



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA, ENFERMERIA,  
NUTRICIÓN Y TECNOLOGIA MÉDICA**



**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA CITOCROMO P 450 (CYP1A1) Y SU RELACIÓN  
CON EL DAÑO AL DNA EN AGRICULTORES EXPUESTOS A PLAGUICIDAS**

**TUTORA: Dra. NOEMI TIRADO BUSTILLOS MSc.**

**POSTULANTE A LICENCIATURA EN BIOQUIMICA:**

**MONROY CUBA NORBERTO OMAR**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2011**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA**

**TESIS DE GRADO**



**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA CITOCROMO P 450 (CYP1A1) Y SU RELACIÓN  
CON EL DAÑO AL DNA EN AGRICULTORES EXPUESTOS A PLAGUICIDAS**

**POSTULANTE:**

**NORBERTO OMAR MONRROY CUBA**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2011**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA, ENFERMERÍA, NUTRICIÓN Y  
TECNOLOGÍA MÉDICA

CARRERA DE BIOQUÍMICA

**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA CITOCROMO P  
450 (CYP1A1) Y SU RELACIÓN CON EL DAÑO AL  
DNA EN AGRICULTORES EXPUESTOS A  
PLAGUICIDAS**

**TESIS DE GRADO**

POSTULANTE:

Norberto Omar Monrroy Cuba

ASESORA:

Noemi Tirado Bustillos, MSc.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ – BOLIVIA

2011

**Para los seres más sublimes que Dios me regalo, a mi Mamá y Papá que siempre me brindaron su apoyo incondicional durante toda mi vida. Muchas gracias.**

**Agradecimiento especial:**

**A la Dra. Noemí Tirado ya que sin sus conocimientos, apoyo y colaboración no se podría haber realizado este trabajo, y a todos los que forman parte del Instituto de Genética que me abrió sus puertas.**

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>5</b>
<b>3. MARCO TEORICO.....</b>	<b>5</b>
3.1. Plaguicidas (pesticidas biocidas).....	5
3.2. Los plaguicidas se dividen en dos grandes grupos de riesgo.....	6
3.2.2. Síntomas de intoxicación.....	7
3.2.3. Plaguicidas órgano fosforados. Grupo 2.....	7
3.3. Clasificación.....	9
3.3.1. Según el destino de su aplicación .....	9
3.3.2. Según su acción específica.....	9
3.3.3. Según el estado de presentación.....	10
3.3.4. Según su constitución química.....	10
3.3.5. Según su grado de peligrosidad para las personas.....	10
3.4. Usos de los plaguicidas.....	11
3.4.1. Efectos ambientales.....	11
3.4.2. Efectos en la salud.....	12
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
4.1. Plaguicidas en Bolivia.....	13
4.1.1. Casos.....	16
4.1.2. Ingreso por contrabando.....	18
4.2. Movimiento y destino de los plaguicidas en el ambiente.....	18
4.2.1. Volatilización.....	19
4.2.2. Lixiviación.....	20
4.2.3. Escurrimiento.....	20
4.3. Tipos de intoxicación de los plaguicidas.....	21
4.4. Efectos de los plaguicidas en la salud.....	21
4.4.1. Efectos reproductivos.....	21
4.4.2. Acción cancerígena.....	23
4.4.3. Acción mutagénica.....	23
4.5. Genética toxicológica.....	23

4.5.1. Efectos Adversos de las Mutaciones y Mutagenesis.....	24
4.5.2. Biomonitorización de poblaciones expuestas a agentes genotóxico.....	25
4.5.3. Tipos de marcadores genéticos.....	25
4.5.4. Biomarcadores como indicadores de riesgo genético.....	26
4.5.5. Biomarcadores de exposición.....	26
4.5.6. Biomarcadores de efecto.....	27
4.5.6.1. Ensayo del cometa.....	28
4.5.7. Biomarcadores de susceptibilidad.....	32
4.5.7.1. Los polimorfismos.....	32
4.5.7.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.....	34
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
5.1. Objetivo General.....	36
5.2. Objetivos Específicos.....	36
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>37</b>
6.1. Diseño metodológico del estudio.....	37
6.2. Universo y/o población de estudio.....	37
6.3. Técnicas de instrumentos de recolección de datos.....	37
6.4. Métodos.....	38
6.4.1. Encuesta.....	38
6.4.2. Obtención de las muestras.....	38
6.4.2.1. Evaluación de daño genotóxico.....	38
6.4.3. Polimorfismos CYP1A1.....	43
6.4.4. Protocolo del Ensayo del Cometa.....	45
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
7.1. Estadística descriptiva de la población de estudio.....	48
7.2. Efecto genotóxico por el ensayo del cometa por registro visual.....	58
7.3. Polimorfismos de la citocromo p 450.....	59
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>100</b>
8.1. Biomarcadores de efecto.....	111
8.2. Biomarcadores de susceptibilidad.....	111
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## RESUMEN

Los plaguicidas se usan en la agricultura para proteger los cultivos, y al mismo tiempo representan un riesgo potencial para los agricultores y el medio ambiente. En los Municipios de Sapahaqui y Luribay, el 90% de la población se dedica a la agricultura y utilizan diferentes agroquímicos y plaguicidas para la producción de sus cultivos, donde el manejo de estos productos es de forma empírica, sin equipos de protección personal.

En el presente trabajo se realizó un estudio de biomonitorio humano, empleando biomarcadores de efecto para medir el daño en el DNA (cometa) y biomarcadores de susceptibilidad polimorficos (CYP1A1) por la exposición a plaguicidas. La población en estudio fue de 92 personas de ambos sexos, entre las edades 16 y 80 años, entre personas expuestas (agricultores) y controles.

Las sustancias cancerígenas pueden provenir de los alimentos, drogas u otro tipo de sustancias químicas que ingresan al cuerpo o de sustancias endógenas. Los individuos que cargan la forma más activa de una enzima relacionada con la activación de los carcinógenos, o los alelos menos eficientes de las enzimas de desintoxicación, podrían presentar un mayor riesgo de desarrollar cáncer.

Actualmente las principales enzimas conocidas involucradas en el metabolismo de sustancias cancerígenas pertenecen a las familias citocromo P 450 y GST. El gen CYP1A1 codifica para el Citocromo P 450 y se considera un candidato marcador de susceptibilidad frente a la exposición de contaminantes ambientales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Las formas raras mutadas en homocigosis de tres polimorfismos confieren al individuo que las porta un alto riesgo de mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis. La biotransformación juega un papel importante en la actividad cancerígena y la especificidad de órgano de carcinógenos ambientales.

Gran variación interindividual en la biotransformación se ha reportado, y los polimorfismos genéticos en las enzimas que metabolizan algunos Xenobioticos pueden explicar en parte algunas de estas diferencias. La concentración del carcinógeno final, que reaccionan con el ADN, se determina por la tasa de activación y desintoxicación.

Los hallazgos confirman la utilidad de determinar los polimorfismos de las enzimas de detoxificación como marcadores de susceptibilidad en poblaciones expuestas que constituye un factor importante para determinar la magnitud del riesgo de tener enfermedades crónicas degenerativas. Así como la importancia del ensayo del cometa para la realización de estudios de biomonitorio humano para evaluar daño genotóxico.



## **CAPITULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Se entiende por plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la cual se pretende prevenir, destruir, repeler o atenuar alguna plaga, entendiéndose por ésta a cualquier organismo que interfiera el bienestar de la especie humana u otra especie de su interés.

Ya en 1973 el Doctor Mostafá Kamal Tolba, Director Ejecutivo del PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente) decía: ¿El uso en gran escala de plaguicidas para proteger cosechas y para destruir los insectos vectores de enfermedades, abre perspectivas inquietantes en cuanto a la posibilidad de efectos cancerígenos a largo plazo?

En la actualidad se calcula que el 80% de las ventas globales de estos productos se consume en los países desarrollados, mientras que en los países subdesarrollados se consume el 20 % restante. Lo curioso es que dentro de estos últimos se registra el 75% de las muertes por contaminación por agroquímicos.

En 1995, la Red de Acción Contra Plaguicidas (PAN) anunció que productos agrotóxicos prohibidos en su país de origen se utilizaban intensamente en los países del tercer mundo, causando 15.000 muertes al año. Esta enorme incidencia de muerte se debe a varias causas; nivel educacional insuficiente, carencia de seguridad en el manejo de agroquímicos, ingesta de alimentos contaminados por ellos, entre otras.

El impacto ambiental provocado por los pesticidas afecta a todos los seres vivos y no sólo a las denominadas plagas. Al persistir en el ambiente mucho tiempo después de su aplicación, su concentración puede llegar a incrementarse provocando nocivas para el hombre y la naturaleza. (Santivañez T. y col. 2005).

La población en general puede encontrarse expuesta a este tipo de contaminación, no sólo por la degradación del suelo, aire o agua, sino también por el uso doméstico de plaguicidas que provocan constantes intoxicaciones en adultos y sobre todo en niños.

No debe dejarse de lado tampoco, por su importancia, la exposición ocupacional que puede presentarse durante la elaboración, formulación y envasado, almacenamiento, transporte y aplicación de estas sustancias.

Un estudio realizado por Huici y col.(2001), En las poblaciones de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca se ha observado que el 73% de los productores manejan estos plaguicidas de forma empírica, sin respetar las dosis adecuadas o recomendadas (86%), sin equipos de protección personal (80%).

En la misma población el estudio de riesgo genotóxico realizado por Ascarrunz ME y col.(2006), se observó una elevada frecuencia de parámetros del cometa, micronúcleos y otros biomarcadores como ser intercambios entre cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas, por lo tanto, existe un aumento de la probabilidad de que los trabajadores agrícolas expuestos a estos agentes tengan daño genotóxico.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En América Latina, el uso de plaguicidas ha causado la intoxicación y muerte de muchas de personas y muchos de ellos niños. A esto se agrega el problema de la intoxicación crónica, que provoca graves enfermedades, como cáncer, malformaciones congénitas y alteraciones a los sistemas inmunológico, neurológico y reproductivo, entre otros.

