoppin, J.A., Jackson, D.S., 2004. Agricultural and residential pesticides in wipe

- samples from farmworker family residences in North Carolina. *Environ. Health Perspect.* 112, 382-387.
- Richter, R.J., Furlong, C.E., 1999. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9, 745-53.
- Richter, R.J., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2009. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 1–9.
- Rojas-García, E., Solís-Heredia, M.J., Piña-Guzmán, B., Vega, L., López-Carrillo, L., Quintanilla-Vega, B., 2005. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 282–289.
- Rotterdam Convention. 2008. Anex III. Disponible en: [http://www.pic.int/Portals/5/ResourceKit/A\\_General%20information/b.Overview/OVERVIEW\\_En09.pdf](http://www.pic.int/Portals/5/ResourceKit/A_General%20information/b.Overview/OVERVIEW_En09.pdf)
- Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., and Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol Mech Methods*, 21(9), 681–691.
- Sly, P.D., Flack, F., 2008. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann NY Acad. Sci.* 1140, 163–183.
- Valcke, M., Samuel, O., Bouchard, M., Dumas, P., Belleville, D., Tremblay, C., 2006. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada. *Int Arch Occup Environ Health*, 79, 568-577.
- Vida, P., Moretto, A., 2007. Pesticide exposure pathways among children of agricultural workers. *J Public Health* 15, 289–299.
- Wang, M., Lang, X., Zou, L., Huang, S., Xu, Z., 2011. Four genetic polymorphisms of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: a meta-analysis based on 88 case-control studies. *Atherosclerosis* 214, 377–385.
- Weerasekera, G., Smith, K.D., Quirós-Alcala, L., Fernandez, C., Bradman, A., Eskenazi, B., et al. 2009. A mass spectrometry-based method to measure dialkylphosphate degradation products of organophosphorous insecticides in dust and orange juice. *J Environ Monit.* 11, 1345–51.
- Weiss, B., Amier, S., Amier, R.W., 2004. Pesticides. *Pediatrics*, 113, 1030-1038.
- Wessels, D., Barr, D. B., Mendola, P., 2003. Use of Biomarkers to Indicate Exposure of Children to Organophosphate Pesticides: Implications for a Longitudinal Study of Children's. *Environ Health Perspect.* 111(16), 1939-1946.
- Zhang, X., Driver, J.H., Li, Y., Ross, J.H., Krieger, R.I., 2008. Dialkylphosphates (DAPs) in fruits and vegetables may confound biomonitoring in organophosphorus insecticide exposure and risk assessment. *J Agric Food Chem*, 56, 10638–10645.

Table 1

General characteristics of participating children (n=107)

Characteristics		
Age (years):	Mean±DE (interval)	9.7±1.9 (6-14)
	6-9.9 years, n (%)	58 (54.2)
	≥10 years, n (%)	49 (45.8)
Sex, n(%):	Girl	51 (47.7)
	Boy	56 (52.3)
Place of birth, n(%):	In the study site <sup>a</sup>	95 (88.8)
	In another state	12 (11.2)
Time living in the locality (years):	Mean±DE (interval)	9.0±2.4 (3.0-13.9)
	≤5 years, n (%)	6 (5.6)
	>5 years, n (%)	101 (94.4)
Mother remained in study site during pregnancy, n(%):	No	11 (10.3)
	Yes	96 (89.7)
Mother was exposed to pesticides during pregnancy, n(%):	No	59 (55.1)
	Yes	45 (42.1)
Exposure to insecticides at home, n(%) <sup>b</sup> :	No	61 (57.0)
	Yes	44 (41.1)
Father's occupation, n(%):	Not related to farming	48 (44.9)
	Related to farming	53 (49.5)

Table 1

Continuation

Characteristics		
Accompanies a family member to fields, n(%):	No	69 (64.5)
	Yes	37 (34.6)
Helps in farming activities, n(%):	No	91 (85.0)
	Yes	15 (14.0)
Proximity of home to farmlands, n(%):	≤15m	58 (54.2)
	>15 to 60m	24 (22.4)
	>60 to 250m	9 (8.4)
	No	16 (15.0)

DE: Standard deviation. <sup>a</sup>Study site: El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, México.

<sup>b</sup>During the month prior to the study.

Table 2

Detection and concentration of dialkylphosphate metabolites in urine samples of 107 children and adolescents

Metabolite	>LOD (%)	Mean	SD	Minimum	Percentiles					Maximum	
					<i>p</i> 5	<i>p</i> 25	<i>p</i> 50	<i>p</i> 75	<i>p</i> 95		
DMP	58.9	µg/L	2.3	5.1	<LOD	<LOD	<LOD	0.88	2.3	8.0	40
		µg/g creatinine	2.0	4.3	<LOD	<LOD	<LOD	0.69	2.3	7.0	31
DMTP	99.1	µg/L	23	14	<LOD	9.5	16	20	25	41	121
		µg/g creatinine	19	11	<LOD	5.8	13	17	24	38	72
DMDTP	43.0	µg/L	0.72	1.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.62	4.2	11
		µg/g creatinine	0.55	1.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.56	3.5	6.7
DEP	86.0	µg/L	7.5	6.4	<LOD	<LOD	4.7	6.9	9.5	16	51
		µg/g creatinine	6.3	5.1	<LOD	<LOD	3.9	5.9	8.6	13	39
DETP	70.1	µg/L	2.2	2.9	<LOD	<LOD	<LOD	1.3	2.8	10	13
		µg/g creatinine	1.8	2.3	<LOD	<LOD	<LOD	1.1	2.3	7.4	9.9
DEDTP	18.7	µg/L	0.32	0.87	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.4	4.9
		µg/g creatinine	0.32	0.93	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.6	6.0
DMPs		nmol/L	184	140	<LOD	68	120	163	195	362	1222
		nmol/g creatinine	156	106	<LOD	41	94	133	191	349	728
DEPs		nmol/L	64	54	<LOD	<LOD	36	53	81	156	347
		nmol/g creatinine	54	42	<LOD	<LOD	30	48	71	120	263



Table 2

Continuation

Metabolite	>LOD (%)	Mean	SD	Minimum	Percentiles					Maximum
					<i>p</i> 5	<i>p</i> 25	<i>p</i> 50	<i>p</i> 75	<i>p</i> 95	
DAPs nmol/L		247	159	<LOD	70	154	229	297	470	1292
nmol/g creatinine		210	124	<LOD	44	131	198	252	437	770

DMP: dimethylphosphate; DMTP: dimethylthiophosphate; DMDTP: dimethyldithiophosphate; DEP: diethylphosphate; DETP: diethylthiophosphate; DEDTP: diethyldithiophosphate. DMPs: molar sums of DMP, DMTP, and DMDTP; DEPs: molar sums of DEP, DETP, and DEDTP; DAPs: molar sums of DMPs and DEPs. LOD: less than the limit of detection. LOD ( $\mu\text{g/L}$ ) are as follows: DMP=1.36, DMTP=1.49, DMDTP=0.27, DEP=1.07, DETP=0.98, DEDTP=0.52.

Table 3

Allele and genotypic frequencies of PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> polymorphisms and enzymatic activities and dialkylphosphate metabolites concentrations by genotype

n	SNPs	Frequency (%)	AREase <sup>a</sup> (μmol/min/mL)	POase-NaCl <sup>a</sup> (nmol/min/mL)	DMPs <sup>b</sup> nmol/g creatinine	DEPs <sup>b</sup> nmol/g creatinine	DAPs <sup>b</sup> nmol/g creatinine
107			54±18	152±91	133 (<LOD-728)	48 (<LOD-263)	198 (<LOD-770)
	PON1 <sub>L55M</sub>		<i>p</i> =0.003	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> =0.909	<i>p</i> =0.150	<i>p</i> =0.392
77	LL genotype	72	58±17	181±88	132 (<LOD-728)	46 (<LOD-263)	182 (<LOD-770)
25	LM genotype	23.4	46±18	88±50	133 (52-539)	62 (<LOD-129)	211 (52-609)
5	MM genotype	4.7	40±25	27±19	106 (83-352)	38 (7.4-116)	209 (113-415)
	L allele	84					
	M allele	16					
	PON1 <sub>Q192R</sub>		<i>p</i> =0.31	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> =0.645	<i>p</i> =0.047	<i>p</i> =0.620
11	QQ genotype	10.3	47±20	51±22	139 (83-539)	70 (7.4-129)	210 (113-609)
59	QR genotype	55.1	56±18	129±60	117 (<LOD-463)	47 (<LOD-185)	172 (<LOD-495)
37	RR genotype	34.6	55±18	220±101	152 (24-728)	44 (<LOD-263)	187 (24-770)
	Q allele	38					
	R allele	62					

SNPs: Single nucleotide polymorphisms. AREase: Arilesterase activity (μmol/min/mL). POase-NaCl: Salt-stimulated paraoxonase activity (nmol/min/mL). DMPs: molar sums of dimethyl metabolites (DMP, DMTP, and DMDTP); DEPs: molar sums of diethyl metabolites (DEP, DETP, and DEDTP); DAPs: molar sums of DMPs and DEPs. <sup>a</sup> Data are expressed as arithmetic mean±SD and differences among genotypes evaluated by ANOVA (*p*<0.05). <sup>b</sup> Data are expressed as median (minimum; maximum) and differences among genotypes evaluated by Kruskal-Wallis (*p*<0.05).

Table 4

Influence of PON1<sub>L55M</sub> and PON1<sub>Q192R</sub> genotypes on AREase and POase-NaCl activities

SNPs	n	AREase			POase-NaCl		
		$\beta$ -Estimate	95% CI	<i>p</i> -value	$\beta$ -Estimate	95% CI	<i>p</i> -value
PON1 <sub>L55M</sub> genotype	107						
LL	77	Ref.			Ref.		
LM	25	-12.0	-20.0 to -4.0	0.004	-93.4	-129.3 to -57.5	<0.0001
MM	5	-18.5	-34.6 to -2.4	0.024	-153.9	-225.8 to -81.9	<0.0001
<i>r</i> <sup>2</sup>		0.109		0.003	0.279		<0.0001
PON1 <sub>Q192R</sub> genotype	107						
RR	37	Ref.			Ref.		
QQ	11	-8.2	-20.7 to 4.4	0.199	-169.3	-220.1 to - 118.4	<0.0001
QR	59	1.0	-6.7 to 8.7	0.792	-91.1	-122.3 to -59.9	<0.0001
<i>r</i> <sup>2</sup>		0.022		0.314	0.353		<0.0001

Table 4

Continuation

SNPs	n	AREase			POase-NaCl		
		$\beta$ -Estimate	95% CI	<i>p</i> -value	$\beta$ -Estimate	95% CI	<i>p</i> -value
PON1 <sub>L55M</sub> and PON1 <sub>Q192R</sub> *							
LM		-14.2	-23.2 to -5.2	0.002	-53.7	-90.1 to -17.3	0.004
MM		-20.6	-38.5 to -2.8	0.024	-95.9	-168.2 to -23.7	0.010
QR		5.7	-2.2 to 13.3	0.155	-115.3	-173.0 to -57.9	<0.0001
QQ		4.8	-9.4 to 19.0	0.504	-73.0	-104.7 to -41.2	<0.0001
<i>r</i> <sup>2</sup>		0.127		0.008	0.422		<0.0001

Simple and multiple linear regression models ( $p < 0.05$ ).  $r^2$  = Determination coefficient. CI = Confidence Interval.  
 \*Reference genotypes: LL for PON1<sub>L55M</sub> and RR for PON1<sub>Q192R</sub>. SNPs: Single nucleotide polymorphisms. AREase: Arylesterase activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ). POase-NaCl: Salt-stimulated paraoxonase activity ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ ).

Table 5

PON1 enzymatic activities and dialkylphosphate metabolites concentrations (nmol/g creatinine) according to the variables of the questionnaire

	AREase <sup>a</sup>	POase- NaCl <sup>a</sup>	DMPs <sup>b</sup>	DEPs <sup>b</sup>	DAPs <sup>b</sup>
Sex:	<i>p</i> =0.331	<i>p</i> =0.614	<i>p</i> =0.909	<i>p</i> =0.651	<i>p</i> =0.957
Boy	56±19	148±83	117 (13-728)	43 (<LOD-185)	184 (13-770)
Girl	53±18	157±100	140 (<LOD-463)	53 (<LOD-263)	206 (LOD-495)
Age groups (in accordance to WHO):	<i>p</i> =0.808	<i>p</i> =0.31	<i>p</i> =0.097	<i>p</i> =0.090	<i>p</i> =0.318
6-9.9 years	55±18	160±91	133 (32-539)	47 (<LOD-140)	182 (32-609)
≥10 years	54±19	142±93	132 (<LOD-728)	50 (<LOD-263)	211 (<LOD-770)
Recent exposure to residential pesticides <sup>c</sup> :	<i>p</i> =0.199	<i>p</i> =0.384	<i>p</i> =0.737	<i>p</i> =0.541	<i>p</i> =0.936
No	56±19	159±93	122 (13-728)	44 (<LOD-146)	179 (13-770)
Yes	52±18	142±92	139 (<LOD-423)	52 (<LOD-263)	209 (<LOD-479)
Accompanies a family member to fields:	<i>p</i> =0.217	<i>p</i> =0.351	<i>p</i> =0.115	<i>p</i> =0.750	<i>p</i> =0.162
No	56±17	158±90	131 (<LOD-728)	48 (<LOD-263)	182 (<LOD-770)
Yes	51±21	140±96	139 (70-539)	48 (<LOD-146)	219 (89-609)
Helps in farming activities:	<i>p</i> =0.711	<i>p</i> =0.862	<i>p</i> =0.150	<i>p</i> =0.284	<i>p</i> =0.214
No	54±18	153±92	131 (<LOD-728)	47 (<LOD-263)	190 (<LOD-770)
Yes	57 ± 24	148±94	134 (73-539)	52 (<LOD-129)	223 (89-609)

Table 5

Continuation

	AREase <sup>a</sup>	POase- NaCl <sup>a</sup>	DMPs <sup>b</sup>	DEPs <sup>b</sup>	DAPs <sup>b</sup>
Father's occupation:	<i>p</i> =0.762	<i>p</i> =0.139	<i>p</i> =0.024	<i>p</i> =0.0.027	<i>p</i> =0.005
Not related to farming	56±19	142±88	109 (13-539)	37 (<LOD-140)	152 (13-609)
Related to farming	54±18	169±93	154 (>LOD-728)	50 (<LOD-263)	223 (<LOD-770)
Proximity of home to farmlands:	<i>p</i> =0.070	<i>p</i> =0.487	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.140	<i>p</i> =0.001
≤15m	53±18	148±91	163 (53-728)	53 (<LOD-263)	228 (58-770)
>15 to 60m	51±21	141±101	102 (<LOD-237)	39 (<LOD-146)	144 (<LOD-357)
>60 to 250m	59±14	155±33	109 (86-186)	47 (4.4-76)	139 (92-260)
No	65±16	185±100	102 (13-298)	43 (<LOD-121)	159 (13-398)

AREase: Arilesterase activity (μmol/min/mL). POase-NaCl: Salt-stimulated paraoxonase activity (nmol/min/mL). DMPs: molar sums of dimethyl metabolites (DMP, DMTP, and DMDTP); DEPs: molar sums of diethyl metabolites (DEP, DETP, and DEDTP); DAPs: molar sums of DMPs and DEPs. <sup>a</sup> Data are expressed as arithmetic mean±SD and evaluated by *t*-test and ANOVA (*p*<0.05). <sup>b</sup> Data are expressed as median (minimum; maximum) and evaluated by Mann-Whitney *U*-test and Kruskal-Wallis test (*p*<0.05). <sup>c</sup>During the month prior to the study.

Table 6

Influence of PON1 polymorphisms, DAPs metabolites, and other exposure factors on AREase and POase-NaCl activities.

	$\beta$ -Estimate	95% CI	<i>p</i> -value
AREase			
PON1 <sub>L55M</sub> /PON1 <sub>Q192R</sub> *			
LM	-9.7	-17.6 to -1.7	0.017
MM	-19.9	-35.7 to -4.1	0.014
QQ	6.1	-7.6 to 19.8	0.376
QR	4.3	-3.4 to 12	0.267
DAPs	-4.4	-8.6 to -0.32	0.035
Proximity of farmlands to home <sup>a</sup>	-3.6	-6.8 to -0.42	0.027
Exposure to insecticides in the home <sup>b</sup>	-6.0	-12.9 to 0.92	0.088
<i>r</i> <sup>2</sup>	19.3		<0.0001
POase-NaCl			
PON1 <sub>L55M</sub> /PON1 <sub>Q192R</sub> *			
LM	-62.5	-99 to -26	0.001
MM	-101.2	-172.1 to -30.3	0.006
QQ	-112.1	-168.5 to -55.8	<0.0001
QR	-77.6	-109.1 to -46	<0.0001
DAPs	-11.6	-28.3 to -5.2	0.173
Proximity of farmlands to home <sup>a</sup>	-12.6	-25.9 to .72	0.064
Exposure to insecticides in the home <sup>b</sup>	-38.8	-67.1 to -10.6	0.008
<i>r</i> <sup>2</sup>	0.494		<0.0001

Multiple linear regression models ( $p < 0.05$ ).  $r^2$  = Determination coefficient. CI = Confidence Interval. \*Reference genotypes: LL for PON1<sub>L55M</sub> and RR for PON1<sub>Q192R</sub>. AREase: Arilesterase activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ). POase-NaCl: Salt-stimulated paraoxonase activity ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ ). DAPs: total dialkylphosphate metabolites stratified by tertiles: T1 (<179), T2 (>179 a 258) and T3 (>258). <sup>a</sup>No farmland, farmland at a distance of >60 to 250m, >15 to 60m, and  $\leq 15\text{m}$ . <sup>b</sup>During the month prior to the study. The models were adjusted by creatinine variable.