Se realizó una prueba piloto en los Municipios de Sapahaqui y Luribay, junto con el Proyecto PLAGBOL, a través de una encuesta, se ha evidenciado que la mayoría de los agricultores no utilizan protección personal, ni hábitos higiénicos para el manejo de los plaguicidas, los productores manejan estos plaguicidas de forma empírica, realizando mezclas indebidas, sin respetar las dosis adecuadas o recomendadas, sin equipos de protección personal y a esto se adiciona el problema ambiental por la eliminación de los envases de forma incorrecta ocasionando la contaminación de fuentes de agua, por lo tanto se ha visto la necesidad de realizar estudios de biomonitorio, desde el punto de vista del daño genotóxico ocasionado por la exposición a plaguicidas, y otros factores de riesgo que pueden ocasionar en esta población el aumento de la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer. (Ascarrunz M.E. y col).

La familia del Citocromo p450 se sabe que es importante en el metabolismo de varios xenobióticos, tales como aminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos. La constitutiva e inducible expresión del CYP1A1 se considera como un importante determinante de la carcinogénesis, aunque la exacta relación entre la expresión de citocromo p450 (CYP) químicamente inducidos a carcinogénesis está todavía por determinar. (Laffon B. y col 2005).

## **CAPITULO II**

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Plaguicidas (pesticidas biocidas)**

Se entiende por plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la cual se “pretende prevenir”, destruir, repeler o atenuar alguna plaga, entendiéndose por ésta a cualquier organismo que interfiera el bienestar de la especie humana u otra especie de su interés. (Lara G. y col 2003). Entre otros contaminantes ambientales, los plaguicidas han sido llamados alguna vez "venenos útiles", sin medir los riesgos que comienzan con su manipulación y por distintos caminos llegan al hombre. La búsqueda de soluciones profundizó la investigación de agroquímicos no tóxicos, que reduzcan los riesgos, estableciendo técnicas de prevención científicamente seleccionadas y probadas, la del "control biológico de plagas". (Mudry M.2007).

Las soluciones de recambio de lo tradicional por lo sustentable es lenta, mientras tanto hay objetivos a seguir:

\*Reducir el impacto sobre el medio ambiente y la salud de los pobladores rurales que derivan de una incorrecta manipulación de los plaguicidas.

\*Alertar sobre la peligrosidad a corto y largo plazo de una aplicación indiscriminada de agrotóxicos.

\*Reconocer los efectos adversos sobre los recursos naturales.

\*Ofrecer alternativas ecológicas para el control de plagas sobre animales y vegetales destinados al consumo humano. La problemática de los pesticidas no está aislada sino

inserta dentro de la crisis global que afecta al medio ambiente. El gran reto es lograr niveles de excelencia de producción preservando los recursos naturales y, por consiguiente, la calidad de la vida de la población humana del planeta.

En la actualidad se calcula que el 80% de las ventas globales de estos productos se consume en los países desarrollados, mientras que en los países subdesarrollados se consume el 20 % restante. (Márquez ME. Y col 2003).

### **3.2. Los plaguicidas se dividen en dos grandes grupos de riesgo.**

- a) Grupo 1 están los que actúan sobre determinados organismos: insecticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas, raticidas, etc.
- b) Grupo 2 está determinado por la estructura química de las sustancias con actividad plaguicida que los componen.

Existen varias vías de intoxicación:

- Oral
- Inhalación del producto
- Dérmica por penetración a través de la piel
- Ingesta de alimentos contaminados

En la alimentación, las hortalizas, las frutas, los cereales, carnes, huevos y lácteos pueden ser vehículos de intoxicación.

#### **3.2.1. Plaguicidas organoclorados. Grupo 1**

Grupo de compuestos de estructura química muy variada que en común tienen la presencia de **CLORO** en su molécula. Compuestos que una vez en el organismo humano, se alojan en órganos ricos en grasas.

**3.2.2. Síntomas de intoxicación (no se presentan de inmediato, se acumulan y llegan a sobrepasar el límite de resistencia del hígado)**

**Tabla Nº 1 Sintomatología clínica**

Dolor de cabeza	inflamación de articulaciones
Fatiga	daños irreversibles en la visión
Debilidad	alteración del sistema nervioso
Mareos	problemas respiratorios
Náuseas	en la sangre y en los huesos
Sudor	retardo mental
Diarreas	carcinogenicidad
pérdida del apetito	daño reproductivo
pérdida de peso	Muerte

La intoxicación aguda puede dejar serias secuelas en riñones e hígado, ejemplo: ENDOSULFÁN (un componente de los plaguicidas).

### 3.2.3. Plaguicidas órgano fosforados. Grupo 2

Los organofosforados ingresan por la vía cutánea, respiratoria o digestiva. La primera constituye la ruta común de penetración, así como la forma más frecuente de intoxicaciones laborales. La eliminación de los órgano fosforados es rápida y tienen lugar por la orina y, en menor cantidad, por heces y aire expirado; su máxima excreción se alcanza a los dos días, luego disminuye rápidamente (Escriche, 1996).

**Tabla Nº 2. Los síntomas de intoxicación son:**

Falta de coordinación muscular	visión borrosa
Salivación abundante	color de piel rojo amarillento
Bradycardia	Convulsiones
Miosis	debilitamiento de la memoria
Hiperemia	opresión en el pecho
Parálisis vasomotora	respiración ruidosa
Sudoración excesiva	calambres abdominales
Temblores	calambres musculares

*Lo curioso del caso de los biocidas es que las plagas que creyeron eliminar con el correr de los años se hicieron más y más resistentes a los mismos; es decir; se hicieron inmunes a los propios agroquímicos. Según un estudio de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) de 1988, más de 300 plagas han desarrollado resistencia a un extenso rango de productos químicos.*

### 3.3. Clasificación

#### 3.3.1. Según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- Plaguicidas de uso fitosanitario, productos fitosanitarios: destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.
- Plaguicidas de uso ganadero: destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- Plaguicidas de uso en la industria alimentaria: destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- Plaguicidas de uso ambiental: destinados al saneamiento de locales o establecimientos públicos o privados.
- Plaguicidas de uso en higiene personal: preparados útiles para la aplicación directa sobre el ser humano.
- Plaguicidas de uso doméstico: preparados destinados para aplicación por personas no especialmente calificadas en viviendas o locales habitados, es el más peligroso, ya que alrededor de 10 millones de personas mueren a causa de vectores.

#### 3.3.2. Según su acción específica pueden considerarse:

- |                                      |                                               |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1. Insecticida                       | 7. Rodenticida y varios                       |
| 2. Acaricida                         | 8. Específicos post-cosecha y simientes       |
| 3. Fungicidas                        | 9. Protectores de maderas, fibras y derivados |
| 4. Desinfectante y Bactericida       | 10. Plaguicidas específicos varios            |
| 5. Herbicida                         |                                               |
| 6. Fitorregulador y productos afines |                                               |



### 3.3.3. Según el estado de presentación o sistema utilizado en la aplicación:

- Gases o gases licuados.
- Fumigantes y aerosoles.
- Polvos con diámetro de partícula inferior a 50  $\mu\text{m}$ .
- Sólidos, excepto los cebos y los preparados en forma de tabletas.
- Líquidos.
- Cebos y tabletas.

### 3.3.4. Según su constitución química, los plaguicidas pueden clasificarse en varios grupos, los más importantes son:

- Arsenicales.
- Carbamatos.
- Derivados de cumarina.
- Derivados de urea.
- Dinitrocompuestos.
- Organoclorados.
- Organofosforados.
- Organometálicos.
- Piretroides.
- Tiocarbamatos.
- Triazinas.

Algunos de estos grupos engloban varias estructuras diferenciadas, por lo que, en caso de interés, es posible efectuar una subdivisión de los mismos.

### 3.3.5. Según su grado de peligrosidad para las personas, los plaguicidas se clasifican de la siguiente forma:

1. De baja peligrosidad: los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
2. Tóxicos: los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.

3. Nocivos: los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
4. Muy tóxicos: los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

### *3.4. Usos de los plaguicidas*

Los plaguicidas pueden ahorrar dinero a los agricultores al prevenir las pérdidas de cosechas por insectos y otras plagas. En un estudio se calculó que los agricultores en los Estados Unidos ahorraron el equivalente de cuatro veces el costo de los plaguicidas. Otro estudio demostró que el no usar pesticidas resultaba en una pérdida del 10% del valor de las cosechas. (SEMARNAP-INE. 1999).

Uno de los primeros plaguicidas y más comunes fue el DDT, para combatir las plagas en la agricultura y los mosquitos transmisores de malaria. En la actualidad existen grandes cantidades de marcas de plaguicidas en el mundo. El **DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano)** o más exactamente 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4 clorofenil)-etano, de fórmula  $(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{CH}(\text{CCl}_3)$  es un compuesto organoclorado principal de los insecticidas. Es incoloro y cristalino, es muy soluble en las grasas y en disolventes orgánicos, y prácticamente insoluble en agua. Su peso molecular es de 354 g/mol.

#### *3.4.1. Efectos ambientales*

El uso de pesticidas crea una serie de problemas para el medio ambiente. Más del 98% de los insecticidas fumigados y del 95% de los herbicidas llegan a un destino diferente del buscado, incluyendo especies vegetales y animales, aire, agua, sedimentos de ríos y mares y alimentos. La deriva de pesticidas ocurre cuando las partículas de pesticidas suspendidas en el aire son llevadas por el viento a otras áreas, pudiendo llegar a

contaminarlas. Los pesticidas son una de las causas principales de la contaminación del agua y ciertos pesticidas son contaminantes orgánicos persistentes que contribuyen a la contaminación atmosférica. (Escriche, I. y col 2006).

También ocurre que algunas plagas se adaptan a los pesticidas y no mueren. Lo que es llamado resistencia a pesticidas, para eliminar la descendencia de esta plaga, será necesario un nuevo pesticida o un aumento de la dosis de pesticida. Esto causará un empeoramiento del problema de contaminación del ambiente.

#### *3.4.2. Efectos en la salud*

Existe incertidumbre acerca de los efectos de la exposición prolongada de dosis bajas de pesticidas. Los sistemas de supervisión actuales son inadecuados para definir los riesgos potenciales relacionados con el uso de pesticidas y con enfermedades relacionadas a pesticidas. Teniendo en cuenta estas faltas de datos, es prudente limitar la exposición a pesticidas y usar los pesticidas químicos menos tóxicos o recurrir a alternativas no químicas. (García, C. M. y col. 1997).

No obstante algunos problemas hay evidencias de que los pesticidas alternativos pueden ser tan efectivos o aun más que los tradicionales. Por ejemplo en Suecia fue posible reducir a la mitad el uso de pesticidas en los cultivos con una reducción mínima de las cosechas. En Indonesia los agricultores redujeron el uso de pesticidas en las plantaciones de arroz en un 65% y experimentaron un aumento del 15% de las cosechas.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Plaguicidas en Bolivia

En la década del 80 el gobierno boliviano a través del Instituto Nacional de Salud Ocupacional (INSO), dependiente del Ministerio de Salud y Deportes, realizó una investigación en trabajadores agrícolas en las zonas de los valles, llanos y altiplano. Esta investigación tenía el objeto de evaluar los riesgos y daños a la salud y al medio ambiente por el uso de plaguicidas, y en efecto, después de haber realizado la misma, se encontraron resultados que mostraron importantes daños a la salud de los trabajadores agrícolas y sus familias y datos de contaminación del medio ambiente. Por esta razón el INSO inició una serie de acciones destinadas a implementar un programa dirigido a preservar la salud de los trabajadores agrícolas frente a los riesgos causados por el uso de plaguicidas, esfuerzos que recién se dejaron ver después de 10 años, cuando la Agencia de Cooperación Danesa para el desarrollo Internacional (DANIDA) aprobó una propuesta presentada por este Instituto y la ONG Danesa DIÁLOGOS.

De esta manera en octubre de 2001 el proyecto PLAGBOL inicia actividades con el objeto principal de contribuir a mejorar la calidad de vida de los agricultores de las áreas del proyecto, a través de la disminución de enfermedades causadas por plaguicidas, el mejoramiento de la producción agrícola y la preservación del medio ambiente.

Los objetivos que se perseguían eran los siguientes:

- Disminuir el número de intoxicaciones agudas, a través de la educación y el desarrollo de mejores hábitos en el uso y manejo de plaguicidas.
- Mejorar los métodos y procedimientos de diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones y enmarcados en la estructura programática del Ministerio de Salud y Deportes, contribuir a mejorar el sistema de vigilancia epidemiológica de intoxicaciones agudas debido a plaguicidas.

- Contribuir a mejorar la producción agrícola y el medio ambiente a través del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

PLAGBOL, en su primera fase, ha sido desarrollado en un período de 3 años, de octubre de 2001 a diciembre de 2004, con un período de extensión hasta junio de 2005. Se trabajó en cuatro municipios del departamento de La Paz, los cuales estaban caracterizados por ser zonas eminentemente agrícolas y con un elevado uso de plaguicidas, estos fueron: Guanay, Caranavi, Mecapaca y Palca. Con éste trabajo se benefició directamente alrededor de 10000 personas pertenecientes a las 40 comunidades de intervención, e indirectamente alrededor de 100000 habitantes de los cuatro municipios.

Las principales estrategias empleadas han sido, por un lado, la formación de recursos humanos pertenecientes a las áreas de salud, educación y agricultura y por otro, la información, educación y concientización de la población en general en temas relacionados a salud, agricultura y medio ambiente. (Huici O. y col 2007).

En Bolivia se usa plaguicidas que provocan enfermedades letales.

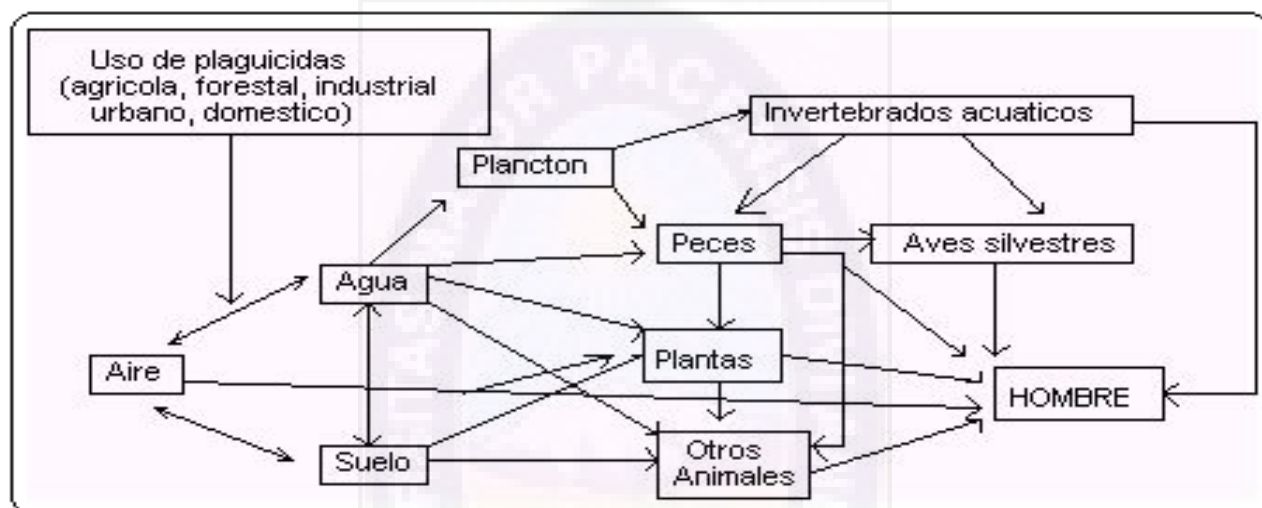
En riesgo. Los pequeños productores no utilizan adecuadamente los agrotóxicos; está en peligro su salud y la de los consumidores.

Las patologías. Cáncer, esterilidad, abortos espontáneos y malformaciones en el feto son parte de los efectos crónicos de los tóxicos.

Mal manejo. En Ivirgarzama (Cochabamba), la gente trabaja y convive con las sustancias, con escasa precaución y poco control.

En el mercado. Los residuos de los plaguicidas se mantienen en los alimentos, lo que también podría generar efectos a largo plazo. (Javier Badani La Razon 2007).

Según investigaciones realizadas en América y publicadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre los procesos patológicos que se desarrollan en el organismo por la exposición repetida a los plaguicidas en función a las características toxicológicas de cada sustancia y a las condiciones de salud de las personas expuestas están el cáncer, las mutaciones en los fetos, la esterilidad y las lesiones hepáticas.



**Figura Nº 1. Distribución de los plaguicidas en la cadena alimenticia.**

(Fuente Rutilio Ortiz S. et.al)

Con datos de la OPS/OMS, el Proyecto Plaguicidas Bolivia señala que “está científicamente comprobado que los plaguicidas **carbamil, captán y paraquat**, entre otros usados en los campos del país, generan efectos teratogénicos (malformaciones)”.

A pesar de estos indicadores, los médicos que egresan de los centros de estudio del país no cuentan con conocimientos especializados en toxicología clínica, por lo cual los diagnósticos de estas patologías que se presentan en las áreas rurales de Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y, en menor incidencia, en La Paz suelen ser atribuidos a otros factores, como lo asegura la química Tania Santiváñez. (La Prensa, 11 de diciembre de 2010). Después de Santa Cruz, el departamento que más productos químicos utiliza en la producción agrícola es Cochabamba, donde, a diferencia

del oriente, este material tóxico es manipulado de manera más precaria por los pequeños productores.

#### **4.1.1. Casos**

YAPACANÍ: El año 2002 se presentó en la localidad cruceña de Yapacaní un caso de sirenomelia (fusión de las extremidades inferiores) en un recién nacido. Los médicos que atendieron el caso aseguraron entonces que los progenitores desarrollaban tareas de fumigación. El caso forma parte de la documentación de la institución CEIISA.

POTOSÍ: El 2003 nació en el hospital Bracamonte, en la ciudad de Potosí, un bebé que presentaba la ausencia de genitales externos, ano imperforado y la fusión de las extremidades inferiores, según un informe de los doctores Jorge Barriga y Gróver Cortez. Si bien los galenos dijeron que la patogenia era incierta, mencionan que “se han descrito casos por la ingesta materna de ácido retinoico”. El informe se halla en el archivo de PLAGBOL.

SACABA: En el hospital México, de la localidad de Sacaba, una mujer de 41 años dio a luz a un bebé sin cerebro y sin parte de sus órganos genitales. Según reportes de la prensa local, la mujer se expuso a pesticidas durante su embarazo. Los reportes médicos señalaron que a esto se sumó la edad avanzada de la madre y el uso de medicamentos sin asesoramiento médico. Al final, el bebé falleció a los pocos días de nacido.

Henry Tordoya, director del hospital de Ivirgarzama, afirmó que “lo que más he visto es la polidactilia, niños que nacen con más de cinco dedos en las manos o en los pies, seis en su mayoría, algunas veces siete”. Un caso que llamó la atención se registró en un recién nacido con múltiples anomalías. “Tenía labio leporino, paladar hendido, polidactilia, frente prominente, y, obviamente, no podía alimentarse, era prematuro y la madre prácticamente le dio la espalda”. (Javier Badani *La Razon* 2007).

Según los miembros en Bolivia de la Red de Acción en Plaguicidas y Alternativas de América Latina (Rap-Al), estos plaguicidas son empleados en la actualidad por pequeños agricultores de bajo nivel de escolaridad, que no conocen el adecuado manejo y almacenamiento de dichas sustancias.