## **Capítulo IV. Exposición a plaguicidas organofosforados y alteraciones cognitivas en niños y adolescentes mexicanos de una localidad agrícola**

**Resumen.** Los organofosforados (OPs) son los plaguicidas más comúnmente usados en México. Estos compuestos son neurotóxicos, que han sido asociados con déficits neuroconductuales; sin embargo, pocos estudios han evaluado la correlación entre la exposición a OPs y el desempeño cognitivo en niños. El objetivo de este estudio fue examinar la relación entre la exposición a OPs y las alteraciones cognitivas en niños de una localidad agrícola de México. Se colectaron muestras de orina y sangre de 105 niños (6-14 años de edad) durante un periodo de alta aplicación de plaguicidas y se midieron los niveles urinarios de los metabolitos dialquilfosfatos (DAP) para evaluar la exposición a OPs, y las concentraciones de plomo en sangre, como factor confusor. Las madres de los niños fueron entrevistadas sobre aspectos de estilo de vida y otras variables de interés. El desempeño cognitivo de los niños fue evaluado por Neuropsicólogos, usando la prueba WISC-R. La exposición a OPs estuvo asociada con un pobre desempeño cognitivo. Los niños del quintil con las mayores concentraciones de dialquilfosfatos presentaron un déficit de 12 puntos en el Coeficiente Intelectual, en comparación con los niños del quintil con las menores concentraciones de éstos. Los resultados sugieren que los niños de localidades agrícolas, expuestos a OPs, podrían estar en mayor riesgo de presentar alteraciones cognitivas.

*Keywords:* niños mexicanos, alteraciones cognitivas, plaguicidas organofosforados, localidad agrícola.



## **Exposición a plaguicidas organofosforados y alteraciones cognitivas en niños y adolescentes mexicanos de una localidad agrícola**

Rocío Ramírez-Jiménez <sup>a,e</sup>, Jaqueline Calderón-Hernández <sup>b</sup>, Regina Montero-Montoya <sup>c</sup>, Yaneth Rodríguez-Agudelo <sup>d</sup>, and Leticia Yáñez-Estrada <sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, México*

<sup>b</sup> *Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

<sup>c</sup> *Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México*

<sup>d</sup> *Departamento de Neuropsicología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México*

<sup>e</sup> *Laboratorio de Género, Salud y Ambiente, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

\*Autor para la correspondencia:

Facultad de Medicina,

Universidad Autónoma de San Luis Potosí,

Avenida Venustiano Carranza 2405,

San Luis Potosí, S.L.P., 78210, México

Tel.: 52 4448262347 ext. 6643; fax: 52 4448262351

*Correo electrónico:* lyanez58@hotmail.com, lyanez@uaslp.mx (L. Yáñez-Estrada)

## ABSTRACT

Organophosphates (OPs) are the most commonly used pesticides in Mexico. These compounds are neurotoxicants that have been associated with neurobehavioral deficits; however, few studies have assessed the association between the exposure to OPs and cognitive performance in children and adolescents. The objective of this study was to examine the relationship between the exposure to OPs and the cognitive alterations in children and adolescents living in a Mexican agricultural locality. Urine and blood samples of 105 children (6-14 years old) were collected during a period of high pesticide spraying. We measured the urinary dialkylphosphate metabolites and the lead concentrations in the blood samples. Furthermore, questionnaires about sociodemographic aspects and other variables of interest were applied to the mothers of children. Moreover, trained personnel evaluated the cognitive performance of children using the WISC-R intelligence test. The exposure to OPs, as measured by dialkylphosphate metabolites was associated with poorer cognitive performance. Children in the highest quintile of DAPs concentrations presented a deficit of 12 IQ points compared with those in the lowest quintile. Similarly, to our results, few studies have reported some significant associations between urinary dialkylphosphate metabolites and the cognitive performance in children older than 6 years old. Our results suggest that children and adolescents of agricultural localities exposed to OPs may be at increased risk of presenting cognitive alterations.

*Keywords:* Mexican children; cognitive alterations; organophosphate pesticides; agricultural locality.

**Resumen.** Los organofosforados (OPs) son los plaguicidas más comúnmente usados en México. Estos compuestos son neurotóxicos, que han sido asociados con déficits neuroconductuales; sin embargo, pocos estudios han evaluado la correlación entre la exposición a OPs y el desempeño cognitivo en niños. El objetivo de este estudio fue examinar la relación entre la exposición a OPs y las alteraciones cognitivas en niños de una localidad agrícola de México. Se colectaron muestras de orina y sangre de 105 niños (6-14 años de edad) durante un periodo de alta aplicación de plaguicidas y se midieron los niveles urinarios de los metabolitos dialquilfosfatos (DAP) para evaluar la exposición a OPs, y las concentraciones de plomo en sangre, como factor confusor. Las madres de los niños fueron entrevistadas sobre aspectos de estilo de vida y otras variables de interés. El desempeño cognitivo de los niños fue evaluado por Neuropsicólogos, usando la prueba WISC-R. La exposición a OPs estuvo asociada con un pobre desempeño cognitivo. Los niños del quintil con las mayores concentraciones de dialquilfosfatos presentaron un déficit de 12 puntos en el Coeficiente Intelectual, en comparación con los niños del quintil con las menores concentraciones de éstos. Los resultados sugieren que los niños de localidades agrícolas, expuestos a OPs, podrían estar en mayor riesgo de presentar alteraciones cognitivas.

*Keywords:* niños mexicanos, alteraciones cognitivas, plaguicidas organofosforados, localidad agrícola.

## Introducción

En la actualidad, los organofosforados (OPs) se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en México, principalmente en actividades agrícolas, no obstante su probado efecto neurotóxico (Quintanilla-Vega y cols., 2010; Sánchez-Guerra y cols., 2011; Androutsopoulos y cols., 2012).

Varios investigadores han utilizado la medición de los metabolitos urinarios dialquilfosfato para estimar la exposición a plaguicidas OP en niños y adolescentes (Lambert y cols., 2005; Valcke y cols., 2006; Arcury y cols., 2007), la vía de exposición para aquellos que viven localidades agrícolas es a través de la inhalación de aire contaminado tanto en ambientes interiores como exteriores, la ingestión de alimentos y agua contaminados y el contacto dérmico con materiales y superficies contaminadas, entre otras (Vida y Moretto, 2007). Diferentes estudios epidemiológicos han reportado que las concentraciones urinarias de metabolitos dialquilfosfato son superiores en niños que viven en zonas agrícolas, en comparación con aquellos que son residentes de áreas urbanas (Koch y cols., 2002; Barr y cols., 2004; Lambert y cols., 2005; Valcke y cols., 2006; Arcury y cols., 2007; Oulhote y cols., 2013).

Diferentes estudios experimentales han reportado vínculos entre la exposición a OPs y efectos neurológicos. Sugiriendo que estos plaguicidas pueden interferir con el desarrollo del cerebro, conduciendo a daños permanentes que podrían surgir en la adolescencia y adultez, si la exposición ocurre durante una etapa sensible del desarrollo aun en bajos niveles de exposición (Qiao y cols., 2003; Slotkin, 2004; Slotkin y Seidler, 2005; Slotkin y cols., 2008).

La mayoría de los estudios que han evaluado los efectos neurotóxicos de los OPs en poblaciones humanas, se han enfocado principalmente en los efectos agudos en escenarios ocupacionales; sin embargo, los efectos crónicos por la exposición a concentraciones bajas han sido poco investigados (Kamel y cols. 2003, 2007).

Los niños son particularmente vulnerables a los efectos tóxicos por la exposición a contaminantes, debido a diversos factores fisiológicos, entre los cuales están sus mecanismos inmaduros de detoxificación (Weiss y cols., 2004; Sly and Flack, 2008). Algunos estudios realizados en niños han reportado asociaciones entre la exposición a plaguicidas OP y efectos neurológicos (Guillette y cols., 1998; Ruckart y cols., 2004; Rohlman y cols., 2005; Young y cols., 2005; Grandjean y cols., 2006; Rauh y cols., 2006; Engel y cols., 2007; Eskenazi y cols., 2007), entre los cuales se destacan déficits incluyendo abstracción verbal, atención, memoria, procesamiento de información, velocidad motora, coordinación, problemas de atención, alteraciones en la memoria a corto plazo y destrezas motoras y comportamiento. Así como, mayores retrasos en el desarrollo psicomotor y mental y problemas de atención, tiempos de reacción más largos, reflejos neonatales anormales y déficit de atención/desorden hiperactividad (ADHD por sus siglas en inglés).

En México, son escasos los estudios que han evaluado la exposición a plaguicidas OP y sus efectos adversos sobre el desempeño neuroconductual en niños (Gamlin y cols., 2006; Quintanilla-Vega y cols., 2010; Sánchez-Guerra y cols., 2011). No obstante que la población de niños alcanza 32.5 millones (29% de la población total), de los cuales el 26.6% vive en localidades rurales (INEGI, 2010).

En el presente estudio, se estimó la asociación entre la exposición a plaguicidas organofosforados, evaluada como las concentraciones de metabolitos dialquilfosfato en orina y el desempeño cognitivo en niños mexicanos de una localidad agrícola.

## **Materiales y métodos**

### *Área y población de estudio*

La localidad de El Refugio está localizada en el municipio de Ciudad Fernández, en una de las zonas agrícolas más importantes del estado de San Luis Potosí, México (Figura 1), por lo que diferentes tipos de plaguicidas son aplicados en la región

(organofosforados, piretroides, carbamatos y organoclorados, entre otros). Entre los plaguicidas OP más usados se encuentran: clorpirifos etílico, diazinón, malatión, metamidofos, paratión metílico, dimetoato, acefato, etión y monocrotofos, entre otros (comunicación personal, 2011).

Para la selección de los niños participantes, se llevó a cabo una reunión con los padres de familia de dos escuelas Primarias de la localidad y cuyas Autoridades aceptaron participar en el mismo. Durante esta reunión, se explicaron los objetivos, métodos y duración del proyecto, indicándose que el estudio era de participación voluntaria, sin costo y que podían retirarse cuando así lo determinaran. Aquellos padres que aceptaron participar, firmaron la carta de consentimiento informado. La población de estudio quedó conformada por una muestra de 105 niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad, clínicamente saludables (reportado por la madre) y con un tiempo de residencia en la localidad de al menos 5 años. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El presente es un estudio transversal realizado durante un período de alta aplicación de plaguicidas (mayo-agosto).

#### *Colecta de muestras biológicas*

La colecta de las muestras de sangre fue realizada por personal especializado, empleando material nuevo y estéril. Se colectaron en ayunas, 4 mL de sangre por punción venosa en un tubo BD Vacutainer® con EDTA para la determinación de plomo (como factor confusor de daño neurológico) y de la biometría hemática.

Para analizar los metabolitos urinarios dialquilfosfato, de cada niño se colectó la primera orina de la mañana, en recipientes de plástico nuevos y estériles durante cinco días seguidos. Una vez que se tuvieron todas las muestras, éstas fueron mezcladas

en volúmenes iguales para obtener una muestra compuesta, la cual fue almacenada a -70°C hasta su análisis.

#### *Determinación de plomo en sangre*

La determinación de plomo en sangre se realizó de acuerdo al método descrito por Subramanian (1987). 100 µL de sangre, se mezclaron con 400 µL de una disolución de tritón modificador (Tritón-X 100 al 0.5%, fosfato de amonio al 0.5% y ácido nítrico al 0.2%), previo a su análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin-Elmer modelo 3110, equipado con un Horno de Grafito). Como control de calidad se empleó un estándar de sangre (CDC 04PB39) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés). El porcentaje de variación de éste, siempre estuvo dentro de los límites establecidos (7.9%, n = 5).

#### *Análisis de metabolitos dialquilfosfato en orina*

La exposición a plaguicidas organofosforados fue evaluada mediante la medición de los seis principales metabolitos urinarios dialquilfosfato: dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP), y dietilditiofosfato (DEDTP). La determinación de éstos se realizó de acuerdo al método descrito por Ramírez y cols., (manuscrito en preparación). A alícuotas de 200 µL de orina se les adicionó el EI (DETP-d10) en una concentración igual a 12.5 µg/L; y fueron mantenidas en refrigeración a 4°C y protegidas de la luz durante 24 h. Dada la naturaleza polar de estos compuestos, se sometieron a una reacción de derivatización para obtener los ésteres respectivos, para lo cual a las muestras de orina se les adicionaron 200 mg de carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) mas 10 µL de bromuro de pentafluobencilo (PFBBr) y se inclubaron a 70°C durante 2 h. Los ésteres pentafluorobencil fosfato fueron extraídos con 7 mL de una mezcla de cloruro de metileno/hexano y concentrados a un volumen final de 50 µL, bajo una corriente de nitrógeno a 30°C. El análisis de las muestras se realizó en un Cromatógrafo de Gases (Agilent 6850) acoplado a un Espectrómetro de Masas

(Agilent 5973N) equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico y operado en el modo de monitoreo de ión selectivo.

Se determinó la concentración de creatinina en las muestras de orina, de acuerdo al método colorimétrico basado en la reacción Jaffe (Creatinina Procedimiento No. 555, Sigma Diagnostics, St Louis, Mo).

Las concentraciones urinarias de los seis metabolitos diaquilfosfato en  $\mu\text{g/L}$  fueron convertidas a  $\text{nmol/L}$ ; y posteriormente, se obtuvieron las sumatorias: DMPs (metabolitos dimetil- DMP, DMTP y DMDTP), DEPs (metabolitos dietil- DEP, DETP y DEDTP) y DAPs (suma de DMPs y DEPs).

#### *Medidas antropométricas y recopilación de datos*

Se determinaron los datos antropométricos (peso, talla y edad) de los niños y adolescentes participantes en el estudio. Para el registro del peso, se empleó una báscula electrónica, mientras que para la talla un estadiómetro (ambos sin zapatos). Mediante el uso del software AnthroPlus v1.0.4., se calculó el Índice de Masa Corporal ( $\text{Kg/m}^2$ ) y los puntajes z-score de la Estatura para la Edad y del Índice de Masa corporal para la edad (de Onis y cols., 2007). La prevalencia de bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad fue determinada usando los valores de corte del IMC por edad y sexo, del Grupo de Trabajo sobre Obesidad (IOTF por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud (Cole y cols., 2000, 2007).

Mediante una entrevista a la madre de familia, se recabó información relacionada con las características sociodemográficas generales, ocupación, consumo de alcohol y tabaco de los padres y exposición a plaguicidas. Así como también estilo de vida y usos y costumbres de los niños y adolescentes.



### *Evaluación neuropsicológica*

Se les aplicó a los niños y adolescentes participantes en el estudio, la Escala de Inteligencia de Wechsler para niños de 6 a 16 años de edad (WISC-R por sus siglas en inglés) adaptada para población Mexicana, ésta consiste de una batería de pruebas para evaluar las habilidades cognitivas y calcula las puntuaciones de cuatro subescalas o índices con base a diferentes subpruebas: Índice de Comprensión Verbal (integrado por las subpruebas de Vocabulario y Semejanzas), Índice de Razonamiento Perceptual (integrado por los subpruebas de Diseño con Cubos y Matrices de Razonamiento), Índice de Memoria de Trabajo (integrado por las subpruebas de Retención de Dígitos y de Secuenciación de Letras y Números) e Índice de Velocidad de Procesamiento (integrado por las subpruebas de Claves y Búsqueda de Símbolos). Con las puntuaciones obtenidas en todas las subescalas, se estima el Coeficiente Intelectual Total (CI Total).

Las pruebas fueron aplicadas en una sesión de aproximadamente 45 min, por un grupo de neuropsicólogos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS).

Debido a que la función intelectual de la madre es un factor determinante conocido en el desempeño del niño (Mink y cols., 2004), ésta fue evaluada mediante la Prueba de Matrices Progresivas de Raven (Raven, 1960), la cual mide la inteligencia, la capacidad intelectual y la habilidad mental general mediante la comparación de formas y el razonamiento por analogías.

### *Análisis estadístico*

Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) se evaluó la normalidad de las variables continuas, tales como el IMC para la edad, nivel de plomo en sangre, concentraciones urinarias de los metabolitos dialquifosfato (DAPs, DMPs y DEPs), nivel de creatinina urinaria, nivel de hemoglobina y puntuaciones de las subescalas

cognitivas y CI Total, entre otras; y se calcularon los parámetros descriptivos de dichas variables (media, desviación estándar, mínimo y máximo y percentiles).

Los índices de Comprensión verbal, Razonamiento perceptual, Memoria de Trabajo y Velocidad de Procesamiento; así como el CI Total fueron considerados como variables dependientes; mientras que las concentraciones de los metabolitos DMPs, DEPs y DAPs como variables independientes. Como covariables se incluyeron: edad, sexo, plomo en sangre, z-scores del IMC para la edad y nivel de hemoglobina de los niños y adolescentes; así como la edad, escolaridad, función intelectual (medido por la prueba de Matrices Progresivas de Raven) y estado civil de la madre; otras covariables fueron: ingreso familiar, tiempo de residencia en la localidad, exposición a plaguicidas durante el embarazo, ocupación de los padres, exposición residencial a plaguicidas y proximidad de la vivienda a los campos agrícolas. Las variables IMC para la edad (z-score) y el nivel de hemoglobina se utilizaron como medidas del estado nutricional de los participantes.

Las relaciones entre variables continuas se evaluaron mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson o de Spearman, según fuera el caso. Las puntuaciones de las subescalas cognitivas y CI Total, de acuerdo a las concentraciones de los metabolitos DMPs, DEPs y DAPs (categorizadas por quintiles) y otras variables categóricas (sexo, ocupación del padre, exposición residencial a plaguicidas y proximidad de campos de cultivo al hogar, entre otras) fueron evaluadas mediante las pruebas de *t*-student, U-Mann-Whitney, ANOVA o Kruskal-Wallis.

Se emplearon modelos de regresión lineal simple y múltiple (MRLM) para evaluar la influencia de las concentraciones de los metabolitos DMPs, DEPs y DAPs sobre las puntuaciones de las pruebas neuropsicológicas. En primera instancia, se utilizaron modelos de regresión lineal simple para explorar la influencia de cada covariable sobre las puntuaciones cognitivas. Las variables con *p* igual o menor a 0.20 en el análisis bivariado fueron incluidas en el MRLM. Los modelos fueron ajustados por las variables: función intelectual de la madre, ingreso familiar (estratificada en cuatro categorías), la

concentración de plomo en sangre, los z-scores de IMC para la edad y el nivel de hemoglobina.

El análisis estadístico se realizó con el Paquete Estadístico para la Ciencias Sociales (SPSS por sus siglas en inglés), versión 18 para Windows™ (SPSS Inc. Chicago, IL), considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

Las características de la población de estudio son mostradas en las Tablas 1 y 2. La edad promedio de los niños y adolescentes fue de  $9.7 \pm 1.9$  años con un intervalo de 6 a 14 años. El porcentaje de niñas fue del 50.9% y el 85.5% nació en la zona de estudio. El IMC osciló de 12.4 a  $32.5 \text{ kg/m}^2$  con una mediana de  $16.6 \text{ kg/m}^2$ .

De acuerdo a los valores de corte del IMC por edad y sexo, del Grupo de Trabajo sobre Obesidad (IOTF por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud (Cole y cols., 2000, 2007), la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue del 21% y 6.7%, respectivamente. Por otro lado, utilizando los valores de referencia de la OMS, los niños con z-scores del IMC para la edad, mayor a +2 se clasificaron como obesos y la prevalencia fue del 10.5%; mientras que los niños con z-scores menores a -2 fue del 6.7% (OMS, 2006).

La mayoría de las familias de los niños participantes en el presente estudio, tuvieron un ingreso mensual mayor a \$2000 (63.8%). La escolaridad de la madre fue de  $9.3 \pm 3.2$  años, y el 39% estuvo expuesta a plaguicidas durante el embarazo. Aproximadamente el 51.4% de los participantes tenían familiares que trabajaban en actividades relacionadas con la agricultura y el 54.3% reportó la existencia de campos agrícolas a  $\leq 15$  m de su vivienda. El 34.3% y el 13.3% de los niños, acompaña a familiares a campos agrícolas o ayuda en actividades agrícolas, respectivamente. Además, el 42.9% de los niños estuvieron expuestos a insecticidas en el hogar durante el mes previo a este estudio (información recabada del cuestionario).

Los participantes presentaron valores normales de hemoglobina, salvo una niña cuya concentración fue menor al valor de referencia (12-18 g/dL). Con respecto a los metabolitos urinarios dialquifosfato, el valor de la mediana (intervalo) de las sumatorias DMPs, DEPs y DAPs fueron 161 (<LDM a 1222), 56 (<LDM a 347) y 231 (<LDM a 1292) nmol/L. Por otro lado, el promedio de las concentraciones de plomo en sangre fue de  $4.8 \pm 2.1$  (1.2 a 10.3  $\mu\text{g/dL}$ ) y de creatinina en orina fue de  $1.3 \pm 0.41$  g/L.

En relación a los resultados de las pruebas neuropsicológicas, la media del CI Total (89.6) de los niños y adolescentes estuvo por debajo de los niveles esperados (90-110) (Wechsler, 1983); y las puntuaciones promedio de los Índices de Comprensión Verbal, Razonamiento Perceptual, Memoria de Trabajo y Velocidad de Procesamiento fueron: 89.6, 94.5, 88.2 y 94.9, respectivamente. El 53.3% de los participantes presentaron un CI total menor al punto de corte de referencia (<90), de los cuales el 36.2% presentó un puntaje entre 80 y 89 (CI medio bajo), el 15.2% entre 70 y 79 (CI en el límite inferior) y el 1.9% fueron intelectualmente deficiente ( $\text{CI} \leq 69$ ). Solo un 2.8% de los participantes presentaron un CI medio-alto (110 a 119) y el 45.7% obtuvo un puntaje de 90 a 109 (CI medio).

Las concentraciones urinarias de los metabolitos DMPs, DEPs y DAPs expresados en nmol/L, mostraron correlaciones negativas significativas ( $r = -0.204$  a  $-0.345$ ,  $p < 0.05$ , Spearman) con los índices de Comprensión verbal, Razonamiento perceptual, Memoria de Trabajo y Velocidad de Procesamiento y con el CI Total.

Otras variables que estuvieron correlacionadas con los índices cognitivos fueron: la edad del niño ( $r = 0.302$ ,  $p < 0.05$ , Pearson) y el tiempo de residencia en la localidad ( $r = -0.238$ ,  $p < 0.05$ , Pearson) con el Índice de Velocidad de Procesamiento; la escolaridad de la madre correlacionó con el Índice de Razonamiento Perceptual ( $r = 0.201$ ,  $p < 0.05$ , Pearson); mientras que hubo una asociación entre la función intelectual de la madre (evaluada mediante la Prueba de Matrices Progresivas de Raven) con los cuatro índices cognitivos ( $r = 0.264$  a  $0.293$ ,  $p < 0.05$ , Pearson), excepto con el Índice de Velocidad de Procesamiento.

Los niños y adolescentes que acompañan a sus familiares a los campos agrícolas, presentaron puntuaciones menores en el Índice Velocidad de Procesamiento, que aquellos que no van a los campos de cultivo (91.1 y 96.9, respectivamente;  $p=0.025$ ,  $t$ -test). Los niños cuyas madres permanecieron en el sitio de estudio durante el embarazo presentaron menores puntuaciones (93.9) que aquellos cuyas madres residían fuera de la localidad (104.4) ( $p=0.037$ ,  $t$ -test).

Por otro lado, las puntuaciones de los Índices de Comprensión Verbal y Memoria de Trabajo y el CI Total, fueron menores en los participantes cuya escuela esta ubicada cerca de los campos agrícolas, con respecto a aquellos que asistían a una escuela ubicada en el centro de la localidad y por ende alejada de las parcelas (86.9 vs 92.7,  $p=0.014$   $t$ -test; 86 vs 91,  $p=0.025$  U-Mann-Whitney test; y 87.5 vs 92.2,  $p=0.030$   $t$ -test; respectivamente).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los índices cognitivos y en el CI Total, de acuerdo a las variables: sexo, ocupación del padre, exposición a insecticidas en el hogar y proximidad de campos agrícolas al hogar.

En la Tabla 3, se presentan las puntuaciones de los índices cognitivos y del CI Total, de acuerdo a las concentraciones de los metabolitos DMP, DEPs y DAPs categorizadas por quintiles. En los índices de Comprensión verbal y Razonamiento Perceptual y en el CI Total, los niños y adolescentes con concentraciones DAPs en el primer quintil ( $\leq 150.9$  nmol/L) tuvieron puntuaciones estadísticamente superiores, que los niños de los quintiles 2 a 5 (151 a  $\leq 200.8$ , 200.9 a  $\leq 252.7$ , 252.8 a  $\leq 312.1$  y  $> 312.1$  nmol/L, respectivamente) (ANOVA,  $p < 0.05$ ; Bonferroni,  $p < 0.05$ ); mientras que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre quintiles y las puntuaciones de los índices de Memoria de Trabajo y Velocidad de Procesamiento. Por otro lado, las puntuaciones de las subescalas cognitivas y del CI Total, de acuerdo a las concentraciones de los DAPs ajustadas por creatinina y categorizadas en quintiles, siguieron una tendencia similar a los DAPs sin ajustar, excepto en la subescala Memoria de Trabajo (datos no mostrados). Los resultados de las pruebas

neuropsicológicas, con respecto a las concentraciones (ajustadas y sin ajustar por creatinina) de los metabolitos DMPs y DEPs categorizadas en quintiles, siguieron tendencias similares que con las concentraciones de la sumatoria DAPs.

En la Tabla 4, se muestran los MRLMs de la influencia de las concentraciones (categorizadas por quintiles) de los metabolitos urinarios DMPs, DEPs y DAPs sobre cada uno de las subescalas cognitivas y sobre la escala del CI Total. Los MRLMs fueron ajustados por la función intelectual de la madre, el ingreso familiar, la concentración de plomo en sangre, los z-scores del IMC para la edad, el nivel de hemoglobina y el nivel de creatinina urinaria.

Las concentraciones urinarias de los metabolitos DAPs, presentaron asociaciones inversas estadísticamente significativas con las puntuaciones de las subescalas de Comprensión Verbal [ $\beta = -2.6$ ; 95% IC: -4.2 a -1.1], Razonamiento Perceptual [ $\beta = -2.5$ ; 95% IC: -4.0 a -1.0] y Memoria de Trabajo [ $\beta = -2.7$ ; 95% IC: -4.1 a -1.2]. Así como con el Coeficiente Intelectual ( $\beta = -2.9$ ; 95% IC: -4.3 a -1.5). La asociación inversa entre la subescala de Velocidad de Procesamiento y la concentración DMPs, DEPs y DAPs no fueron estadísticamente significativas. Esta tendencia también se observó, con las concentraciones de los metabolitos DMPs y DEPs (Tabla 4).

En la Figura 2, se muestran gráficamente las diferencias en las puntuaciones de las subescalas y el CI Total, en función de los quintiles de las concentraciones de los metabolitos DAPs (nmol/L). Los niños y adolescentes del quintil Q5 de las concentraciones DAPs en comparación con los del quintil Q1, presentaron disminuciones de 13, 11, 3, 4 y 12 puntos en las subescalas de Comprensión Verbal, Razonamiento Perceptual, Memoria de Trabajo y Velocidad de Procesamiento y en el CI Total, respectivamente.

## Discusión

Los niños residentes de localidades agrícolas tienen un mayor riesgo de exposición a los plaguicidas, por una diversidad de rutas, por ejemplo la proximidad de campos agrícolas a las viviendas (Vida y Moretto, 2007), la ingesta de alimentos y agua contaminados con estos agroquímicos y el uso de insecticidas en el hogar (Eskenazi y cols., 1999). Así como también, si el padre es jornalero abre la posibilidad de que acarreen residuos de plaguicidas sobre su cuerpo, ropa y/o zapatos al hogar.

En México, los organofosforados son un grupo de plaguicidas ampliamente utilizado en la agricultura y en el control de plagas urbanas; sin embargo, no hay datos oficiales sobre el tipo y la cantidad que se emplea (Quintanilla-Vega y cols., 2010; Sánchez-Guerra y cols., 2011). No obstante que algunos de éstos como el paratión metílico, el metamidofos y el clorpirifos han sido prohibidos o severamente restringidos en algunos países, su empleo en México tanto en localidades rurales como urbanas, es extensivo (Sánchez-Guerra y cols., 2011).

En este estudio se evaluó la exposición a plaguicidas OP, mediante la medición de los seis principales metabolitos urinarios dialquilfosfato, en 105 niños y adolescentes de 6 a 14 años de edad, residentes de una localidad agrícola mexicana. Además, se examinó la influencia de las concentraciones urinarias de estos metabolitos y de variables sociodemográficas y de estilo de vida (índice de masa corporal, ingreso familiar, tiempo de residencia en la localidad, cercanía de campos agrícolas al hogar, exposición residencial a plaguicidas, entre otras) sobre el desempeño cognitivo de los niños y adolescentes.

En la población de estudio, la concentración expresada como la mediana, de los metabolitos totales DMPs, DEPs y DAPs, cuantificados durante un período de alta aplicación de plaguicidas en la localidad, fueron 161.2, 56.3 y 231.4 nmol/L, respectivamente.

De acuerdo con lo indicado por pobladores de la región de estudio, los organofosforados metilados (malatión, dimetoato, azinfos metílico y paratión metílico) fueron usados más frecuentemente que los organofosforados etilados (clorpirifos, diazinón y etión). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos ya que los metabolitos DMPs estuvieron presentes en 99% de las muestras de orina de los participantes, y en concentraciones significativamente más altas que los metabolitos DEPs. En general, las concentraciones urinarias de los metabolitos DMPs, DEPs y DAPs obtenidas en este estudio fueron de 2 a 3 veces mayores que aquellas reportadas por otros estudios (Bouchard y cols., 2010; Muñoz y cols., 2011; Oulhote y Bouchard, 2013). El dimetiltiofosfato (DMTP) fue el metabolito más frecuentemente detectado en las muestras de orina (99%), con las concentraciones más altas (mediana: 20.1 µg/L); mientras que el metabolito dietilditiofosfato (DEDTP) fue detectado solamente en el 20% de los niños y adolescentes participantes (datos no mostrados).

Los niños en comparación con los adultos, se encuentran en mayor riesgo frente a la toxicidad de los plaguicidas, debido a sus patrones de actividad y comportamiento, alimentación y características fisiológicas asociadas con el desarrollo (Weiss y cols., 2004; Sly y Flack, 2008).

El interés sobre la neurotoxicidad producida por la exposición a plaguicidas OP ha aumentado, debido a las observaciones epidemiológicas recientes de que los niños expuestos prenatalmente o durante la vida postnatal temprana, presentan diversos déficits neurológicos (Eskenazi y cols., 2004, 2007, 2011; Young y cols., 2005; Rauh y cols., 2006; Engel y cols., 2007; Handal y cols., 2007; Marks y cols., 2010; Bouchard y cols., 2011; Quiros-Alcala y cols., 2011; Yolton y cols., 2013). Sin embargo, pocos estudios han evaluado el neurodesarrollo de los niños en etapas posteriores (niñez y adolescencia) con respecto a la exposición a plaguicidas OP (Guillette y cols., 1998; Ruckart y cols., 2004; Rohlman y cols., 2005; Grandjean y cols., 2006; Engel y cols., 2011; Bouchard y cols., 2011).



Los resultados del presente estudio sugieren que la exposición a plaguicidas OP, estimada por las concentraciones de los metabolitos urinarios DAPs (durante el periodo de alta aplicación de plaguicidas), está asociada con una disminución en el desempeño cognitivo de los niños y los adolescentes de 6 a 14 años de edad, residentes de una localidad agrícola mexicana. Las concentraciones de metabolitos DAPs estuvieron inversamente relacionadas con las puntuaciones del CI y de las subescalas cognitivas, excepto con las de Velocidad de Procesamiento. Los niños en el quintil Q5 de las concentraciones urinarias de la sumatoria DAPs, presentaron déficits de 12 puntos en el CI comparados con los niños en el quintil más bajo (Q1).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Engel y cols., (2011) quienes evaluaron la exposición prenatal a OPs a través de la medición de los metabolitos dialquilfosfato en la orina de la madre y examinaron la relación de las concentraciones de éstos, con el desempeño cognitivo de sus hijos de 6 a 9 años de edad. La mediana de la concentración de los metabolitos urinarios DMPs, DEPs y DAPs de la madre fueron 47.8, 24.7 y 82.0 nmol/L, respectivamente, estos valores son 2 a 3 veces menores que los encontrados en el presente estudio (161, 56 y 231 nmol/L). Por otra parte, Muñoz y cols., (2011) reportaron una asociación inversa entre la Velocidad de Procesamiento y las concentraciones del metabolito DMTP en niños chilenos de 6 a 11 años de edad; las concentraciones de DMTP oscilaron de 2.5 a 51.4 µg/L, mientras que en el presente estudio fueron de <LD a 121.4 µg/L.