Entre los 23 ingredientes activos altamente tóxicos que circulan en el sector agrícola del país se halla el **endosulfán**, agroquímico que fue el causante de la muerte, en enero, de dos niños en Camiri. Los menores fallecieron intoxicados luego de haber ingerido el arroz donde había caído accidentalmente parte de este químico, que activa al plaguicida tionil, prohibido en Colombia, Paraguay y Cuba.

Si bien Bolivia no es un productor de plaguicidas, el uso en el territorio nacional de estas sustancias se incrementó en los últimos años. De 1993 al 2002, por ejemplo, la tasa de importación fue del 18,12 por ciento, “que es la más alta dentro de los países en vías de desarrollo, donde el promedio es de sólo 4,12 por ciento”.

Este hecho “significa un incremento del uso de estas sustancias en Bolivia sin sistemas de fiscalización eficientes”, asegura un informe desarrollado por Plaguicidas Bolivia (PLAGBOL).

Instituciones como PLAGBOL y CEIISA orientan a los productores en el control de plagas a través de la incorporación de barreras vivas y la preparación de suelos con abonos naturales. PLAGBOL, además, lleva esta capacitación a agrónomos, comercializadores, consumidores y médicos en La Paz, Cochabamba, Santa Cruz y Chuquisaca.

*“Reglamento insuficiente”*: Actualmente, existe un reglamento para el registro y control de plaguicidas, fertilizantes y sustancias afines de uso agrícola. Éste restringe, pero no prohíbe los plaguicidas, pues señala que “el registro está sujeto a un estudio riesgo/beneficio realizado por la empresas registrantes y sometida a la opinión del Consejo Nacional de Plaguicidas (Conapla)



quien derivará su informe al Senasag, el que tomará la decisión de otorgación de registro; en caso favorable, únicamente será con uso restringido”. (BIOFARBO 2008).

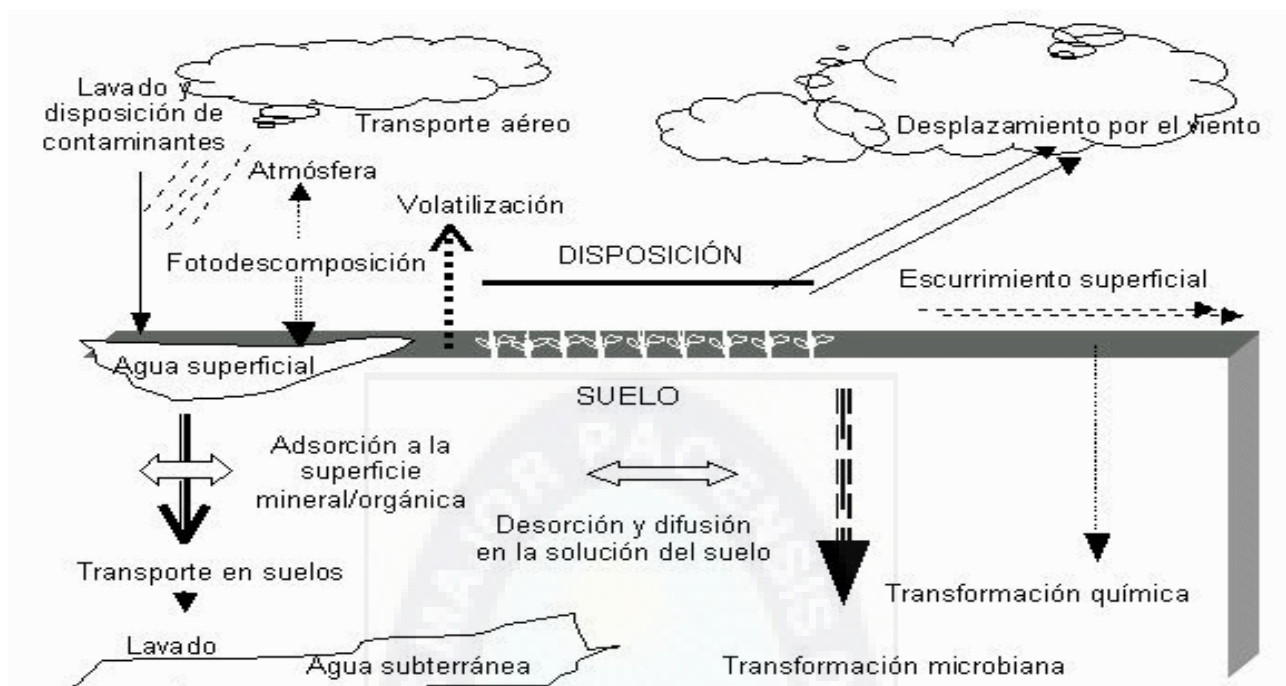
#### **4.1.2. Ingreso por contrabando**

Un problema adicional es el ingreso de los plaguicidas al país: si bien algunos son introducidos legalmente, la mayoría entra de contrabando.

La gran demanda de los plaguicidas se explica por la extendida creencia de que si no se usan químicos no habrá una buena cosecha, según el director ejecutivo de la Fundación Plaguicidas Bolivia (Guido Condarco PLAGBOL 2003)

#### **4.2. Movimiento y destino de los plaguicidas en el ambiente**

Los plaguicidas liberados pueden moverse hacia distintos medios de acuerdo a las condiciones climáticas, características químicas y físicas del plaguicida y de los receptores ambientales. Su persistencia quedara determinada por sus propiedades intrínsecas como por factores ambientales y de las propiedades de los compartimentos ambientales en el cual está depositado.



**Figura 2. Distribución de los plaguicidas en el ambiente**

(Fuente Rutilio Ortiz S. et.al)

#### 4.2.1. Volatilización

Es la propiedad que probablemente más afecta el movimiento del plaguicida hacia la atmósfera después de la aplicación, el ritmo de volatilización está determinado por la tensión de vapor del plaguicida, cada materia activa tiene una tensión de vapor característica en unas condiciones dadas, los plaguicidas normalmente tienen tensiones de vapor relativamente bajas (10-4 a 10-8 mm Hg), como también hay algunos que son muy volátiles y precisamente deben a ello gran parte de su eficacia al actuar por inhalación y penetrar vaporizado en lugares como el interior de un racimo de uvas, la volatilización es aumentada por el viento y la temperatura. Distintas formulaciones para un mismo plaguicida tienen diferentes presiones de vapor y por ende su grado de volatilización es distinto.

#### 4.2.2. Lixiviación

La lixiviación es el fenómeno por el cual el plaguicida se desplaza hacia el interior del compartimento suelo fuera de su área objetivo causando en algunos casos la contaminación de las napas subterráneas dependiendo de la profundidad de esta y de la movilidad del plaguicida.

La lixiviación es un proceso que depende de las características químicas del plaguicida y las propiedades químicas y físicas del suelo. Igualmente los plaguicidas más solubles en agua tendrán mayor nivel de movilidad respecto a los menos solubles.

#### 4.2.3. Esgurrimiento

En muchas situaciones de aplicaciones cercanas a aguas superficiales se producen escurrimientos que contaminan estas con los plaguicidas, factores como el riego, lluvias y efectos de deriva son las causas principales de esta situación.

**Tabla 3 Clasificación de los plaguicidas según tipo de plaga a controlar**

<b>TIPO DE PLAGUICIDA</b>	<b>ORGANISMO AL QUE INTERESA CONTROLAR</b>
Insecticida *	Larvas de insectos, hormigas
Acaricida	Ácaros
Avicidas	Aves
Herbicidas	Malezas
Nematicida	Nemátodos
Molusquicida	Moluscos
Rodenticida/Raticida	Roedores
Bactericida / Bacteriostático	Bacterias
Fungicida	Hongos

\*Son los más utilizados en la agricultura y en campañas de salud Pública.

Modificado de Diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas por plaguicidas, PLAGBOL.

#### 4.3. Tipos de intoxicación de los plaguicidas

Muchos de los plaguicidas producen intoxicaciones, a veces mortales en el ser humano. Como existen diferentes clases, algunos producen efectos a largo plazo, pueden llegar a causar enfermedades serias y hasta cáncer.

#### 4.3.1. Tabla Nº 4 del grado de toxicidad de los plaguicidas

Clasificación de OMS	Clasificación de peligro	Color de la etiqueta	Símbolo de peligro
Sumamente peligros	<b>MUY TÓXICO</b>	<b>ROJO</b>	CALABERA
Muy peligroso	<b>MUY TÓXICO</b>	<b>ROJO</b>	CALABERA
Moderadamente peligroso	<b>NOCIVO</b>	<b>AMARILLA</b>	CRUZ
Poco Peligroso	<b>CUIDADO</b>	<b>AZUL</b>	-
Normalmente no ofrece peligro	<b>PRECAUCIÓN</b>	<b>VERDE</b>	-

(Fuente [paritarios.cl/especial\\_plaguicida.html](http://paritarios.cl/especial_plaguicida.html))

Solo para mencionar uno de los que causa mayores problemas en la salud es el llamado PARAQUAT conocido como Gramoxone, es un plaguicida de alta toxicidad que puede causar intoxicaciones severas y en muchos casos mortales, y la persona puede intoxicarse con solo respirarlo o al tener contacto con la piel. La ingestión es mortal. El paraquat puede causar serios daños en los pulmones, riñones, cerebro, hígado e incluso uno de los problemas más serios es que puede liberarse y penetrar hacia las plantas y aguas contaminando también los suelos.

#### 4.4. Efectos de los plaguicidas en la salud

##### 4.4.1. Efectos reproductivos

En pruebas de laboratorio con ratas y conejos el glifosato afectó la calidad del semen y la cantidad de espermatozoides (Cox 1995, Dinham, 1998). De acuerdo con la EPA (Environmental Protection Agency) exposiciones continuadas a residuos en aguas en concentraciones por encima de 0.7 mg/L pueden causar efectos reproductivos en seres humanos.