En contraste con nuestro estudio, otros investigadores no encontraron asociaciones significativas entre el desempeño cognitivo y la exposición a plaguicidas OP en niños mayores de seis años de edad. Grandjean y cols., (2006) evaluaron la exposición en niños de una localidad florícola peruana, sin encontrar asociación entre la exposición actual (0.417 y 0.426 nmol/kg por día de DMPs DEPs, respectivamente) a plaguicidas OP y la subprueba “Dígitos en Progresión y Regresión”, la cual es empleada para medir la Memoria de Trabajo; sin embargo, el incremento en las concentraciones de DMPs y DEPs estuvo asociado con un aumento en el tiempo de reacción. Sanchez y cols., (2008), no observaron correlaciones significativas entre el desempeño cognitivo

evaluado por la prueba WISC y las concentraciones urinarias de metabolitos dialquifosfato, en 48 niños de 7 años de edad de una localidad agrícola del sur de Arizona, de los cuales 25 presentaron niveles detectables de metabolitos dialquifosfato (media: 110 µg/L); sin embargo, las concentraciones más altas de DAPs correlacionaron significativamente con un desempeño más pobre en algunas de las subpruebas de la prueba “Wisconsin Card Sorting” (WCST por sus siglas en inglés). Las concentraciones de DAPs en el presente estudio (media: 36 µg/L) fueron menores a las reportadas por Sanchez y cols., (2008).

Por otro lado, Bouchard y cols., (2011) quienes midieron los metabolitos urinarios dialquifosfato en mujeres embarazadas y en sus niños a los 6 meses y 1, 2, 3.5 y 5 años de edad y evaluaron el desempeño cognitivo de los niños a los 7 años de edad mediante WISC; encontraron que solamente las concentraciones prenatales, estuvieron asociadas significativamente con puntuaciones menores en los índices de Memoria de Trabajo, Velocidad de Procesamiento, Comprensión Verbal, Razonamiento Perceptual y CI Total; en este último los niños del quintil con las concentraciones mayores de DAPs tuvieron un déficit promedio de 7.0 puntos comparados con los del quintil más bajo. Bouchard y cols., (2011) categorizaron las concentraciones prenatales de DAPs (nmol/L) de acuerdo con los intervalos (mediana) siguientes: Q1, 0–55 (39); Q2, >55–93 (75); Q3, > 93–173 (126); Q4, >173–319 (221) y Q5, >319 (508). Mientras que en el presente estudio los quintiles de las concentraciones de DAPs en los niños fueron: Q1, ≤150.9 (122.1); Q2, 151 a ≤200.8 (174.6); Q3, 200.9 a ≤252.7 (232.7); Q4, 252.8 a ≤312.1 (277.8); y Q5, >312.1 (388.4).

El metabolismo de los plaguicidas organofosforados ocurre principalmente en el hígado. Como primer paso, la forma “Tio” de estos plaguicidas sufre una desulfuración oxidativa mediada por citocromo p450 para formar el “oxón” correspondiente, el cual es la forma que ejerce la acción tóxica. La principal ruta de desintoxicación de los organofosforados consiste en la hidrólisis del “oxón” por la paraoxonasa 1 (Costa y cols., 2003, 2005), produciéndose un alcohol y DMP o DEP. Dado lo anterior, además

se evaluó la asociación entre los resultados cognitivos y las concentraciones de estos metabolitos.

En las Figuras 3 y 4, se presentan las puntuaciones de los índices cognitivos y del CI de acuerdo a las concentraciones de los metabolitos DMP y DEP (en  $\mu\text{g/L}$  y estratificadas en tertiles) del presente estudio. Con respecto, al metabolito DMP, solo las puntuaciones del Índice de Razonamiento Perceptual presentaron diferencias significativas ( $p=0.018$ , ANOVA); los niños del tercer tercil presentaron una disminución de 8.1 puntos en el coeficiente intelectual en comparación con los del primer tercil (IC: -5.4 a -0.83,  $p=0.043$ ). Mientras que con respecto al metabolito DEP, las puntuaciones de los Índices de Comprensión Verbal ( $p=0.041$ , ANOVA), Razonamiento Perceptual ( $p=0.021$ , ANOVA), Memoria de Trabajo ( $p=0.006$ , ANOVA) y el Coeficiente Intelectual ( $p=0.006$ , ANOVA) presentaron diferencias significativas; los niños del tercer tercil presentaron una disminución de 11.4 puntos en el coeficiente intelectual en comparación con los del primer tercil (IC: -6.4 a -1.2,  $p=0.005$ ).

El coeficiente intelectual (CI) está influenciado por factores genéticos y ambientales. Algunos investigadores sugieren que una parte significativa de la variación observada en el CI es de origen genético (Plomin y cols., 2000); por otro lado, se ha indicado que otros factores como la exposición a drogas y contaminantes, el nivel socioeconómico, el entorno familiar, la educación y CI de los padres, una nutrición adecuada, la intervención de los padres en el aprendizaje y motivación del niño, factores estresantes o dificultades emocionales, entre otros, también pueden influir en los resultados de las pruebas cognitivas (Coscia y cols., 2001; Braaten y Norman, 2006).

En el presente estudio, se evaluó el factor confusor del plomo y de otras covariables tales como: la escolaridad y la función intelectual de la madre, el ingreso familiar y el estado nutricional de los participantes. Como medidas representativas del estado nutricional, se utilizaron los valores z-score del IMC para la edad y el nivel de hemoglobina.

Además de los plaguicidas, otros contaminantes han sido asociados con alteraciones en el sistema nervioso central, tal es el caso del plomo (Weiss 2000; Needleman, 2006). Varios investigadores han reportado que este neurotóxico está asociado con efectos neuroconductuales adversos en niños, principalmente en concentraciones mayores a 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ; algunos de estos efectos incluyen alteraciones de la memoria, problemas psicomotores y afectaciones en el rendimiento escolar (Kaufman, 2001; Lanphear y cols., 2005; Sanders y cols., 2009). Lanphear y cols., (2005) encontraron que la exposición crónica a concentraciones bajas de plomo (menores a 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) está asociada con disminución en el CI. Olympio y cols. (2010) reportaron asociaciones entre los niveles de plomo y alteraciones neuroconductuales tales como depresión, ansiedad y conductas antisociales (agresividad y delincuencia) en niños y adolescentes de Brasil.

En una investigación previa, realizada cuatro años atrás en la misma localidad de estudio, se detectaron concentraciones de plomo (media:  $6.3 \pm 2.5 \mu\text{g}/\text{dL}$ ) por arriba del valor de referencia (5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) en el 60% de los niños; además, se encontró una asociación significativa entre los niveles de este neurotóxico y los índices de Comprensión Verbal y Razonamiento Perceptual (Rivero, Tesis Doctoral 2012). En el presente estudio, también se midieron los niveles sanguíneos de plomo como factor confusor; alrededor del 60% de los participantes tuvieron concentraciones (media:  $4.8 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{dL}$ ) por debajo de valor de referencia de este neurotóxico y no se encontró asociación alguna entre éste y las subescalas cognitivas y el CI Total. La concentración media de plomo obtenida en el presente estudio fue similar a la media nacional reportada (4.5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ), obtenida en un estudio realizado en diez Estados de México (INE, 2004). En México, la gasolina libre de plomo ha contribuido en la reducción de la exposición al plomo; sin embargo, otras fuentes de exposición continúan siendo un riesgo para la salud de la población, tal es el caso del uso de loza vidriada y el consumo de alimentos y dulces contaminados con este metal (Caravanos y cols., 2014). En el presente estudio no se identificaron las fuentes potenciales, ni las rutas de exposición al plomo.

La media del CI Total (89.6) de los niños y adolescentes del presente estudio estuvo por debajo de los niveles esperados (90-110) (Wechsler, 1983); siendo el Índice de Memoria de Trabajo, el que presentó menores puntuaciones (media: 88.2). La memoria de trabajo es la capacidad para mantener información de forma activa, mediante procesos neurobiológicos de almacenamiento y de recuperación de la información básica en el aprendizaje y en el pensamiento (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005). Las alteraciones en la memoria de trabajo influye en diversos procesos formales de aprendizaje académico, tales como dificultad para enfocar la atención, dificultad en el reconocimiento de patrones de prioridad, incapacidad para reconocer las jerarquías y dificultad en el reconocimiento y la selección de los objetivos que son más adecuados a la resolución de un problema (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005). Los déficits en la memoria de trabajo también están asociados con enfermedades como la esquizofrenia, el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (ADHD, por sus siglas en inglés), la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Dash y cols., 2007). Se ha indicado que el coeficiente intelectual es un predictor del nivel de logro académico de los escolares; no obstante, también se ha señalado que éste no es la única medida para el éxito (Festus, 2012); y que la inteligencia emocional, la inteligencia social, y la suerte también juegan un papel importante en el éxito de una persona (Goleman, 1995; Petrides y cols., 2004).

En conclusión, estos resultados sugieren que la exposición a plaguicidas OP (estimada por las concentraciones urinarias de metabolitos dialquifosfato), podría estar asociada negativamente con el desempeño cognitivo en niños y adolescentes en edad escolar de 6 a 14 años de edad, residentes de una localidad agrícola mexicana. Para corroborar si estas alteraciones cognitivas son persistentes se sugiere realizar estudios de seguimiento.

### **Declaración de Conflicto de Intereses**

Los autores declaran que no tienen competencia de intereses financieros.

## Reconocimientos

Este estudio fue apoyado por PROMEP SES-2009-UASLP-CA-45, CONACYT-México (Beca tesis No. 19922) y por el Instituto Politécnico Nacional a través del COTEBAL. Agradecemos a la QFB Liliana Llamasares Azuara, por su colaboración en la realización de las determinaciones de creatinina. El trabajo descrito en este manuscrito fue realizado en concordancia con las guías nacionales e internacionales para la Protección de los Seres Humanos.

## Referencias

- Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M., 2012. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*. Doi: 10.1016/j.tox.2012.09.011.
- Arcury, T. A., Grzywacz, J. G., Barr, D. B., Tapia, J., Chen, H., Quandt, S. A., 2007. Pesticide Urinary Metabolite Levels of Children in Eastern North Carolina Farmworker Households. *Environ Health Perspect*, 115, 1254–1260.
- Barr, D. B., Bravo, R., Weerasekera, G., Caltabiano, L. M., Whitehead, R. D., Olsson, A. O., et al., 2004. Concentrations of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphorus Pesticides in the U.S. Population. *Environ Health Perspect*, 112, 186–200.
- Berkowitz GS, Wetmur JG, Birman-Deych E, Obel J, Lapinski RH, Godbold JH, et al., 2004. In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect* 112, 388–391.
- Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Wright, R.O. and Weisskopf, M.G., 2010. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides. *Pediatrics* 125, 1270–1277.
- Bouchard, M.F., Chevrier, J., Harley, K.G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., et al., 2011. Prenatal Exposure to Organophosphate Pesticides and IQ in 7-Year-Old Children. *Environ Health Perspect* 119, 1189–1195.
- Bradman, A., Eskenazi, B., Barr, D.B., Bravo, R., Castorina, R., Chevrier, J., et al., 2005. Organophosphate urinary metabolite levels during pregnancy and after delivery in women living in an agricultural community. *Environ Health Perspect* 113, 1802–1807.
- Bradman, A., Whitaker, D., Quiros, L., Castorina, R., Claus Henn, B., Nishioka, M., et al., 2007. Pesticides and their metabolites in the homes and urine of farmworker children living in the Salinas Valley, CA. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 17,331–349.
- Bradman, A., Kogut, K., Eisen, E. A., Jewell, N. P., Quirós-Alcalá, L., Castorina, R. et al., 2013. Variability of Organophosphorous Pesticide Metabolite Levels in Spot and

- 24-hr Urine Samples Collected from Young Children during 1 Week. *Environ Health Perspect*, 121, 118–124.
- Braaten, E.B. and Norman, D., 2006. Intelligence (IQ) Testing. *Pediatrics in Review* 27, 403-408.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M.M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., Orjuela, M., Gualtero, S., Ericson, B., Rivera, A., Fuller, R., 2014. Niveles de Plomo en Sangre en México y su Implicación para la Carga Pediátrica de la Enfermedad. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. *Annals of Global Health* 80, 1-11.
- Castorina, R., Bradman, A., McKone, T.E., Barr, D.B., Harnly, M.E., Eskenazi, B., 2003. Cumulative organophosphate pesticide exposure and risk assessment among pregnant women living in an agricultural community: a case study from the CHAMACOS cohort. *Environ Health Perspect* 111, 1640–1648.
- Cole, T.J., Bellizzi, M.C., Flegal, K.M., Dietz, W.H., 2000. Establishing a standard definition for child overweight and obesity: international survey. *BMJ* 320, 1240-1243.
- Cole, T.J., Flegal, K.M., Nicholls, D., Jackson, A.A., 2007. Body mass index cut-offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ* 335, 194-202.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2003. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu. Rev. Med.* 54, 371–392.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Vitalon, A., Furlong, C.E., 2005. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta* 352, 37–47.
- Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan JD. 2007. Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem.* 14(8), 554-563.
- de Onis, M., Onyango, A.W., Borghi, E., Siyam, A., Nishida, C., Siekmann, J., 2007. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization* 85, 660-667.
- Eckerman, D.A., Gimenes, L.S., Curi de Souza, R., Lopes Galvão, P.R., Sarcinelli, P.N., Chrisman, J.R., 2007. Age related effects of pesticide exposure on neurobehavioral performance of adolescent farm workers in Brazil. *Neurotoxicology and Teratology* 29, 164–175.
- Engel, S.M., Berkowitz, G.S., Barr, D.B., Teitelbaum, S.L., Siskind, J., Meisel, S.J., et al., 2007. Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am J Epidemiol* 165, 1397-1404.
- Engel, S.M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D.B., et al., 2011. Prenatal Exposure to Organophosphates, Paraoxonase 1, and Cognitive Development in Childhood. *Environ Health Perspect* 119, 1182–1188.
- Eskenazi, B., Bradman, A., Castorina, R., 1999. Exposure of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect* 107(3), 409–419.
- Eskenazi, B., Harley, K., Bradman, A., Weltzien, E., Jewell, N.P., Barr, D.B., et al., 2004. Association of in Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Fetal Growth and Length of Gestation in an Agricultural Population. *Health Perspect* 112, 1116–1124.

- Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D.B., Johnson, C., et al., 2007. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect* 115, 792–798.
- Eskenazi, B., Huen, K., Marks, A., Harley, K.G., Bradman, A., Barr, D.B., and Holland, N., 2010. PON1 and Neurodevelopment in Children from the CHAMACOS Study Exposed to Organophosphate Pesticides in Utero. *Environ Health Perspect* 118, 1775–1781.
- Etchepareborda, M.C., Abad-Mas L., 2005. Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Rev Neurol* 40 (Supl 1, S79-83.
- Fenske, R. A., Lu, C., Curl, C. L., Shirai, J. H., Kissel, J. C. (2005). Biologic Monitoring to Characterize Organophosphorus Pesticide Exposure among Children and Workers: An Analysis of Recent Studies in Washington State. *Environ Health Perspect*, 113, 1651-1657.
- Festus, A.B., 2012. “The relationship between Emotional Intelligence and Academic Achievement of senior secondary school students in the Federal Capital Territory, Abuja.” *Journal of Education and Practices*, 3(10), 13-19.
- Flores Lázaro J.C., Ostrosky-Solís, F., 2008. Neuropsicología de Lóbulos Frontales, Funciones Ejecutivas y Conducta Humana. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias* 8 (1), 47-58.
- Goleman, D., 1995. *Emotional intelligence: Why it can matter more than I.Q.*, New York: Bantam Books.
- Guillette, E.A., Meza, M.M., Aquilar, M.G., Soto, A.D., Garcia, I.E., 1998. An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. *Environ Health Perspect*. 106, 347–353.
- Grandjean, P., Harari, R., Barr, DB., Debes, F., 2006. Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics* 117, 546–556.
- Gamlin, J., Diaz, Romo P., Hesketh, T., 2006. Exposure of young children working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. *Child: Care Health and Development* 33(3):246-8.
- Gonzalez, V., Huen, K., Venkat, S., Pratt, K., Xiang, P., Harley, K.G., Kogut, K., Trujillo, C.M., Bradman, A., Eskenazi, B., Holland, N.T., 2012. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *J. Expo, Sci. Environ. Epidemiol* 22 (6), 641–648.
- Handal, A.J., Lozoff, B., Breilh, J., Harlow, S.D., 2007. Neurobehavioral development in children with potential exposure to pesticides. *Epidemiology* 18, 312–320.
- Handal, A.J., Lozoff, B., Breilh, J., and Harlow, S.D., 2007. Effect of Community of Residence on Neurobehavioral Development in Infants and Young Children in a Flower-Growing Region of Ecuador *Environ Health Perspect* 115, 128–133.
- Handal, A.J., Harlow, S.D., Breilh, J., Lozoff, B., 2008. Occupational exposure to pesticides during pregnancy and neurobehavioral development of infants and toddlers. *Epidemiology* 19, 851–859.
- Harari, R., Julvez, J., Murata, K., Barr, D., Bellinger, D.C., Debes, F., et al., 2010. Neurobehavioral deficits and increased blood pressure in school-age children prenatally exposed to pesticides. *Environ Health Perspect* 118, 890–896.



- Holland, N., Furlong, C., Bastaki, M., Richter, R., Bradman, A., Huen, K., et al., 2006. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ Health Perspect* 114, 985–991.
- Kamel, F., Engel, L.S., Gladen, B.C., Hoppin, J.A., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2007. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Hum Exp Toxicol* 26:243–250.
- Kaufman, A. S., 2001. Do low levels of lead produce IQ loss in children? A careful examination of the literature. *Archives of Clinical Neuropsychology* 16, 303-341.
- Koch, D., Lu, C., Fisker-Andersen, J., Jolley, L., Fenske, R. A., 2002. Temporal Association of Children’s Pesticide Exposure and Agricultural Spraying: Report of a Longitudinal Biological Monitoring Study. *Environ Health Perspect*, 110, 829-833.
- Lambert, W. E., Lasarev, M., Muniz, J., Scherer, J., Rothlein, J., Santana, J., et al., 2005. Variation in Organophosphate Pesticide Metabolites in Urine of Children Living in Agricultural Communities. *Environ Health Perspect*, 113, 504–508.
- Lanphear, B.P., Hornung, R., Khoury, J., Yolton, K., Baghurst, P., Bellinger, D.C., et al., 2005. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. *Environ Health Perspect* 113(7), 894–899.
- Lu, C., Knutson, D. E., Fisker-Anderssen, J., Fenske, R., 2001. Biological monitoring survey of organophosphorus pesticide exposure among preschool children in the Seattle metropolitan area. *Environ Health Perspect*, 109(3), 299–303.
- Lu, C., Kedan, G., Fisker-Andersen, J., Kissel, J.C., Fenske, R.A., 2004. Multipathway organophosphorus pesticide exposures of preschool children living in agricultural and nonagricultural communities. *Environ Res* 96, 283–289.
- Lu, C., Bravo, R., Caltabiano, L.M., Irish, R.M., Weerasekera, G., Barr, D.B., 2005. The presence of dialkylphosphates in fresh fruit juices: implication for organophosphorus pesticide exposure and risk assessments. *J Toxicol Environ Health A* 68, 209–227.
- Marks, A.R., Harley, K., Bradman, A., Kogut, K., Barr, D.B., Johnson, C., et al., 2010. Organophosphate Pesticide Exposure and Attention in Young Mexican-American Children: The CHAMACOS Study. *Environ Health Perspect* 118, 1768–1774).
- Martos Mula, A.J., Saavedra, O.N., Wierna, N.R., Ruggeri, M.A., Tschambler, J.A., Ávila Carreras, N.M., Bonillo, M.C., Bovi Mitre, M.G., 2013. Impairment of cognitive and motor functions in children from rural areas of Jujuy, and its relationship with cholinesterase inhibitor pesticides. A pilot study A. *Acta Toxicol. Argent.* 21, 15-24.
- Mink, P., Goodman, M., Barraj, L., Imrey, H., Kelsh, M., Yager, J., 2004. Evaluation of uncontrolled confounding in studies of environmental exposures and neurobehavioral testing in children. *Epidemiology* 15(4):385–393.
- Muñoz, M.T., Iglesias, V.P., Lucero, B.A., 2011. Exposure to organophosphate and cognitive performance in Chilean rural schoolchildren: an exploratory study. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 29(3), 256-263.
- Muñoz-Quezada, M.T., Iglesias, V., Lucero, B., Steenland, K., Barr, D.B., Levy, K., et al., 2012. Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environ Int*, 47, 28–36.
- Needleman, H.L., 2006. Evaluating neurotoxic effects: epidemiological, epistemic, and economic issues. In: *Human Developmental Neurotoxicology* (Bellinger DC, ed). New York: Taylor & Francis, 499–507.

- Qiao, D., Seidler F.J., Tate C.A., Cousins, M.M., Slotkin, T.A., 2003. Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect* 111, 536-544.
- Quintanilla-Vega, B., Pérez-Herrera, N., Rojas-García, E., 2010. Epidemiological studies of anticholinesterase pesticide poisoning in Mexico. In: *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. Satoh T, Gupta RC(Eds). John Wiley & Sons, Inc, 471–479.
- Quirós-Alcalá, L., Alkon, A.D., Boyce, W.T., Lippert, S., Davis, N.V., Bradman, A., Barr, D.B., Eskenazi, B., 2011. Maternal prenatal and child organophosphate pesticide exposures and children's autonomic function. *NeuroToxicology* 32, 646–655.
- Petrides, K.V., Frederickson, N., Furnham, A., 2004. The role of trait emotional intelligence in academic performance and deviant behavior at school. *Personality and Individual Differences* 36, 277–293.
- Rauh, V.A., Garfinkel, R., Perera, F.P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D.B., et al., 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118, 1845–1859.
- Rivero Pérez N.E., 2012. Evaluación de los Efectos en Salud por la Exposición a Plaguicidas en Niños de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Doctor. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Programas Multidisciplinarios de Posgrados en Ciencias Ambientales.
- Rohlman, D.S., Arcury, T.A., Quandt, S.A., Lasarev, M., Rothlein, J., Travers, R., et al., 2005. Neurobehavioral performance in preschool children from agricultural and non-agricultural communities in Oregon and North Carolina. *Neurotoxicology* 26, 589–598.
- Ruckart, P.Z., Kakolewski, K., Bove, F.J., Kaye, W.E., 2004. Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio. *Environ Health Perspect* 112, 46–51.
- Sanborn, M.D., Cole, D., Abelsohn, A., Weir, E., 2002. Identifying and managing adverse environmental health effects: 4. Pesticides. *CMAJ* 166(11), 1431–1436.
- Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., and Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol Mech Methods*, 21(9), 681–691
- Sánchez Lizardi, P., O'Rourke, M.K., and Morris, R.J., 2007. The Effects of Organophosphate Pesticide Exposure on Hispanic Children's Cognitive and Behavioral Functioning. *J Pediatr Psychol* 33, 91–101.
- Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., and Tchounwou, P. B., 2009. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. *Rev Environ Health* 24(1), 15–45
- Sly, P.D., Flack, F., 2008. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann NY Acad. Sci.* 1140, 163–183.
- Subramanian, K.S., 1987. Determination of lead in blood: comparison of two GFASS methods. *Atomic Spectrosc* 8, 7-14.
- Oulhote, Y., Bouchard, M. F., 2013. Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Behavioral Problems in Canadian Children. *Environ Health Perspect*, 121, 1378–1384.

- Olympos, K.P., Oliveira, P.V., Naozuka, J., Cardoso, M.R., Günther, W.M., Bechara, E.B., 2010. Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(2), 273–279.
- Valcke, M., Samuel, O., Bouchard, M., Dumas, P., Belleville, D., Tremblay, C., 2006. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada. *Int Arch Occup Environ Health*, 79, 568-577.
- Verma, S.K., Kumar, V., Gill, K.D., 2009. An acetylcholinesterase-independent mechanism for neurobehavioral impairments after chronic low level exposure to dichlorvos in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 92:173–181.
- Vida, P., Moretto, A., 2007. Pesticide exposure pathways among children of agricultural workers. *J Public Health* 15, 289–299.
- Wechsler, D., 1983. WISC-R-Español. Escala de Inteligencia Revisada para el Nivel Escolar. México DF, México: Manual Moderno. Wechsler D. 1991. Wechsler Intelligence Scale for Children. San Antonio, TX: Psychological Corporation.
- Wechsler, D., 2003. Wechsler Intelligence Scale for Children-IV: Administration and Scoring Manual. San Antonio, TX: Harcourt Assessment.
- Weiss, B., 2000. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environ Health Perspect* 108(3), 375–381.
- Weiss, B., Amier, S., Amier, R.W., 2004. Pesticides. *Pediatrics* 113:1030-1038.
- Whyatt, R.M., Rauh, V., Barr, D.B., Camann, D.E., Andrews, H.F., Garfinkel, R., et al., 2004. Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. *Environ Health Perspect* 112, 1125–1132.
- Whyatt, R.M., Garfinkel, R., Hoepner, L.A., Andrews, H., Holmes, D., Williams, M.K., et al., 2009. A biomarker validation study of prenatal chlorpyrifos exposure within an inner-city cohort during pregnancy. *Environ Health Perspect* 117:559–567.
- Yolton, K., Xu, Y., Sucharew, H., Succop, P., Altaye, M., Popelar, A., Montesano, M.A., Calafat, A.M., and Khoury, J.C., 2013. Impact of low-level gestational exposure to organophosphate pesticides on neurobehavior in early infancy: a prospective study. *Environmental Health* 12: 79.
- Young, J.G., Eskenazi, B., Gladstone, E.A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., et al., 2005. Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* 26,199–209.

Tabla 1

## Características de los niños y adolescentes participantes

Característica		n (%)
Niños y adolescentes		
Edad	6 a 11 años	92 (87.6)
	≥12 años	13 (12.4)
Sexo	masculino	53 (50.5)
	femenino	52 (49.5)
IMC <sup>a</sup>	bajo peso	18 (17.1)
	normal	58 (55.2)
	sobrepeso	22 (21)
	obeso	7 (6.7)
Lugar de nacimiento	en el sitio de estudio <sup>b</sup>	94 (89.5)
	en otro estado	11 (10.5)
Tiempo de residencia (años):	≤5 años	6 (5.7)
	>5 años	99 (94.3)
Ubicación de la escuela	Escuela A	48 (45.7)
	Escuela B	57 (54.3)
Acompaña a familiares a campos agrícolas	no	69 (65.7)
	si	36 (34.3)
Ayuda en actividades agrícolas	no	91 (86.7)
	si	14 (13.3)
Exposición a plaguicidas en el hogar <sup>c</sup>	no	58 (55.2)
	si	45 (42.9)

Tabla 1  
Continuación

Característica		n (%)
Familiares		
Edad de la madre (años)		37 ± 5.5 (25-54) <sup>d</sup>
Escolaridad de la madre (años)		9.3 ± 3.2 (1-20) <sup>d</sup>
La madre permaneció en el sitio durante el embarazo	no	10 (9.5)
	si	95 (90.5)
La madre estuvo expuesta a plaguicidas durante embarazo	no	58 (55.2)
	si	41 (39.0)
Ocupación del padre	no	46 (43.8)
	si	54 (51.4)
Ingreso familiar mensual (\$)	<1000	8 (7.6)
	1000 a 2000	26 (24.8)
	>2000 a 4000	30 (28.6)
	>4000	37 (35.2)
Proximidad de campos agrícolas al hogar <sup>e</sup>	no	15 (14.3)
	>60 a 250 m	9 (8.6)
	>15 a 60 m	24 (22.9)
	≤15 m	57 (54.3)

<sup>a</sup> De acuerdo al Grupo de Trabajo sobre Obesidad (IOTF por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud. <sup>b</sup> Sitio de estudio: El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, México. <sup>c</sup> Durante el mes previo al estudio. <sup>d</sup> Expresada como media ± desviación estándar (mínimo-máximo). <sup>e</sup> Determinado por cuestionario. Escuela A: ubicada en el centro de la localidad. Escuela B: localizada en la periferia, cerca de campos agrícolas

Tabla 2

Información general, parámetros clínicos y de exposición, y resultados cognitivos de los niños y adolescentes participantes

Parámetro	Media (DE)	Mínimo	Percentiles					Máximo	
			p5	p25	p50	p75	p95		
Edad	(años)	9.7 (1.9)	5.8	6.4	8.5	9.8	11	12.7	14
Escolaridad del niño	(años)	3.4 (1.6)	0	1	2	4	5	6	9
IMC	(kg/m <sup>2</sup> )	17.6 (3.7)	12.4	13.3	14.5	16.6	19.5	25.0	32.5
IMC para la edad	(z-score)	0.16 (1.46)	-2.63	-2.19	-0.85	0.11	1.37	2.54	3.78
Estatura para la edad	(z-score)	0.06 (0.96)	-2.16	-1.48	-0.59	0.07	0.55	1.68	3.41
Hemoglobina	(g/dL)	13.9 (0.70)	11.5	12.7	13.5	13.9	14.3	15.2	15.6
Creatinina	(g/L)	1.3 (0.41)	0.46	0.72	0.93	1.2	1.5	2	2.5
Plomo en sangre	(µg/dL)	4.8 (2.1)	1.2	2	3	4.6	6	9.6	10.3
Metabolitos DAP									
DMPs	(nmol/L)	183 (138)	<LD	60	120	161	194	375	1222
	(nmol/g creat)	158 (106)	<LD	38	95	133	193	373	729

Tabla 2

Continuación

Parámetro		Media (DE)	Mínimo	Percentiles					Máximo
				p5	p25	p50	p75	p95	
DEPs	(nmol/L)	65 (54)	<LD	<LD	36	56	87	165	347
	(nmol/g creat)	57 (49)	<LD	<LD	31	48	73	143	273
DAPs	(nmol/L)	248 (157)	<LD	60	155	231	301	493	1292
	(nmol/g creat)	216 (130)	<LD	38	132	198	255	472	770
Función intelectual de la madre (total Raven crudo) <sup>a</sup>									
		30.7 (4.8)	16	20.1	28.5	32	34	36	36
Escala WISC-IV (niños y adolescentes)									
	Comprensión Verbal	89.6 (12.1)	61	69.6	82	91	98.5	106	128
	Razonamiento Perceptual	94.5 (11.4)	53	77	86	96	103	112	117
	Memoria de Trabajo	88.2 (10.7)	59	65.9	83	88	97	104	110
	Velocidad de Procesamiento	94.9 (12.9)	65	75	85	94	103	120	128
	Escala CI Total	89.6 (11.2)	52	70	81.5	89	99	108.7	115

DMPs: suma molar de los metabolitos DMP, DMTP y DMDTP; DEPs: suma molar de DEP, DETP y DEDTP; DAPs: suma molar de DMPs y DEPs. CI: Coeficiente intelectual. <sup>a</sup> Evaluada mediante la Prueba de Matrices Progresivas de Raven.

Tabla 3

Índices cognitivos de acuerdo con las concentraciones de DMPs, DEPs y DAPs (categorizadas en quintiles) de niños y adolescentes de una localidad agrícola.

Índice cognitivo		DMPs <sup>c</sup>	DEPs <sup>c</sup>	DAPs <sup>c</sup>
Comprensión Verbal <sup>a</sup>	<i>p</i> -value	0.004	0.001	<0.0001
	Q1	97.9±12.4	99.2±11.6	99.6±10.9
	Q2	87±12	86.6±10.9	85.7±11.8
	Q3	90.1±11.4	88.7±10.7	88.3±9,4
	Q4	85.2±10.3	85.2±11	86.9±11.2
	Q5	87±10.6	88±11.7	86.8±12
Razonamiento Perceptual <sup>a</sup>	<i>p</i> -value	0.001	0.008	<0.0001
	Q1	102.6±8.3	102.5±8.5	103.7±7.2
	Q2	94±9.5	93±9.8	92.9±7.9
	Q3	93.7±10.5	91.5±13	92±11
	Q4	88.9±12	92±12.6	90.3±13.4
	Q5	92.6±12.8	93.7±9.7	92.9±12.2
Memoria de Trabajo <sup>b</sup>	<i>p</i> -value	0.153	0.001	0.051
	Q1	91 (74-110)	97 (86-104)	94 (74-104)
	Q2	91 (74-104)	88 (74-102)	88 (74-110)
	Q3	88 (71-104)	87 (74-110)	88 (71-102)
	Q4	86 (59-102)	84.5 (59-97)	86 (59-104)
	Q5	86 (62-102)	91 (65-104)	91 (62-102)
Velocidad de Procesamiento <sup>a</sup>	<i>p</i> -value	0.315	0.323	0.360
	Q1	98.4±10.7	97.5±10.1	98±10.2
	Q2	97.6±12.1	94.8±12	97.9±11.5
	Q3	92.7±13.2	98.1±14.1	93±12.2
	Q4	91.4±15.1	91.1±14.5	93.1±15.7



Tabla 3

Continuación

Índice cognitivo		DMPs <sup>c</sup>	DEPs <sup>c</sup>	DAPs <sup>c</sup>
Coeficiente intelectual <sup>a</sup>	<i>p</i> -value	0.001	<0.0001	<0.0001
	Q1	97.8±9	99.2±7.9	99.3±7.6
	Q2	89.2±7.8	87.5±9.3	88.3±7.8
	Q3	89.4±11.2	89.2±10.6	86.7±7.8
	Q4	83.9±11.1	84.1±11.8	86.3±12.7
	Q5	87.2±12.4	87.8±10.9	86.8±13.6

<sup>a</sup> Los datos son expresados como media aritmética ± desviación estándar y evaluado por la prueba de ANOVA (post hoc Bonferroni) ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Los datos son expresados como mediana (mínimo-máximo) y evaluado por la prueba Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup> Concentraciones en nmol/L, categorizadas en quintiles: DMPs: Q1 ( $\leq 113.4$ ), Q2 (113.5 a  $\leq 141.2$ ), Q3 (141.3 a  $\leq 176.5$ ), Q4 (176.6 a  $\leq 207.5$ ) y Q5 ( $> 207.5$ ); DEPs: Q1 ( $\leq 29.8$ ), Q2 (29.9 a  $\leq 47$ ), Q3 (47.1 a  $\leq 68.6$ ), Q4 (68.7 a  $\leq 92.6$ ) y Q5 ( $> 92.6$ ); DAPs: Q1 ( $\leq 150.9$ ), Q2 (151 a  $\leq 200.8$ ), Q3 (200.9 a  $\leq 252.7$ ), Q4 (252.8 a  $\leq 312.1$ ) y Q5 ( $> 312.1$ ). DMPs: suma molar de los metabolitos DMP, DMTP y DMDTP; DEPs: suma molar de DEP, DETP y DEDTP; DAPs: suma molar de DMPs y DEPs. CI: Coeficiente intelectual.