#### **Tabla Nº 5. Efectos en la salud producidos por los plaguicidas**

<b>EFFECTOS CRONICOS</b>	<b>PLAGUICIDAS</b>	
<b>Neurológicos</b>	Neurotoxicidad retardada	Leptofós (organofosforados ), Carbaril (Carbamatos).
	Cambios de conducta	Algunos insecticidas organofosforados .
	Lesiones del Sistema Nervioso Central	Insecticidas órganoclorados y organofosforados; fungicidas mercuriales.
	Neuritis periférica	Herbicidas clorofenoxi, piretroides y algunos insecticidas organofosforados.
<b>Reproductivos</b>	Esterilidad en el hombre	Dibromocloropropano (DBCP).
	Disminución del índice de fertilidad	Captán (en animales y posiblemente en hombres) y el Agente Naranja (2,4-D + 2,4,5-T).
<b>Cutáneos</b>	Dermatitis de contacto	Paraquat; captafol; 2,4-D y mancozeb.
	Reacción alérgica	Barbán, benomyl, DDT, lindano, zineb, malatión.
	Reacciones fotoalérgicas	HCB, benomyl, zineb.
	Cloracné	HCB, pentaclorofenol, 2,4,5-T por contaminación con policloro dibenzodioxinas y dibenzofuranos.
	Porfiria Cutánea Tardía	HCB.
<b>Cáncer</b>	Carcinógenos para el hombre	Compuestos arsenicales y aceites minerales.
	Probablemente Carcinógenos para el hombre	Dibromuro de etileno, oxido de etileno, clordecona, clorofenoles, derivados del ácido fenoxiacético, DDT, Mirex, toxafeno, 1,3-dicloropropano, hexaclorobenceno, hexaclorociclohexano, nitrofen, ortofenilato de sodio y sulfalato.
<b>Oftalmológicos</b>	Formación de cataratas	Diquat.
	Atrofia del nervio óptico	Bromuro de metilo.
	Alteraciones de la mácula	Fentión.
<b>Mutagénicos</b>	Suficiente evidencia de actividad mutagénica	Dibromuro de etileno.
<b>Respiratorios</b>	Neumonitis y fibrosis pulmonar	Paraquat.
<b>Inmunológicos</b>		Dicofol, compuestos organoestánicos y triclorfón.
<b>Teratogénicos</b>		Carbaril, captán, folpet, difolatán pentacloronitrobenceno, paraquat, maneb, ziram, zineb y benomyl.
<b>Lesiones hepáticas</b>	Lesiones hepáticas	DDT, mirex, kepona, pentaclorofenol y compuestos arsenicales.
<b>Urinarios</b>	Cistitis hemorrágica	Clordimeform.

Fuente: Plaguicidas y Salud en las Americas OPS/OMS 1993

#### 4.4.2. Acción cancerígena

El primer estudio (1979-1981) encontró un incremento en tumores testiculares intersticiales en ratas machos a la dosis más alta probada (30 mg/kg/día), así como un incremento en la frecuencia de un cáncer de tiroides en hembras. El segundo estudio (completado en 1983) encontró

incrementos relacionados con la dosis en la frecuencia de un tumor renal raro. Otro estudio (1988-1990) encontró un incremento en el número de tumores de páncreas e hígado en ratas machos, junto con un incremento en el mismo cáncer de tiroides encontrado anteriormente en hembras.

#### **4.4.3. Acción mutagénica**

Ninguno de los estudios sobre mutagénesis (requeridos para el registro del glifosato) ha mostrado acción mutagénica. Pero los resultados son diferentes cuando los estudios se realizan con formulaciones comerciales a base de glifosato: en estudios de laboratorio con varios organismos se encontró que el Roundup y el Pondmaster (otra formulación) incrementaron la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en mosca de la fruta; el Roundup en dosis altas, mostró un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y fue débilmente mutagénico en la bacteria Salmonella. También se ha reportado daño al DNA en pruebas de laboratorio con tejidos y órganos de ratón (Cox 1995).

#### **4.5. Genética Toxicológica**

La Genética Toxicológica es la disciplina que se ocupa del estudio del efecto mutagénico de los agentes químicos, físicos y/o biológicos, así como las consecuencias sobre los ecosistemas, el ambiente, los seres vivos y la salud humana provoca la exposición a los mismos. En pocas palabras, esta disciplina se encarga de detectar las genotoxinas, agentes capaces de actuar directa o indirectamente sobre el DNA o sobre moléculas asociadas (proteínas que intervienen en la reparación del DNA o en la segregación cromosómica) y que producen alteraciones (mutaciones) en el material genético a concentraciones no tóxicas o subtóxicas (Mudry M. y col., 2006).

##### **4.5.1. Efectos adversos de las mutaciones y mutagenesis**

Las mutaciones se producen tanto en las células germinales como en las células somáticas. Las consecuencias de una y otra son distintas, en términos de la población y del individuo. Los

cambios que se generan en los gametos pueden provocar esterilidad en el individuo portador o bien fijarse en el material genético, lo cual se traduce en cambios heredables (mutagénesis). (Alldrick A. J., 1989).

Sin embargo, en el mundo moderno esta situación no se presenta, ya que prácticamente todos los individuos estamos expuestos a diversos agentes químicos o físicos altamente reactivos. Por esto, el nacimiento de un niño con alteraciones genéticas no prueba que los padres estuvieron expuestos a un agente genotóxico. Esto significa que es muy difícil establecer relaciones causa-efecto a partir de casos aislados (Sachs L., 1986).

**Figura N° 3. Mutagénesis**



(Fuente Rutilio Ortiz S. et.al)

#### 4.5.2. Biomonitorización de poblaciones expuestas a agentes genotóxicos

Los estudios de biomonitorización, intentan establecer la relación entre factores ambientales y enfermedad, detectando alteraciones iniciales en fases todavía no malignas. Los estudios de biomonitoreo quedan basarse en el análisis de los compuestos químicos o de sus metabolitos en muestra de sangre, orina, pelo, etc., o también puede evaluar el riesgo de exposición mediante la determinación de las posibles alteraciones, tanto físicas como bioquímicas, inducidas en los individuos (Albertini, 1994).

El objetivo como parte del proceso de evaluación del riesgo genético es detectar la exposición a genotoxinas ambientales y determinar sus efectos genotóxicos *in vivo*.

#### **4.5.3. Tipos de marcadores genéticos**

El desarrollo de técnicas analíticas sofisticadas para el estudio de estos polimorfismos genéticos permite diferenciar las distintas formas alternativas que pueden tener cada uno de ellos. Por eso se utilizan como marcadores genéticos, elementos que sirven para diferenciar a unas personas de otras. (Scarpato R, y col 1996).

Por otra parte, al transmitirse estos elementos genéticos polimórficos de padres a hijos, generalmente sin cambios, las personas que comparten algún vínculo familiar directo también comparten varios de estos marcadores. Los científicos han estudiado durante décadas este proceso de transmisión de la información genética y de sus variaciones y han aprendido a analizar sus patrones y a determinar, midiendo el tipo de marcadores genéticos compartidos y el grado de similitud entre diversas personas, si entre éstas existe o no algún parentesco biológico y de qué tipo. La aplicación de los métodos de estudio más modernos permite realizar estos análisis con un grado de certeza elevadísimo, casi absoluto. (Bolognesi C., 2003).

#### **4.5.4. Biomarcadores como indicadores de riesgo genético**

Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales. Un biomarcador es cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, ya sea químico, físico o biológico (WHO/IPCS, 1993). Para que se desarrolle el cáncer inducido, el agente cancerígeno ha de estar en el medio y posteriormente entrar en el organismo y, si es necesario, metabolizarse para reaccionar con



diferentes macromoléculas (incluyendo el DNA). Al final, si se induce un daño genético, este puede ser visualizado mediante técnicas citogenéticas o moleculares.

#### **4.5.5. Biomarcadores de exposición**

Localizan la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos (o sus metabolitos) en tejidos y secreciones corporales (p. Ej. Sangre, orina, heces). Si el compuesto ha penetrado y ha interactuado con el material genético (mutágenos/carcinógenos electrofílicos), se puede detectar por la aparición de aductos en proteínas (albúmina y hemoglobina) y en DNA (células de la línea blanca, orina, tejidos). Un resultado positivo a este nivel no indica necesariamente consecuencias adversas, ya que parte del daño genotóxico primario puede ser reversible (Mora y col., 2001).

El objetivo es detectar si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a diferentes niveles. Para detectar la exposición a plaguicidas se ha utilizado diferentes biomarcadores tales como: disminución de los niveles de colinesterasa, detección de aductos de hemoglobina entre otros (Anwar, 1997).

#### **4.5.6. Biomarcadores de efecto**

Los biomarcadores de efecto han sido los más utilizados en los estudios de biomonitorización humana, miden el daño genético una vez que ya ha sido procesado por el organismo. Las lesiones en el DNA, una vez procesadas, pueden convertirse en cambios permanentes en las células (mutaciones). Como sus efectos se fijan, reflejan daños correspondientes a exposiciones pasadas, por lo que son útiles para detectar daño acumulativo. Se puede dividir en informativos (no específicos) y en relevantes para algunas enfermedades, es decir, aquellos biomarcadores que determinan cambios cromosómicos o genómicos en lugares críticos relacionados con el desarrollo de una enfermedad (ver cuadro) (Saleha B. y col., 2001).

**Tabla Nº 6. BIOMARCADORES DE EFECTO**

	<b>DAÑO CROMOSOMICO</b>	<b>DAÑO GENETICO</b>
<b>INFORMATIVOS</b>  (no específicos)	Aberraciones cromosómicas  Micronúcleos  Intercambios de cromátidas hermanas  Ensayo del cometa	Mutaciones puntuales  Deleciones  Recombinaciones  Amplificaciones
<b>RELEVANTES</b>  Enfermedad	Alteraciones específicas	Mutaciones en :  Protooncogenes  Genes supresores de tumores  Genes de reparación

#### **4.5.6.1. Ensayo del cometa**

El ensayo del cometa es una técnica sencilla, rápida y sensible para analizar el daño en el ADN en células individuales. El ensayo del cometa o electroforesis de una célula permite la detección de daño simple y doble cadena de ADN y nos permite evaluar los niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares, sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. Este ensayo es potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido (Mudry M. y col., 2006).