Tabla 4

Influencia de las concentraciones de metabolitos DMPs, DEPs y DAPs sobre las puntuaciones cognitivas en niños mexicanos de una localidad agrícola

Índice cognitivo	r <sup>2</sup>	β-Coeficiente (95% IC)	p-value
<b>Comprensión Verbal</b>			
DAPs <sup>a</sup>	0.18	-2.6 (-4.2 a -1.1)	0.001
DMPs <sup>a</sup>	0.15	-2.7 (-4.3 a -1.0)	0.002
DEPs <sup>a</sup>	0.11	-2.1 (-3.7 a -0.44)	0.013
<b>Razonamiento Perceptual</b>			
DAPs <sup>a</sup>	0.22	-2.5 (-4.0 a -1.0)	0.001
DMPs <sup>a</sup>	0.22	-2.5 (-4.0 a -1.0)	0.001
DEPs <sup>a</sup>	0.18	-1.8 (-3.3 a -0.28)	0.021
<b>Memoria de Trabajo</b>			
DAPs <sup>a</sup>	0.23	-2.7 (-4.1 a -1.2)	0.001
DMPs <sup>a</sup>	0.20	-2.3 (-3.8 a -0.80)	0.003
DEPs <sup>a</sup>	0.27	-3.0 (-4.4 a -1.6)	0.000
<b>Velocidad de Procesamiento</b>			
DAPs <sup>a</sup>	0.07	-1.9 (-3.8 a -0.06)	0.075
DMPs <sup>a</sup>	0.07	-1.9 (-3.8 a 0.04)	0.077
DEPs <sup>a</sup>	0.07	-1.4 (-3.3 a 0.43)	0.254
<b>Escala CI Total</b>			
DAPs <sup>a</sup>	0.25	-2.9 (-4.3 a -1.5)	0.000
DMPs <sup>a</sup>	0.27	-2.9 (-4.3 a -1.4)	0.000
DEPs <sup>a</sup>	0.22	-2.6 (-4.1 a -1.2)	0.000

Modelos de regresión lineal múltiples ( $p < 0.05$ ) ajustados por: función intelectual de la madre, ingreso familiar mensual, concentración de plomo en sangre, z-score del IMC por edad, nivel de hemoglobina y nivel de creatinina. <sup>a</sup> Concentraciones en nmol/L categorizadas por quintiles. DMPs: suma molar de los metabolitos DMP, DMTP y DMDTP; DEPs: suma molar de DEP, DETP y DEDTP; DAPs: suma molar de DMPs y DEPs. CI: Coeficiente intelectual.

## Leyenda de Figuras

### Figura 1

Localización del sitio de estudio: El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, México.

### Figura 2

Media (95% IC) de las puntuaciones de los índice cognitivos por quintil de la concentración urinaria de los DAPs: a) Comprensión Verbal, b) Razonamiento Perceptual, c) Memoria de Trabajo, d) Velocidad de Procesamiento, y e) Coeficiente Intelectual. Concentraciones de DAPs (en nmol/L), categorizadas por quintil: Q1:  $\leq 150.9$ , Q2:  $151 \text{ A } \leq 200.8$ , Q3:  $200.9 \text{ a } \leq 252.7$ , Q4:  $252.8 \text{ a } \leq 312.1$ , Q5:  $>312.1$ . Evaluada por la prueba de ANOVA:  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.060$ ,  $p = 0.360$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

### Figura 3

Media (95% IC) de las puntuaciones de los índice cognitivos por tercil de la concentración urinaria del DMP: a) Comprensión Verbal, b) Razonamiento Perceptual, c) Memoria de Trabajo, d) Velocidad de Procesamiento, y e) Coeficientes Intelectual. Concentraciones de DMP (en  $\mu\text{g/L}$ ), categorizadas por tercil: T1:  $< \text{LDM}$ , T2:  $0.35 \text{ a } 1.69$ , T3:  $> 1.69$ . Evaluada por la prueba de ANOVA:  $p = 0.169$ ,  $p = 0.018$ ,  $p = 0.243$ ,  $p = 0.747$  y  $p < 0.068$ , respectivamente.

### Figura 4

Media (95% IC) de las puntuaciones de los índice cognitivos por tercil de la concentración urinaria del DEP: a) Comprensión Verbal, b) Razonamiento Perceptual, c) Memoria de Trabajo, d) Velocidad de Procesamiento, y e) Coeficientes Intelectual. Concentraciones de DEP (en  $\mu\text{g/L}$ ), categorizadas por tercil: T1:  $\leq 5.26$ , T2:  $5.27 \text{ a } 8.7$ , T3:  $> 8.7$ . Evaluada por la prueba de ANOVA:  $p = 0.041$ ,  $p = 0.021$ ,  $p = 0.006$ ,  $p = 0.303$  y  $p = 0.006$ , respectivamente.

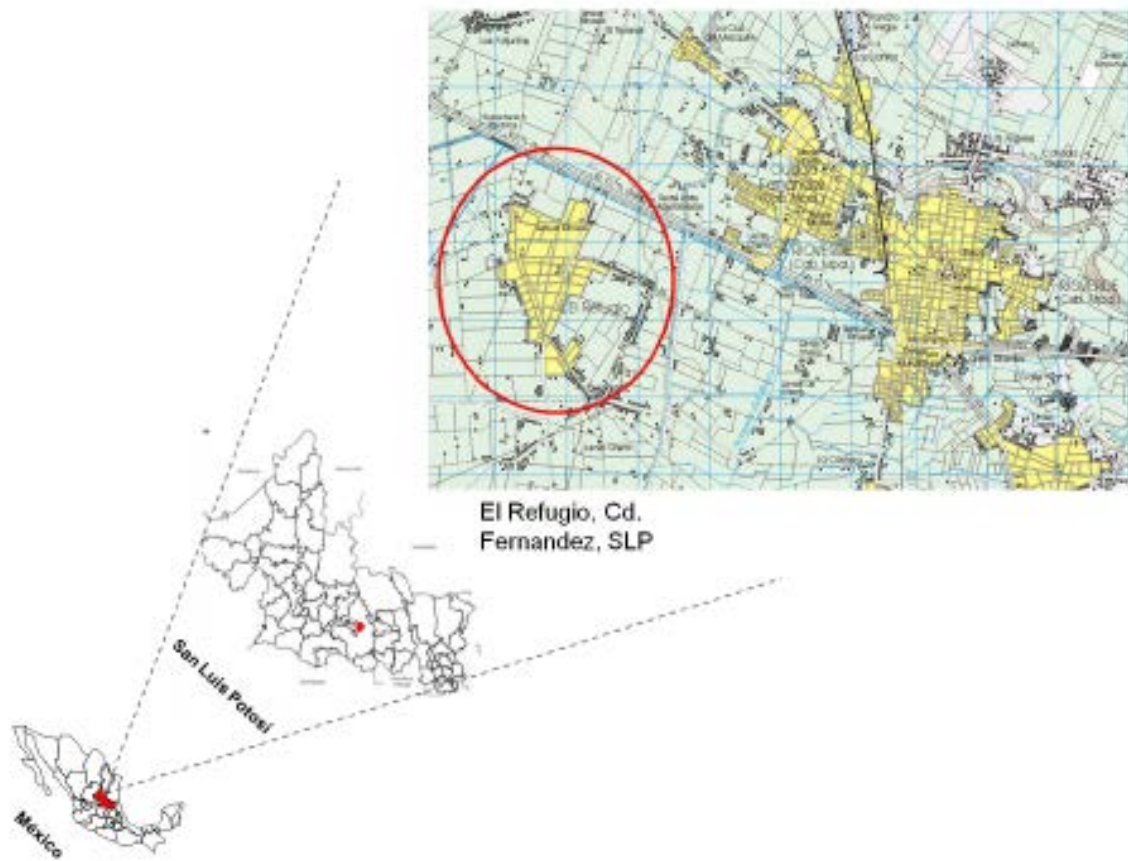


Figura 1

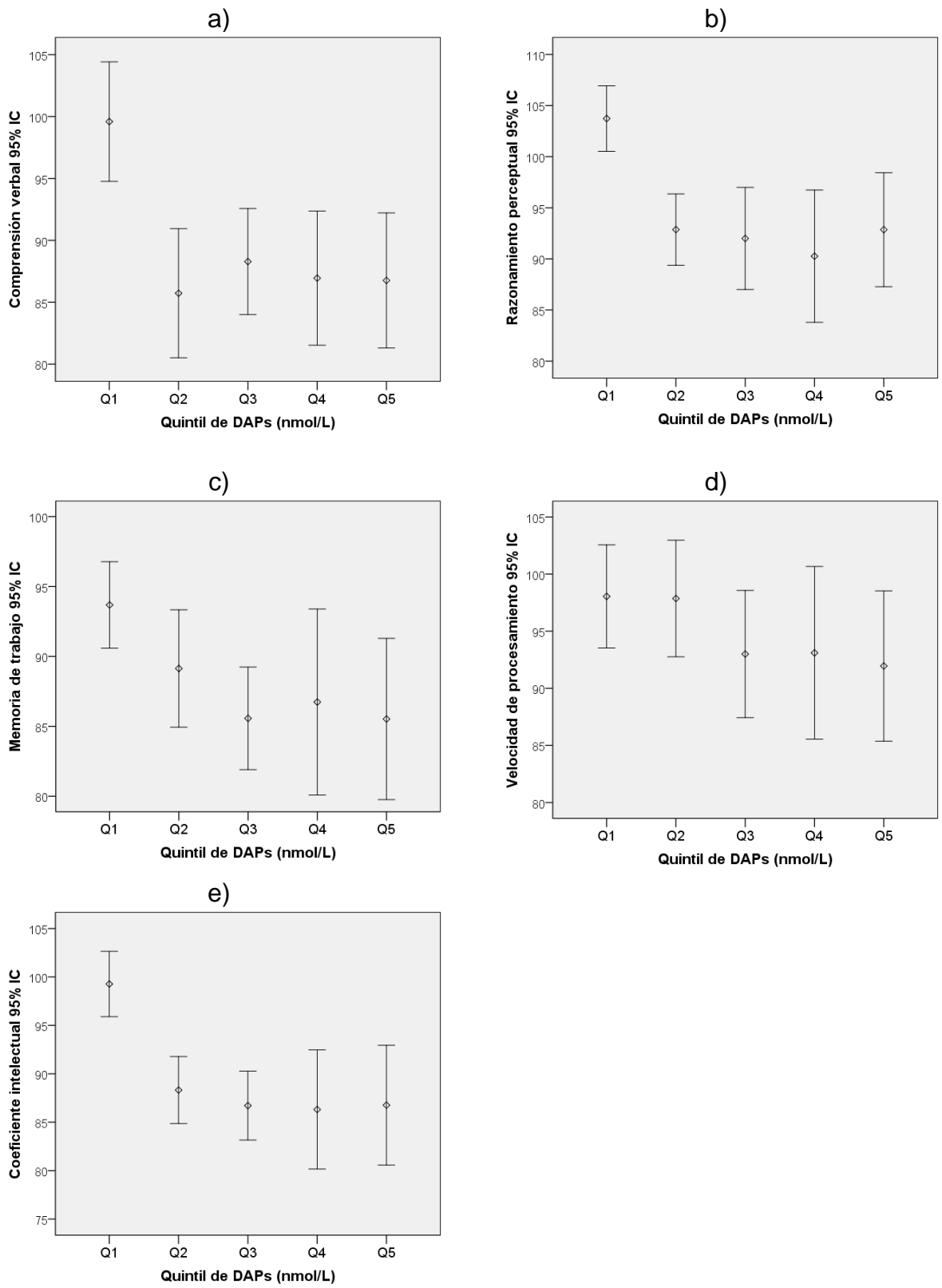


Figura 2

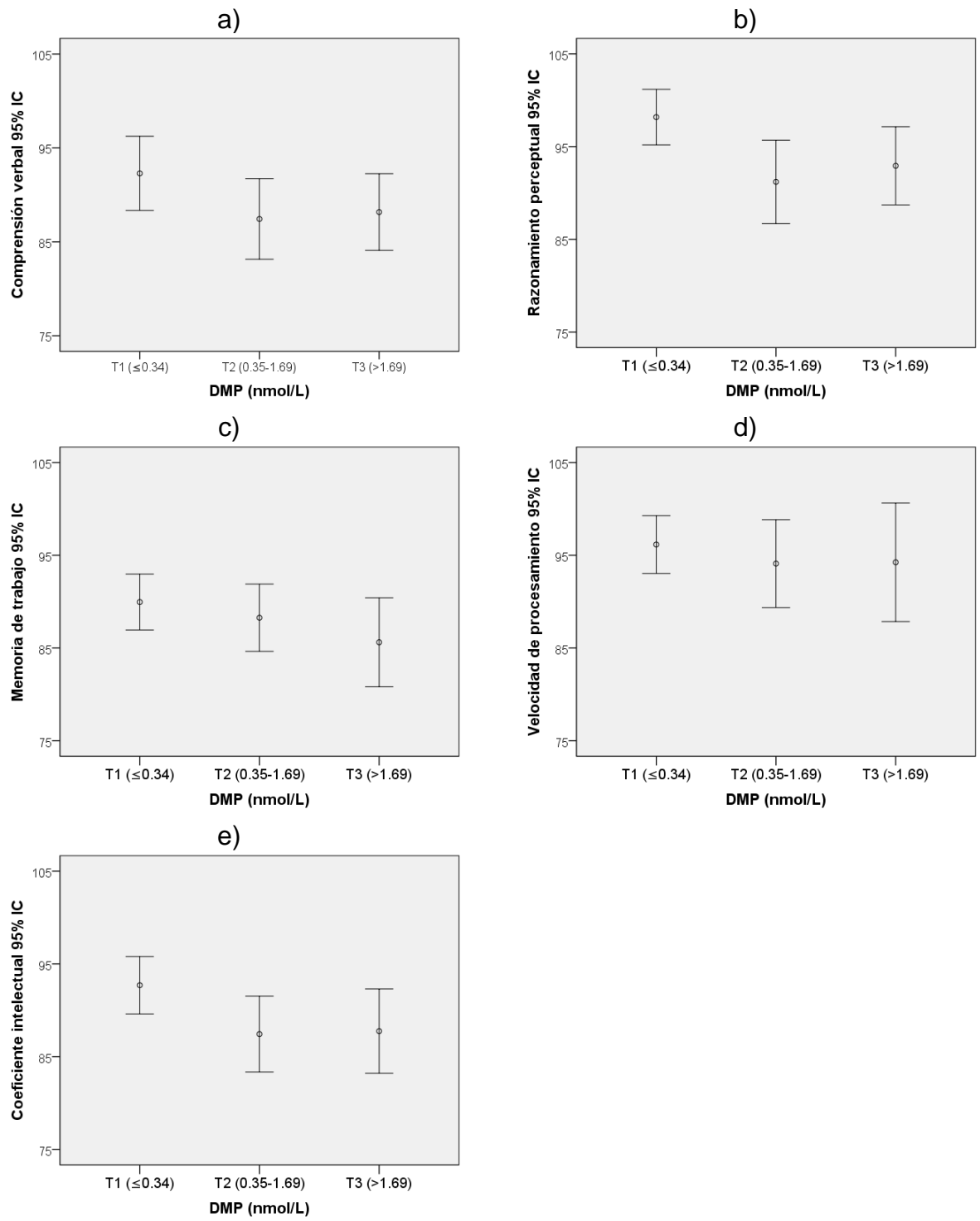


Figura 3

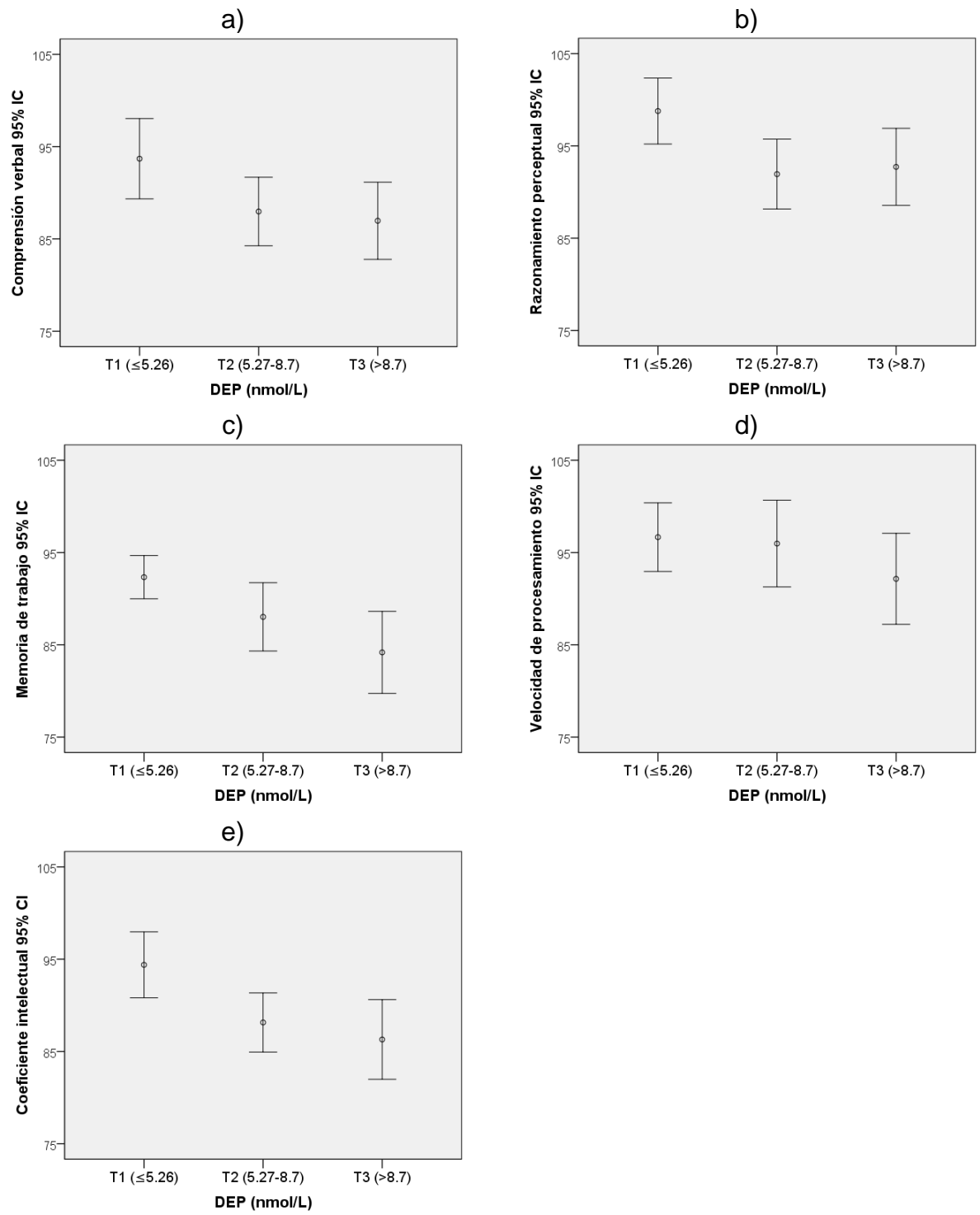


Figura 4

## Conclusiones generales

Con respecto a la implementación y validación del método analítico para la determinación de los metabolitos urinarios dialquilfosfato por CG/EM: El PFBBr fue mejor agente derivatizante que el CIP, bajo las condiciones de temperatura y tiempo de reacción empleada. El método fue confiable y los límites de detección obtenidos fueron lo suficientemente bajos para determinar la exposición a plaguicidas organofosforados en los niños y adolescentes participantes de la localidad de estudio.

Los niños y adolescentes de la localidad agrícola de El Refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, se encuentran expuestos a plaguicidas organofosforados, principalmente metilados, tales como el malatión, dimetoato, azinfos metílico y paratión metílico y en menor grado a los organofosforados etilados (clorpirifos, diazinón y etión). De acuerdo a lo esperado, las concentraciones de metabolitos dialquilfosfato en la orina de los participantes fue mayor en el periodo de alta aplicación de plaguicidas; sin embargo, en el período de baja aplicación las frecuencias de detección y las concentraciones de estos metabolitos fueron importantes. Los resultados de la presente investigación y los obtenidos por otros dos estudios (uno previo y otro reciente) realizados en la misma localidad de estudio, en los cuales también se detectó la presencia de metabolitos dialquilfosfato en la orina de la población participante, indican que los niños y adolescentes de esta localidad, se encuentran expuestos de manera crónica a este tipo de plaguicidas.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos  $PON1_{L55M}$  y  $PON1_{Q192R}$ , obtenidas en la población de estudio fueron similares a las reportadas por otros estudios realizados en población mexicana. Los genotipos predominantes fueron: LL y QR, respectivamente; siendo estos genotipos, los que mayores actividades arilesterasa y paraoxonasa presentaron. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las sumatorias DMPs, DEPs y DAPs y en las concentraciones de los



metabolitos DMP y DEP de acuerdo a los genotipos de los polimorfismos PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub>.

La media del Coeficiente Intelectual (89.6) de los niños y adolescentes del presente estudio estuvo por debajo de los niveles esperados (90-110); siendo el Índice de Memoria de Trabajo, el que presentó menores puntuaciones (media: 88.2). La exposición a plaguicidas organofosforados, estimada por las concentraciones de los metabolitos urinarios dialquilfosfato estuvo asociada con una disminución en el desempeño cognitivo de los participantes. Los niños y adolescentes con las concentraciones mayores de la sumatoria DAPs, presentaron déficits de 12 puntos en el Coeficiente Intelectual comparados con los niños con las concentraciones menores. Con respecto a los metabolitos producidos en la hidrólisis de la forma tóxica (oxón) de los organofosforados; los niños con las concentraciones más altas de DMP y DEP, presentaron una disminución de 8.1 y 11.4 puntos en el coeficiente intelectual, respectivamente, en comparación con los niños con las concentraciones más bajas. Estos resultados sugieren que los niños y adolescentes de localidades agrícolas expuestos a plaguicidas organofosforados, podrían estar en mayor riesgo de presentar alteraciones cognitivas. Para corroborar si estas alteraciones cognitivas son persistentes se sugiere realizar estudios de seguimiento. Por otro lado, se requiere implementar un programa de intervención que ayude a los niños y adolescentes afectados a mejorar su desempeño académico, mediante el uso de técnicas neuropsicológicas adecuadas.

En el presente estudio, no se observó el efecto protector de la paraoxonasa 1 (evaluada mediante la determinación de sus actividades arilesterasa y paraoxonasa y de sus polimorfismos PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub>) sobre la función cognitiva de los niños y adolescentes participantes. Para corroborar estos resultados, se sugiere realizar un estudio de seguimiento con un tamaño de muestra mayor, que permita tener un número suficiente de individuos de cada uno de los genotipos de los polimorfismos

PON1<sub>L55M</sub> y PON1<sub>Q192R</sub>; así como, incluir la determinación de las actividades y polimorfismos de otras enzimas involucradas en el metabolismo de los plaguicidas organofosforados, tales como citocromo P450, glutatión-S-transferasa y otras esterasas, las cuales podrían influir en la susceptibilidad individual hacia la toxicidad de los plaguicidas organofosforados.

## **Anexos**

## A.1 Formato de Consentimiento Informado



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
**LABORATORIO DE GÉNERO, SALUD Y AMBIENTE**  
Av. Venustiano Carranza No. 2405, San Luis Potosí, SLP. 78210  
Tel. Oficina (444) 8262342 al 47 Ext. 6643

No. FOLIO

--	--	--	--

### Consentimiento Informado

Por este conducto solicitamos su aprobación para que su hijo(a) participe en el proyecto: **“INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y DE PON1 SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO Y MOTRIZ EN NIÑOS DE UNA COMUNIDAD AGRICOLA”** el cual estará a cargo de la Dra. Leticia Yáñez Estrada. Este estudio evaluará si sus hijos se encuentran expuestos a los insecticidas organofosforados y que tan susceptibles son a su toxicidad. Los insecticidas organofosforados son compuestos neurotóxicos ampliamente utilizados en la agricultura para combatir algún tipo de plaga.

El proyecto se llevará a cabo en dos periodos de muestreo (considerando las temporadas de menor y mayor aplicación de plaguicidas en su comunidad).

En cada uno de estos periodos se coleccionarán 8 mL de sangre por punción venosa y durante una semana se coleccionará la primera orina de la mañana. Además se registrará el peso y estatura de sus hijos. En la orina se medirá un grupo de metabolitos (llamados dialquifosfatos), que nos permitirá saber si sus hijos se encuentran expuestos a los insecticidas organofosforados. En una de las muestras de sangre se determinará el genotipo y la actividad de la paraoxonasa 1, la cual es una enzima que interviene en la detoxificación de estos plaguicidas dentro del organismo y en la otra muestra de sangre se medirán ciertos parámetros clínicos (biometría hemática, glucosa, perfil lipídico, proteínas totales y albúmina) para evaluar el estado general de salud de sus hijos. La toma de la muestra de sangre podría causar alguna molestia al niño, pero nunca se pondrá en riesgo ni su integridad, ni su salud, ya que será coleccionada por personal especializado y se empleará material nuevo y estéril. Al finalizar el estudio, todas las muestras biológicas (incluyendo las de material genético) que hayan quedado, serán destruidas adicionándoles cloro al 10% y se eliminarán como residuos biológicos.

Por otra parte, en cada uno de los periodos de muestreo, se aplicará un cuestionario con preguntas sobre el estado de salud, dieta y exposición a plaguicidas de su hijo(a). Esta información nos permitirá una mejor interpretación de los resultados del estudio. Adicionalmente un grupo de psicólogos aplicarán una batería de pruebas para evaluar el desempeño cognitivo y motriz de su hijo(a).

Todos los análisis y pruebas serán gratuitos. La información que se obtenga será manejada de manera confidencial y anónima y se les entregará de manera personal. Usted podrá abandonar el estudio libremente cuando así lo consideren pertinente.

Usted podrá obtener beneficios directos, como acceso a talleres sobre el manejo adecuado de plaguicidas y a pláticas informativas sobre diversos temas (riesgos a la salud de los plaguicidas, nutrición y otros temas ambientales y de salud). Además, se obtendrá un beneficio que contribuye a la investigación científica, generando conocimientos sobre la exposición a plaguicidas y su probable asociación con las alteraciones neurológicas en los niños.

El proyecto ha sido aprobado por la Comisión de Bioética de nuestra Institución.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
**LABORATORIO DE GÉNERO, SALUD Y AMBIENTE**  
Av. Venustiano Carranza No. 2405. San Luis Potosí, SLP. 78210  
Tel. Oficina (444) 8262342 al 47 Ext. 6643

**“INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y DE PON1 SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO Y MOTRIZ EN NIÑOS DE UNA COMUNIDAD AGRICOLA”**

Yo (nombre del Padre, la Madre o Tutor) \_\_\_\_\_

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con la Dra. Leticia Yáñez Estrada y comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirar a mi hijo(a) del estudio cuando así lo desee y sin tener que dar explicaciones.

Por lo que presto libremente mi conformidad para que mi hijo(a) participe en este estudio.

Nombre del niño (a): \_\_\_\_\_

Edad del niño(a) : \_\_\_\_\_ Grado escolar: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Estado y Municipio: \_\_\_\_\_

Teléfono(s) : \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del Padre, la Madre o Tutor

\_\_\_\_\_  
Dra. Leticia Yáñez Estrada  
Profesora-Investigadora  
Responsable del Proyecto  
(444) 8262342 al 47 Ext. 6643

Testigo 1 \_\_\_\_\_

Testigo 2 \_\_\_\_\_

## A.2 Formato del cuestionario para evaluar la exposición a insecticidas OP

Metodología integral para la evaluación de la exposición a plaguicidas organofosforados (OPs) en niños de México  
 Hernández R., Villalobos L.



**FACULTAD DE MEDICINA**  
 DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
 Laboratorio de Genética, Salud y Ambiente  
 Av. V. Carranza 2405 Apartado Postal 143  
 Teléfono: 824-22-12 (comunicador), Ext 242, 824-22-02 (fax)  
 78210, San Luis Potosí, México



### Cuestionario general para evaluar la exposición a insecticidas OPs

Folio:

Fecha:  /  /  Localidad:  Refugio, Ciudad Fernández, S.L.P., Méx.

#### I. INFORMACIÓN SOBRE SU HIJO(A)

##### 1. Datos generales

1.1 Nombre:

1.2 Sexo: F (  ) M (  ) 1.3 Fecha y lugar de nacimiento:

1.4 Escuela:  1.5 Grado escolar:

1.6 ¿Ha repetido algún año escolar? Sí (  ) No (  )

1.7 Vive con:  
 Ambos padres  Solo con la madre  Otro(a):

1.8 Domicilio:

1.9 Teléfono:  1.10 Tiempo de residencia:

1.10 ¿El nacimiento del niño fue por?  
 P. normal (  ) Césarea (  )  
 Peso al nacer (kg):  Altura al nacer (cm):   
 Número de hijos:  ¿De cuántos hijos?

1.11 Peso y talla del niño(a) en el momento de la toma de muestra sanguínea.  
 Peso (kg):  Talla (cm):

##### 2. ¿Cuáles de las siguientes vacunas ha recibido su hijo(a)?

Vacuna	( <input type="checkbox"/> )	Fecha
BCG (tuberculosis)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
SABIN (poliomielitis)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
DPT (difteria, tosferina, tétanos)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
Hb (Hepatitis B)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
Hb (Influenza B)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
SRP (sarampión, rubéola, parotiditis)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
Td (tétanos, difteria)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
Antihagatitis B	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>
SR (sarampión, rubéola)	( <input type="checkbox"/> )	<input type="text"/>

Neumococo conjugada ( ) \_\_\_\_\_  
 Hepatitis A ( ) \_\_\_\_\_  
 Varicela ( ) \_\_\_\_\_  
 Otra(s) ( ) \_\_\_\_\_

**3. Padecimientos de su hijo(a):**

Diabetes ( )	Deficiencias visuales ( )
Hipertensión ( )	Problemas de audición ( )
Cáncer ( )	Incapacidad física ( )
Hipotiroidismo ( )	Enfermedades del sistema nervioso ( )
Enfermedades del corazón ( )	Convulsiones ( )
Enfermedades del riñón ( )	Dolor de cabeza ( )
Enfermedades gastrointestinales ( )	Problemas de aprendizaje y memoria ( )
Parositos intestinales ( )	Problemas de conducta (inquieto, distraído) ( )
Alergias oculares o dérmicas ( )	Problemas de coordinación ( )
Problemas respiratorios (asma, tuberculosis) ( )	Anemia, desnutrición ( )
Raafinado común, gripe ( )	Drogadicción ( )
Dolor de garganta ( )	Otra(s) ( )
Malformaciones ( )	_____ ( )
Síndrome de Down ( )	

**4. Alimentación de su hijo(a)**

Su hijo(a) come:	¿De cual?	De la región	Tamaño de la ración	Veces al día	Veces por semana	Veces por mes
Leche ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Derivados lácteos ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
(queso, yogur, crema)						
Carne ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Pescado ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Alón enlatado ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Huevo ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Frutas ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Verduras ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Cereales (avena, arroz) ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Leguminosas (frijol) ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Embutidos ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Frituras y golosinas ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____
Otra(s) ( )	_____	( )	_____	_____	_____	_____

**5. ¿Su hijo(a) tiene o ha tenido?**

	¿Cuándo?	Le dio tratamiento con:
Piojos ( )	_____	Insecticida ( ) _____ Shampoo ( ) _____ Otro(s) ( ) _____
Sarna o escabiosis ( )	_____	Insecticida ( ) _____ Medicamento ( ) _____ Otro(s) ( ) _____

**6. Intoxicaciones:**

6.1 ¿Su hijo(a) ha tenido intoxicaciones por consumo de alimentos contaminados? No ( ) Si ( )  
 ¿A qué? \_\_\_\_\_  
 ¿Cuándo? \_\_\_\_\_ ¿Dónde? \_\_\_\_\_  
 Tratamiento: \_\_\_\_\_

6.2 ¿Su hijo(a) ha tenido intoxicaciones por insecticidas? No ( ) Si ( )  
 ¿A qué? \_\_\_\_\_  
 ¿Cuándo? \_\_\_\_\_ ¿Dónde? \_\_\_\_\_  
 Tratamiento: \_\_\_\_\_

6.3 ¿Ha tenido contacto su hijo(a) en el último mes con plaguicidas u otras sustancias químicas?  
 No ( ) Sí ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

7. ¿Qué tipo de accidentes ha tenido su hijo(a) en su casa o en la calle?