Su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas

presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis (Laffon B. y col., 2004)

### **a) Antecedentes**

Los primeros en desarrollar una metodología de electroforesis en microgel de agarosa para detectar el daño al ADN a nivel de células aisladas, fueron Ostling y Johanson (1984). Posteriormente, Singh et al (1988) introdujo un procedimiento en microgel de agarosa donde la electroforesis se realiza en condiciones alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), con lo cual, al desnaturalizar al ADN, se lograba detectar no solo las roturas de doble cadena, sino también los sitios álcali lábiles y las roturas simple cadena. Debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos inducen preferentemente roturas de simple cadena y sal, esta versión del ensayo ofrece muchas más aplicaciones que la versión original (Mudry M. y col., 2006).

### **b) Aplicaciones del Ensayo del Cometa**

Los principales usos de este ensayo en Genética, son:

- ❖ Es un potencial ensayo para screening debido a ser un precursor de las aberraciones cromosómicas.
- ❖ Permitir el estudio del probable mecanismo de acción de un dado agente mediante la utilización de modificaciones de la metodología básica.
- ❖ Posibilitar la distinción entre un agente genotóxico y uno citotóxico ante la inducción de aberraciones cromosómicas.
- ❖ Formar parte de los protocolos de estudio in vivo / in Vitro utilizados para la regulación de nuevos fármacos.

Como un ensayo de genotoxicidad, el ensayo del cometa, puede identificar posibles mutágenos y carcinógenos humanos (Mudry M. y col., 2006).

### **c) Fundamento**

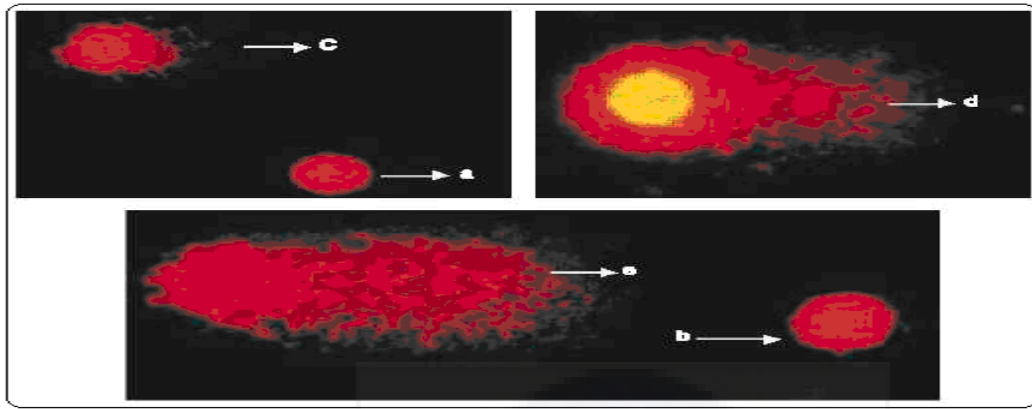
El fundamento de la técnica consiste en lisar células de interés, embebidos en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. De esta manera, se libera al ADN superenrollado en forma de nucleoides. Posteriormente, estos nucleoides serán sometidos a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino. Durante la electroforesis el ADN será atraído hacia el ánodo, y para que haya movilidad se debe producir la rotura de la cadena de ADN, generando pequeños fragmentos, que darán por resultado la aparición de pequeños cometas. El largo del cometa, se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN. La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidió (colorante con afinidad por el ADN), se podría observar la imagen de pequeños cometas (Mudry M. y col., 2006).

### **d) Cola de cometa**

Forma en que aparecen las células que han sido dañadas (núcleo fragmentado) al visualizar los resultados de la aplicación del ensayo del cometa o electroforesis en gel de agarosa, de células aisladas. La longitud de la cola de cometa depende de las condiciones de la electroforesis más que de los tamaños de los fragmentos inducidos (Cuenca P. y col., 1997).

### **e) Cabeza de cometa**

Forma en que aparecen las células que no han sido dañadas (núcleos intactos) al visualizar los resultados de la aplicación del ensayo del cometa o electroforesis en gel de agarosa, de células aisladas.



**Figura N° 4. Morfología de los núcleos en cinco categorías: a) sin daño en el ADN. b) daño bajo, c) daño medio, d) daño alto y e) daño total.**

(Fuente Tirado Noemí et.ál)

La capacidad de migración del ADN es una función tanto del tamaño como del número de extremos rotos producidos por el agente que se está ensayando, que aunque puedan quedar sujetos por largas piezas de ADN, normalmente migran una corta distancia desde la cabeza del cometa. De esta manera, cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza y una cola brillante y fluorescente, en contraposición a las células que no han sido dañadas que aparecen con núcleos intactos (cabezas del cometa) sin colas. (Betti C. y col., 1994).

## **f) Ventajas y desventajas**

### **Ventajas:**

- El ensayo del cometa evalúa niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares, sin necesidad de trabajar con células en proliferación.
- Es un sistema potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido.
- Se necesitan pequeñas cantidades de células (< 200.000)
- Se puede aplicar virtualmente en cualquier tipo celular.

- Es una metodología rápida y sencilla que permite la obtención de resultados comparables en un corto periodo de tiempo.

**Desventajas:**

- Entre las limitaciones del Ensayo del Cometa podemos citar la incapacidad de detectar aneunógenos y la capacidad de reparación del ADN.
- Si una lesión generada es de muy corta vida media, será reparada y no podrá ser detectada por esta metodología.
- En el caso de compuestos citotóxicos, se pueden obtener resultados positivos falsos debido a la fragmentación del ADN como consecuencia de los patrones generados en procesos tanto de apoptosis como de necrosis.

#### **4.5.7. Biomarcadores de susceptibilidad**

Son aquellas que identifican diferencias interindividuales que hacen que un individuo sea más susceptible o responda de manera diferente con un mayor o menor riesgo para la salud, frente a diferentes exposiciones ambientales. La capacidad de reparación del daño genético también está determinada genéticamente y aquellos individuos deficientes en los mecanismos de reparación sufrirán mayores niveles de daño genético irreversible, incluso frente a la exposición de baja intensidad (Branda y col., 1991).

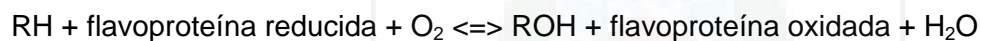
##### **4.5.7.1. Los polimorfismos**

Los denominados polimorfismos de nucleótido único (SNPs o *single nucleotide polymorphism*) son otro objetivo importante de la biología molecular aplicada al estudio de la evolución. Se trata de puntos concretísimos de los genomas en los que un nucleótido puede ser diferente en varios individuos, dando lugar a caracteres diferentes, como el color de los ojos, de la piel, del pelo, la forma de la nariz, la forma en que metabolizamos

sustancias, etc. Un buen ejemplo de SNP son los alelos de los grupos sanguíneos humanos. (Vigreux C, y col. 1998).

A lo largo del genoma humano (y también en otras especies) se han identificado multitud de regiones en las que la secuencia no es igual en todas las personas. La forma en que cambia la secuencia de estas regiones es muy diversa. El análisis de la población ha demostrado que para cada una de estas regiones es posible identificar 2 o más formas alternativas o alelos. Por ello se habla de *polimorfismos genéticos*. Cada persona cuenta con 2 cromosomas: uno de ellos en el cromosoma que procede del padre y el otro en el cromosoma cedido por la madre. Por consiguiente, para cada una de estas regiones polimórficas tendrá al menos 2 de estos alelos, uno en cada cromosoma. Puede ser iguales (homocigosis) o diferentes (heterocigosis).

**CYP1A1** es el acrónimo de consenso internacional usado para referirse tanto a una enzima del citocromo P450 como al gen que regula la síntesis de la misma. Habitualmente al referirse al gen se suele utilizar la letra cursiva: *CYP1A1*, el cual forma parte de la familia CYP1, compuesta por 3 subfamilias, 3 genes y 1 pseudogen. La CYP1A1 también es conocida como Aril-4-monooxigenasa, porque cataliza reacciones en las que se hallan implicados aril-hidrocarburos. La reacción es del siguiente tipo:



En la que se debe recordar que las flavoproteínas son oxidorreductasas que utilizan como coenzima el FAD (flavín-adenín-dinucleótido).

CYP1A1 está localizado en el cromosoma 15q y presenta polimorfismos asociados a cáncer de seno: una sustitución de C por A que determina el cambio de aminoácido en el codón 461 de Asparagina por Treonina (Asn461Thr), una transición de A por G en el nucleótido 4889 del exón 7

que produce un cambio de aminoácido de Isoleucina a Valina (Ile462Val) y una transición de T por C en el extremo 3' de la región no codificante en el nucleótido 6235 el cual genera un sitio de restricción para la enzima **MspI**. Entre las isoenzimas más estudiadas con relación a cáncer, se encuentran las de fase 1 monooxigenasas citocromo P450 (CYP2D6, CYP2C19, CYP17 y CYP1A1), involucradas en la biotransformación de xenobióticos tales como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), nitrosaminas y dioxinas, como las que se encuentran en el humo del tabaco y las de fase 2 glutatión transferasa (GST), involucradas en la desintoxicación de compuestos potencialmente carcinogénicos. (Wu, M-S., y col. 1999).