Cortadas profundas.	( )	Intoxicación por gas.	( )
Torceduras y/o fracturas.	( )	Golpes.	( )
Quemaduras.	( )	Caídas.	( )
Introducción de cuerpos extraños en oído, nariz y/o boca.	( )	Mordeduras picaduras de animales.	( )
Lesión por objetos punzocortantes.	( )	Otro(a)	( )
		_____	( )

8. Actividades de su hijo(a):

8.1 ¿Dónde pasa su hijo(a) la mayor parte del tiempo?	Horas al día	Días a la semana
En la huerta o parcela ( )		
En el establo ( )		
En la lechilera ( )		
Otro(a) _____		

8.2 ¿El niño(a) acompaña a los padres o algún otro familiar? en:	Veces por semana	Desde que edad
La huerta o parcela ( )		
El establo ( )		
A llevar a pastar al ganado ( )		
A la lechilera ( )		
Otro(a) _____		

8.3 ¿El niño trabaja o ayuda a los padres o algún otro familiar? en:	A:	Veces por semana	Desde que edad
La huerta o parcela ( )			
El establo ( )			
A llevar a pastar al ganado ( )			
A la lechilera ( )			
Otro(a) ( )			

III. INFORMACIÓN DE LOS PADRES O TUTORES Y ANTECEDENTES FAMILIARES

1. Información de la madre:

1.1 Nombre: \_\_\_\_\_ 1.2 Edad: \_\_\_\_\_

1.3 Nivel escolar:  
 Ninguno ( ) Secundaria ( ) Técnico ( )  
 Primaria ( ) Preparatoria ( ) Profesional ( )

1.4 ¿Durante el embarazo permaneció en esta comunidad? Sí ( ) No ( )

1.5 ¿Mientras estuvo embarazada aplicaron insecticidas en su casa? Sí ( ) No ( )



- 1.6 ¿Fumó durante el embarazo? Sí ( ) No ( )
- 1.7 ¿Tomó alcohol durante el embarazo? Sí ( ) No ( )
- 1.8 ¿Tuvo problemas durante el embarazo? Sí ( ) No ( )

- 1.9 ¿Tuvo problemas durante el parto? Sí ( ) No ( )

- 1.10 ¿Le dio seno materno a su hijo(s)? Sí ( ) Meses: \_\_\_\_\_ No ( )

1.11 Ocupación actual:

	Antigüedad	Especificar que hace:
Agricultor/jornalero ( )	_____	_____
En un establo ( )	_____	_____
En una lechilera ( )	_____	_____
Otros ( )	_____	_____
Regador/colector de basura ( )	_____	_____
Empleado doméstico ( )	_____	_____
Ama de casa ( )	_____	_____
Otra(s) _____ ( )	_____	_____

- 1.12 Si su ocupación actual es menor de 5 años indicar su ocupación anterior \_\_\_\_\_

- 1.13 ¿La madre ha tenido contacto en el último mes con plaguicidas u otras sustancias químicas?

No ( ) Sí ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

2. Información del padre:

- 2.1 Nombre: \_\_\_\_\_ 2.2 Edad: \_\_\_\_\_

2.3 Nivel escolar:

Ninguno ( ) Secundaria ( ) \_\_\_\_\_ Técnico ( ) \_\_\_\_\_  
 Primaria ( ) \_\_\_\_\_ Preparatoria ( ) \_\_\_\_\_ Profesional ( ) \_\_\_\_\_

3

2.4 Ocupación actual:

	Antigüedad	Especificar que hace:
Agricultor/jornalero ( )	_____	_____
En un establo ( )	_____	_____
En una lechilera ( )	_____	_____
Fumigador ( )	_____	_____
Otros ( )	_____	_____
Regador/colector de basura ( )	_____	_____
Otra(s) _____ ( )	_____	_____

- 2.5 Si su ocupación actual es menor de 5 años indicar su ocupación anterior \_\_\_\_\_

- 2.6 ¿El padre ha tenido contacto en el último mes con plaguicidas u otras sustancias químicas?

No ( ) Sí ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

3. Antecedentes familiares:

- 3.1. A parte de los padres, indique la ocupación de otros familiares que vivan con el niño:

	Antigüedad	Especificar que hace:
Agricultor/jornalero ( )	_____	_____
En un establo ( )	_____	_____
En una lechilera ( )	_____	_____

Fumigador ( ) \_\_\_\_\_  
 Repentador/colector de basura ( ) \_\_\_\_\_  
 Otra(s) ( ) \_\_\_\_\_

**3.2 Padecimientos o enfermedades familiares:**

Diabetes	( )	Enfermedades del sistema nervioso	( )
Hipertensión	( )	Convulsiones	( )
Cáncer	( )	Dolor de cabeza.	( )
Hipotiroidismo	( )	Enfermedades mentales	( )
Enfermedades del corazón	( )	Incapacidad física	( )
Enfermedades del riñón	( )	Problemas respiratorios (asma, tuberculosis)	( )
Enfermedades gastrointestinales	( )	Resfriado común, gripe	( )
Parásitos intestinales	( )	Dolor de garganta.	( )
Alergias oculares o dérmicas	( )	Alcoholismo	( )
Malformaciones	( )	Otro(s)	( )
Síndrome de Down	( )	_____	

3.3. ¿Algún integrante de la familia fuma dentro de la casa? No ( ) Si ( ) \_\_\_\_\_  
 Número de cigarrillos: Al día \_\_\_\_\_ A la semana \_\_\_\_\_ Al mes \_\_\_\_\_

3.4 ¿Algún integrante de la familia ha tenido contacto en el último mes con plaguicidas u otras sustancias químicas?

No ( ) Si ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

**4. Si la ocupación de alguno de los padres o algún otro familiar se relaciona con la agricultura y/o ganadería, conteste las siguientes preguntas:**

4.1 Las parcelas y/o huertas en que labora son propiedad de: Usado ( ) De otros ( ) \_\_\_\_\_

4.2 ¿Que cultivos siembra en la parcela o huerta?

Cultivo	¿Cuántos?	Ciclo o régimen*	Necléanos
Granos ( )	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
Citrinas ( )	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
Hortalizas ( )	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
Otro(s) ( )	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____
	_____	PV ( ) CI ( ) P ( ) R ( ) T ( )	_____

\*PV = Primavera-Verano, CI = Otoño-Invierno, P = Todo el año, R = Riego, T = Temporal.

4.3 ¿Qué tipo de ganado tiene?

Ganado	Número de cabezas	Destino de la producción, para:
Vacas ( )	_____	Leche ( ) Carne ( ) Otro( ) _____
Cabras ( )	_____	Leche ( ) Carne ( ) Otro( ) _____

Cerdo ( ) \_\_\_\_\_ Carne ( ) Otro( ) \_\_\_\_\_  
 Aves ( ) \_\_\_\_\_ Carne ( ) Otro( ) \_\_\_\_\_  
 Otro(s) ( ) \_\_\_\_\_

4.4 El destino de los cultivos y/o ganado es para:

Cultivos		Ganado	
Consumo de la familia	( )	Autoconsumo	( )
Como forraje para el ganado	( )	Venta de leche en la comunidad	( )
Venta en la comunidad	( )	Venta de carne en la comunidad	( )
Otra _____	( )	Otra _____	( )

4.5 ¿Qué tipo de plagas han afectado sus cultivos o ganado? \_\_\_\_\_

4.6 ¿Qué tipo de agroquímicos usa para el control de las plagas en la parcela, huerta o en el ganado?

Nombre/ingrediente activo	Presentación L ( ) P ( ) O ( )	Consumo al año	Frecuencia	
			Max	Año
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			
	L ( ) P ( ) O ( )			

L: líquido, P: polvo, O: otro(s).

4.7 ¿Cuenta con las fichas técnicas u hojas de datos de seguridad de los insecticidas que aplica?

SI ( ) No ( )

4.8 ¿Dónde compra los insecticidas? Tienda de Agroquímicos ( ) Tienda de forrajes ( ) Veterinaria ( )

Otro(s) ( ) lugar(es) \_\_\_\_\_

4.9 ¿Quién le dice que tipo de agroquímicos (insecticida, herbicida, etc.) debe usar y cada cuando los debe aplicar? Usted mismo ( ) Empleado de tienda de agroquímicos o veterinaria ( ) ( ) Agrónomo

Otro(s) ( ) \_\_\_\_\_

4.10 ¿Quien aplica los insecticidas, herbicidas, etc.?

Lo aplica:	¿Cómo los aplica?	Equipo de protección personal que usa:
Usted mismo ( )	Manualmente ( )	Ninguno ( ) Overol ( ) Mascarilla ( )
	Con bomba aspiradora ( )	Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( )
	Avioneta ( )	Otro(s) _____
	Otra ( )	

Lo aplica:	¿Cómo los aplica?	Equipo de protección personal que usa:
Su hijo(a) ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Gafas ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(a) _____
Empleado de tienda de agroquímicos o veterinaria ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Gafas ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(a) _____
Ingeniero agrónomo ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Gafas ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(a) _____
Otro(a): ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Gafas ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(a) _____
¿Quién?		

4.11 Después de su jornada laboral ¿Dónde se cambia de ropa y de calzado? En la milpa ( ) Al llegar a casa ( )  
 En otro lugar ( ): \_\_\_\_\_ No se la cambia ( )

4.12 ¿Dónde lavan la ropa con residuos de insecticidas? En su casa junto con la demás ropa ( )  
 En su casa separada de la demás ropa ( ) En la milpa ( ) En otro lugar ( ): \_\_\_\_\_

4.13 ¿Dónde almacena los insecticidas, herbicidas, etc. que utiliza? En la milpa ( )  
 En su casa ( ), en: \_\_\_\_\_ Otro lugar ( ): \_\_\_\_\_

4.14 Cuando se terminan los agroquímicos ¿Qué hace con los recipientes?  
 Los tira en la basura ( ) Los entierra ( ) Los quema ( )  
 Los reutiliza ( ) para: \_\_\_\_\_ Otro(a) ( ): \_\_\_\_\_

4.15 El agua de riego que utiliza proviene de: Pozo ( ) Río ( ) \_\_\_\_\_  
 Agua negra ( ) Agua tratada ( ) Otro(a) fuente(a) ( ): \_\_\_\_\_

4.16 ¿Al final de la cosecha que hace con el rastrojo? Lo quema en la milpa ( )  
 Lo usa como forraje para el ganado ( ) Lo usa como combustible en su casa ( )  
 Otro(a) ( ): \_\_\_\_\_

4.17 ¿Ha tenido contacto en el último mes con plaguicidas u otras sustancias químicas en su trabajo?  
 No ( ) Sí ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

5. Si alguno de los padres o algún otro familiar trabaja en una ladrillera, indique:  
 ¿Qué tipo de materiales quema en la ladrillera? Leña ( ) Gas ( ) Plásticos ( ) Aceites ( )  
 Carbón ( ) Resaca ( ) Otro ( ) \_\_\_\_\_

### III. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

1. La casa donde vive el niño(a) y su familia es:  
 Propia ( ) Rentada ( ) Prestada ( ) Otra ( ) \_\_\_\_\_  
 ¿Cuántas personas viven en la casa? Niños: \_\_\_\_\_ Adultos: \_\_\_\_\_

Edad	Menores de 3 años	Entre 3 y 6 años	Entre 6 y 12 años	Entre 13 y 20 años	Entre 21 y 60 años	Mayores de 60 años
Mujeres						
hombres						

2. ¿Las calles alrededor de la casa del niño se encuentran? Pavimentadas ( ) Sin pavimentar ( )

3. ¿De qué materiales está construida su casa?

	Madera	Adobe	Ladrillo	Cemento	Otros (especifique)
Paredes	( )	( )	( )	( )	( ) _____
Techo	( )	( )	( )	( )	( ) _____
Piso	( )	( )	( )	( )	( ) _____

4. ¿Cuántas habitaciones tiene su casa (sin incluir el baño)? : \_\_\_\_\_

Especifique número de:

Recamaras	_____	Cocina	_____	Sala-comedor	_____
Baño	_____	Otro(s)	_____		

5. ¿Su casa cuenta con servicio de? Agua de grifo ( ) Luz eléctrica ( ) Drenaje ( )  
 Sanitarias ( ) Agua embotellada ( )

6. ¿Cuál es la distancia de la escuela de su h(j)o(s) a su casa? en Cuadras: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

7. ¿Cerca de la casa donde viven su h(j)o(s) existen?

Panizas o	( )	A que distancia:	_____
huertas	( )	A que distancia:	_____
Galabos	( )	A que distancia:	_____
Resaca	( )	A que distancia:	_____
Ladreras	( )	A que distancia:	_____
Fábricas	( )	Especificar:	_____
Otro(s)			

8. El ingreso mensual de la familia es de:

0 a 500 pesos ( ) 501 a 1000 pesos ( ) 1001 a 2000 pesos ( ) Más de 2000 pesos ( )

9. ¿Para cocinar usa? Trastes de barro: Si ( ) No ( )  
 Combustibles: Gas ( ) Carbón ( ) Petróleo ( ) Leña ( ) Otro(s) ( )

10. ¿Cuándo cocina está presente su h(j)o(s)? No ( ) Si ( )

11. ¿Qué hacen con la basura? Se la lleva al camión de la basura ( ) La queman ( ) La entierran ( )  
 La tiran a la calle ( ) Otro(s) \_\_\_\_\_

12. ¿Qué tipo de plagas de insectos hay o ha habido en su casa?

Cucarachas ( ) Gorgojos ( ) Pulgas ( ) Chinches ( ) Otro(s) \_\_\_\_\_ Ninguna ( )

13. ¿Qué insecticidas domésticos (Reid, Oxo, otros) aplica dentro de su casa, patios y jardines para la eliminación de plagas de insectos?

Nombre/Ingrediente activo:	Presentación			Frecuencia de uso por	
	Spray ( )	Líquido ( )	Otro ( )	Mes	Año
_____	( )	( )	( )	_____	_____
_____	( )	( )	( )	_____	_____
_____	( )	( )	( )	_____	_____
_____	( )	( )	( )	_____	_____

14. ¿Quién aplica los insecticidas en su casa?

Lo aplica:	¿Cómo los aplica?	Equipo de protección personal que usa:		
Unidad misma ( )	Manualmente ( )	Ninguno ( )	Overol ( )	Mascarilla ( )
	Con bombas aspiradora ( )	Lintas ( )	Gaunters ( )	Botas ( ) Casco ( )
	Avioneta ( )	Otro(s) _____		
	Otra ( )			

Lo aplica:	¿Cómo los aplica?	Equipo de protección personal que usa:
Su(s) hijo(s)(a) ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Overol ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(s) _____
Empleado de tienda ( ) de agroquímicos o veterinaria ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Overol ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(s) _____
Otro(s): ( )	Manualmente ( ) Con bomba aspersora ( ) Avioneta ( ) Otra ( )	Ninguno ( ) Overol ( ) Mascarilla ( ) Lentes ( ) Guantes ( ) Botas ( ) Casco ( ) Otro(s) _____

15. ¿Después de que aplica insecticidas dentro de su casa, que tiempo espera usted y su familia antes de volver a entrar a la casa?

Ninguno (entra inmediatamente a la casa) ( ) Menos de una hora ( ) De 1-2 horas ( )  
De 3 a 5 horas ( ) Otro ( ) \_\_\_\_\_

16. ¿Hay mascotas en su casa? No ( ) Si ( )

¿Se encuentran vacunados? No ( ) Si ( ) ¿Los lleva al veterinario? No ( ) Si ( )

En caso de pulgas u otra plaga ¿Qué les aplica? \_\_\_\_\_  
 En caso de sarna ¿Qué les aplica? \_\_\_\_\_

17. ¿Cada cuando ha notado que hay fumigaciones con avioneta en su comunidad?

Cada mes ( ) Cada 3 meses ( ) Cada 6 meses ( ) Cada año ( ) Cada 5 años ( ) Nunca ( )  
 ¿En dónde? Cerca de su casa ( ) Cerca de la escuela ( ) Otras ( ) \_\_\_\_\_

18. ¿El personal de salud pública de control de dengue y paludismo ha aplicado insecticidas en su casa?

Cada mes ( ) Cada 3 meses ( ) Cada 6 meses ( ) Cada año ( ) Cada 5 años ( ) Nunca ( )

19. ¿Qué insecticidas ha aplicado el personal de salud pública de control de dengue y paludismo en su casa y/o depósito de agua?

Nombre/Ingrediente activo:	Presentación	Frecuencia de uso por Mes	Año
_____	Egny ( ) Líquido ( ) Otro ( )	_____	_____
_____	Egny ( ) Líquido ( ) Otro ( )	_____	_____
_____	Egny ( ) Líquido ( ) Otro ( )	_____	_____
_____	Egny ( ) Líquido ( ) Otro ( )	_____	_____

20. ¿Después de que el personal de salud pública de control de dengue y paludismo ha aplicado insecticidas, que tiempo espera usted y su familia antes de volver a entrar a la casa?

Ninguno (entra inmediatamente a la casa) ( ) Menos de una hora ( ) De 1-2 horas ( )  
De 3 a 5 horas ( ) Otro ( ) \_\_\_\_\_

21. ¿Cuáles son los principales problemas y peligros que percibe en su comunidad?

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 TUTOR DEL NIÑO(A):  
 NOMBRE Y FIRMA

\_\_\_\_\_  
 ENCUESTADOR(A):  
 NOMBRE Y FIRMA