**Tabla Nº 7. Tipos de Citocromo P 450**

Gen	Polimorfismo	Codón (SNP)	Función proteica
<b>CYP1A1</b>	MspI (CYP1A1*2A)	T6235C	Fase I: Activación de PAHs
<b>CYP1A2</b>	CYP1A2*F	C734A	Fase I: Metabolismo de; HAPs, Nitrosaminas y arylaminas
<b>CYP2E1</b>	DraI PstI	T7668A C1091T	Fase I: Activación Procarcinógenos (4- metilnitrosamine, aminas aromáticas
<b>CYP3A4</b>	CYP3A4*3	Met445Treo	Fase I: Metabolismo del fármaco. Activación (PAHs)
<b>GSTs (Glutathion transferasas)</b>	GSTM1 GSTT1 GSTP1	mu teta delección pi delección Ile105Val	Fase II: Glutathion conjugación de compuestos hidrofóbicos y electrofílicos
<b>HATs (II- acetiltransferasas)</b>	NAT1*10	T1088A and C1095A	Fase II: Acetilación de las aminas aromáticas y la activación de las aminas heterocíclicas
<b>p53</b>	Codón 72	Arg72Pro	ciclo de regulación celular del tumor supresor

(Fuente Priya Chacko et. al)



#### **4.5.7.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción**

En biología molecular, el término polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o **RFLP** (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción.

Esta técnica, desarrollada a finales de los 70, se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular o de tallas diferentes (por digestión con enzima de restricción). Se utiliza para diferenciar o genotipificar microorganismos mediante el análisis de patrones derivados de cortes en el ADN. Cuando se emplea la PCR para amplificar fragmentos de ADN y después enzimas de restricción, se le denomina PCR-RFLP. Y es ampliamente utilizada para genotipificar virus como los Virus de Papilloma Humano, Virus de Hepatitis C entre otros. GENOTIPIFICACIÓN POR RFLP descrito por (Davidson y cols., J.G.Virol, 76, 1995). La técnica RFLP se usa como marcador para identificar grupos particulares de personas con riesgo a contraer ciertas enfermedades genéticas, en ciencia forense, en pruebas de paternidad y en otros campos, ya que puede mostrar la relación genética entre individuos.

##### **a) Aplicaciones**

El análisis de la variación de RFLP en genomas ha supuesto en el pasado una herramienta fundamental en el mapeo genómico y el análisis de enfermedades genéticas. Cuando los investigadores pretendían determinar la localización cromosómica de una determinada enfermedad, analizaban el ADN de los miembros de una familia afectada por la enfermedad, y

buscaban los alelos para RFLP que mostraban patrones de herencia similares a los de la enfermedad. Una vez el gen era localizado, el análisis RFLP de otras familias podría predecir su riesgo de padecer esa enfermedad, o quiénes tenían posibilidades de portar el gen mutante.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

- Determinar la influencia de los polimorfismos genéticos de la Citocromo p450 CYP1A1 sobre el daño genotóxico medido por el ensayo del cometa en agricultores expuestos a plaguicidas.

### 5.2. Objetivos Específicos

- Establecer el genotipo a través de la isoforma de las enzimas CYPs (CYP1A1).
- Evaluar la variabilidad genética del genotipo CYP1A1 como modificador de riesgo mutagénico por exposición a plaguicidas.
- Analizar otras variables como modificadores de efecto o contundentes.
- Verificar si las poblaciones de estudio se encuentran en los parámetros de equilibrio de Hardy – Weinberg.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Diseño metodológico del estudio**

El diseño de investigación utilizado fue de corte transversal comparativo.

### **6.2. Universo y/o población de estudio**

Las zonas de estudio serán los Municipios de Luribay y Sapahaqui, primera y segunda sección de la Provincia Loayza del Departamento de La Paz.- Bolivia, las comunidades seleccionadas para estudio son: del Municipio Luribay (Cachualla, Cutty, Peña Colorada, Bravo y Luribay centro) y del Municipio Sapahaqui (Khola y Macamaca).

La población en estudio fue de 92 personas de ambos sexos, entre las edades 16 y 80 años. De los cuales corresponde a personas que habitan en las mismas comunidades, pero se dedican a otras actividades que no sea la agricultura, como ser profesores, personal de salud, funcionarios de la Alcaldía y otros.

La participación fue voluntaria firmando una carta de consentimiento informado (ver Anexo) después de realizada la información sobre el objetivo del trabajo, para autorizar la toma de muestra y respondieron un cuestionario estandarizado, probado en el campo y ajustado a la población de estudio donde se recopiló la información necesaria para conocer características de sus antecedentes personales, tanto de los individuos expuestos o no expuestos a plaguicidas.

### **6.3. Técnicas de instrumentos de recolección de datos**

**Para la recolección de datos:** Se utilizó un cuestionario validado para obtener el perfil epidemiológico de la población en estudio.

## **6.4. Métodos**

### **6.4.1. Encuesta**

Paralelamente a la extracción de las muestras biológicas, y para tener un buen conocimiento de las características, tanto de la población expuesta a plaguicidas como en los controles, cada individuo se sometió a una encuesta exhaustiva (ver anexo 1) con el fin de obtener información, lo más detallada posible, sobre su actividad laboral y sus antecedentes personales. Se realizaron las preguntas habituales como ser: edad, sexo, lugar de residencia, etc., también preguntas relacionadas con su historial médico, además de la exposición a rayos X. Los agricultores tuvieron que responder, además, a una serie de preguntas relacionadas con su actividad laboral, como ser: los años que utiliza plaguicidas, el tipo de plaguicida, el uso de ropa de protección, etc. El objetivo de la encuesta es detectar cualquier factor que pueda crear confusión con los resultados obtenidos.

### **6.4.2. Obtención de las muestras**

#### **6.4.2.1. Evaluación de daño genotóxico.**

##### **a) Obtención y preparación de las muestras.**

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa usando tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante (Becton Dickinson Lakes. NJ) previamente identificados con el código de los donantes.

##### **b) Procedimientos para el análisis de las muestras**

#### **Polimorfismos CYP1A1**

Se realizó utilizando el método modificado por Carstensen et al 1993.

Análisis genotípico. (Se realizó con el Kit Wizard). Para examinar los polimorfismos de interés, se aisló ADN genómico total de sangre periférica y se utilizara la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y posterior digestión con enzimas de restricción.

CYP1A1: Para la detección del polimorfismo Msp1, la amplificación por PCR se llevo a cabo utilizando los partidores C44 y C47, que amplifican un fragmento de 340 pb (pares de base).

## **Metodología**

### **c) Protocolo de Extracción de DNA:**

A partir de la muestra de sangre periférica de cada individuo con anticoagulante EDTA, se realizo la extracción con el Kit de Promega Wizard Genomic DNA purification de acuerdo al siguiente protocolo:

- A un volumen de 300  $\mu$ L de sangre se adiciono 900  $\mu$ L de solución de lisis en un tubo de microcentrifuga de 1,5mL.
- Previamente se agito el tubo suavemente hasta mezclar la sangre, luego se transfirió la sangre a un tubo conteniendo la solución de lisis de células. Se invirtió el tubo 5-6 veces para mezclar.
- Se incubo la mezcla por 10 min. a temperatura ambiente (invirtiendo 2-3 veces durante la incubación) para lisar las células rojas. Se centrifugo a 14,000 x g durante 20 seg. A temperatura ambiente.- Se removió y descarto lo más que se pudo de sobrenadante sin mezclar el precipitado blanco. Aproximadamente 50-100  $\mu$ L del líquido residual quedo en el tubo de 1,5 mL.
- Se agito en vortex el tubo vigorosamente hasta que las células blancas estuvieran resuspendidas (10-15 segundos)

- Se añadió la solución de lisis de núcleos 300  $\mu$ L al tubo conteniendo las células resuspendidas, pipeteando la solución 5-6 veces para lisar las células blancas, la solución se torno muy viscosa.
- Se añadió opcionalmente la solución de RNasa 1,5  $\mu$ L para lisar el núcleo o mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 °C por 15 min, luego enfriar a temperatura ambiente.
- Se adicono la solución de precipitación de proteínas 100  $\mu$ L para lisar el núcleo y se mezclo vigorosamente por 10–20 segundos. Se hicieron visibles pequeños cúmulos de proteínas después de agitar.
- Se centrifugo a 14,000 x g por 3 min. A temperatura ambiente. Para obtener un pellet café oscuro de proteínas.
- Se transfirió el sobrenadante limpio a un tubo de 1,5 mL conteniendo 300  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente.
- Suavemente se mezclo la solución por inversión hasta que las hebras blancas de DNA se hicieron visibles.
- Nuevamente se centrifugo a 14,000 x g por 1 min. A temperatura ambiente. Hasta que el DNA se hiciera visible como una masa blanca.
- Se decanto el sobrenadante y se añadió un volumen igual de etanol al 70% al DNA precipitado. Suavemente se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA. Se centrifugo como en el paso anterior.
- Cuidadosamente se aspiro el etanol utilizando una pipeta Pasteur teniendo el cuidado de no remover o aspirar el pellet de DNA. Se invirtió el tubo y se coloco sobre un papel absorbente para secar el pellet durante 10–15 min.

- Finalmente se adiciono la solución de rehidratación 100 µL al tubo para rehidratar incubando a 65 °C por 1 hora.

- Posteriormente se almaceno los tubos conteniendo el DNA a 2-8 °C hasta su procesamiento.

### 6.4.3. Polimorfismos CYP1A1

La identificación de los genotipos de CYP1A1 atribuido a la mutación en la región de la posición 6235 en la región de acompañamiento 3', dando lugar a un nuevo reconocimiento secuencia de la enzima de restricción MspI, se llevó a cabo utilizando una modificación de un enfoque de PCR-RFLP descrito previamente [Carstensen et al. 1993].

Un fragmento de ADN de 340 pb (homocigotos para el alelo de tipo salvaje \* 1) se amplificó en un 25-µL de la reacción con 100 ng de ADN genómico, 100 ng de cada uno de C44 cebadores (5' TAGGAGTCTTGCTCATGCCT) y C47 (5' CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT), 2 mM de dNTPs, 2,5 µL PCR tampón (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1,25 U Taq ADN polimerasa.

La desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 ° C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 57 ° C durante 1 min y 72 ° C durante 1,5 min. Un paso de extensión final de 72 ° C durante 2 min completado el proceso. Luego de la amplificación, los productos de PCR (20 µL) fueron digeridos con 5 U de endonucleasa de restricción MspI (New England Biolabs) en un total de 25 µL, y los fragmentos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa, teñido de con bromuro etidio (2,0% gel de agarosa Gibco-Invitrogen).

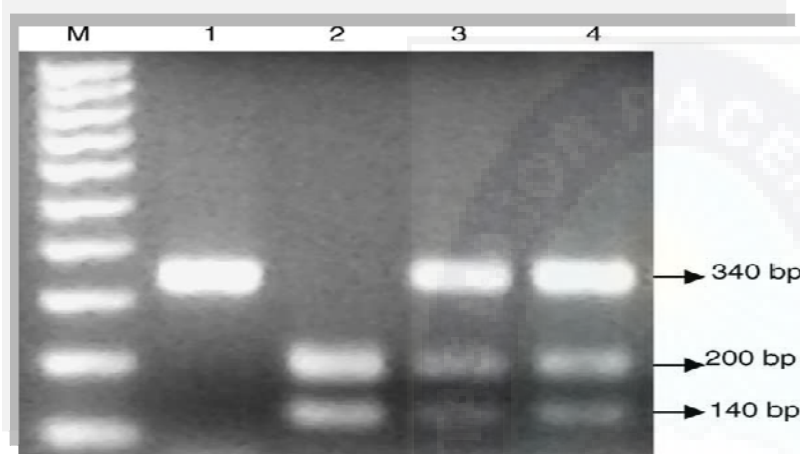
**Tabla Nº 8. Ciclos del PCR**

<b>Ciclos de amplificación de la PCR RFLP para CYP1A1</b>		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5min
Desnaturalización	95°C	45 seg.
Híbridación	50°C	30 seg.
Extensión	72°C	1 min. 30 seg.
} x35		
Extensión final	72°C	10min.



(Fuente Elaboracion propia)

Las muestras que son homocigotos para el alelo mutante, 2 fragmentos producidos de 200 pb y 140 pb.



**Figura N° 5.** RFLP (enzima de restricción MspI) análisis de genotipo CYP1A1 m1.

Carril M-ADN marcador de peso molecular. Carril 1-CYP1A1 m1 de tipo salvaje.

Carril 2-CYP1A1 m1 polimorfismo homocigoto.

Carril 3 y 4 CYP1A1 m1 polimorfismo

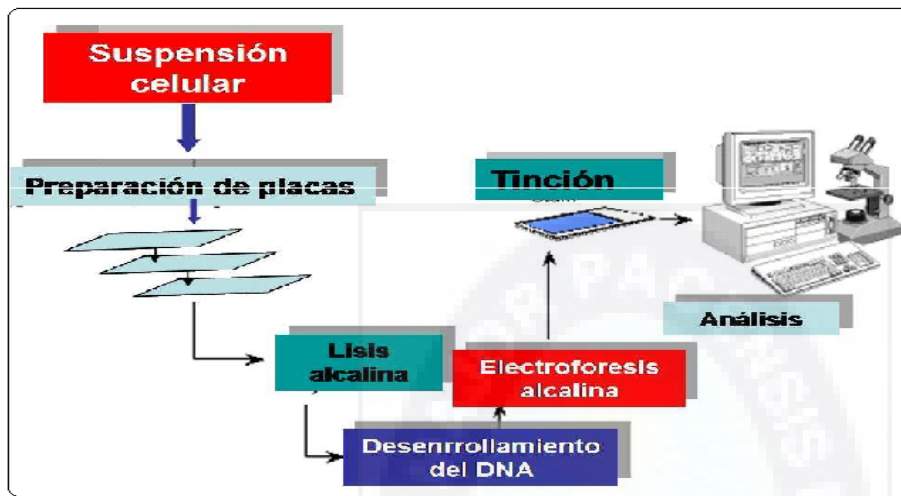
heterocigótico

(Fuente Priya Chacko et. al)

#### 6.4.4. Protocolo del Ensayo del Cometa

La técnica del ensayo del cometa se realizó según Singhetal, (1988), con modificaciones de Ramírez, (1998). Las células fueron suspendidas en 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en PBS y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Los portaobjetos con suspensión celular fueron colocados con cubreobjetos y llevados a 4°C por 10min, posteriormente se sumergieron en un buffer de lisis, (2,5M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Tris-HCl pH10, 1%TritonX-100 y 10%DMSO), Por 1 hora a 4° C en la oscuridad para permitir la lisis de las células embebidas y el desenrollamiento del DNA. Después de incubación de las células en la solución de lisis, los portaobjetos fueron

expuestos a buffer alcalino (1Mm Na<sub>2</sub>EDTA, 300mM NaOH buffer) pH>13 por 20min. Para degradar al DNA. (Speit G.,y col. 1994).



(Fuente Tirado Noemi et.al)

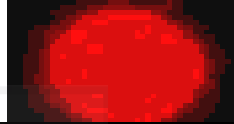
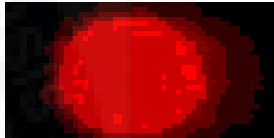
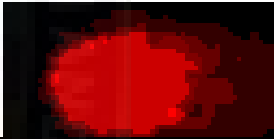
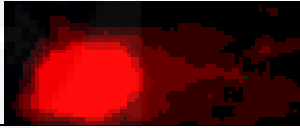
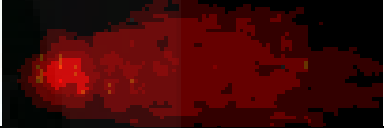
### Figura Nº 6. Ensayo del cometa

Finalmente, los portaobjetos fueron sometidos a electroforesis por 20 min. A 25 v y 300 mA en el mismo buffer, luego lavados con buffer 0.4Tris-HCl (pH7.5) para neutralizar el exceso de álcali y remover los detergentes y fijadas con etanol p.a, luego fueron almacenadas hasta su evaluación. Las placas fueron teñidas con bromuro de etidio (10ug/ml) y luego las células fueron examinadas bajo un microscopio fluorescente en un aumento de 40X. Para evaluar el daño al DNA, se observaron 100 células por cada placa.

#### 6.4.4.1. Registro visual

El registro visual se realizó de acuerdo con los criterios de Speit (1995) y Collins (2004), donde las células fueron clasificadas conforme al tamaño de la cola en cinco categorías que corresponden a las siguientes cantidades de daño en el DNA:

**Tabla N° 9. Clasificación de cometas por registro visual**

<b>Clase 0</b>	Células sin daño (<5%)	
<b>Clase 1</b>	Células con bajo nivel de daño (5-20%)	
<b>Clase 2</b>	Células con medio nivel de daño (20-40%)	
<b>Clase 3</b>	Células con alto nivel de daño (40-95%)	
<b>Clase 4</b>	Células con muy alto nivel de daño (>95%)	

(Fuente Tirado Noemí et.al)

#### 6.4.4.2. Análisis estadístico

Se confeccionó la base de datos con todas las variables independientes y dependientes. Luego se realizó el análisis demográfico, como ser: edad, sexo, habito de fumar y otros. También se realizo un estudio de caracterización de la exposición a plaguicidas en los agricultores, como ser: años de

uso de plaguicidas, tipo de plaguicidas, etc. y cualquier otro factor que pudiera influir sobre los resultados.

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio, primero se confeccionó una base de datos completa incluyendo tanto los datos obtenidos a través de la encuesta, como los resultados de los análisis de las muestras procesadas en el laboratorio. La base de datos se confeccionó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18.

Para determinar la significancia estadística de los resultados, en el caso de que la variable tuviera una distribución normal de los datos, se ha aplicado la prueba de t de Student para la comparación de medias de dos grupos independientes y, en caso de que los datos no presentaron una distribución normal, se utilizó la prueba de Mann Whitney para la comparación de medias de dos grupos independientes y Kruskal Wallis para la comparación de medias de más de dos grupos independientes.

## 7. RESULTADOS

El análisis de los resultados incluye el análisis descriptivo y analítico para la evaluación de daño genotóxico por el ensayo del cometa y polimorfismos del gen CYP1A1 en expuestos y no expuestos a plaguicidas. Del análisis se obtuvo la descriptiva poblacional de cada uno de los grupos de estudio, y luego se efectuó el análisis con los resultados obtenidos de los procedimientos de parámetros de genotoxicidad y genotipificación. La base de datos para este análisis se realizó con el programa SPSS versión 11.5 y 18.5.

Los datos poblacionales que se presentan han sido obtenidos a partir del análisis de las encuestas efectuadas a cada una de las personas incluidas en el estudio. El modelo de encuesta aplicada se adjunta en Anexo.

Después de hacer el análisis de las distintas variables, se ha considerado que los posibles factores de confusión a tener en cuenta en este estudio son los siguientes: la edad, el sexo, consumo de mate de coca. Dado que la incidencia de cáncer entre familiares podría ser un indicador de cierta sensibilidad frente a la exposición a agentes genotóxicos, la variable “familiar con cáncer” indica los casos de parientes directos que hayan sufrido la enfermedad. También se han tomado en cuenta en el estudio el hábito de fumar, el consumo de alcohol, el consumo de hojas de coca (acullico) y el chaqueo.

### *7.1. Estadística descriptiva de la población de estudio*

La población estudiada fue de 92 individuos provenientes de las comunidades de Kholá (42); Macamaca (25); Bravo (14); Cutty (3); Luribay (5); y otras comunidades (3).

El análisis demográfico de la población de estudio se presenta en la Tabla N°10, y en la figura N° 7 la distribución por comunidad de la población estudiada.

Tabla N°10. ANALISIS DEMOGRAFICO POR GÉNERO

<b>Variable</b>	<b>Femenino</b>	<b>Masculino</b>
<b>Expuesto</b>	16(17.4%)	47(51.0%)
<b>No Expuesto</b>	7(7.6%)	22(24.0%)
<b>Edad</b>		
<b>20 a 39</b>	13(14.1%)	38(42.0%)
<b>40 a 59</b>	6(6.5%)	22(24.2%)
<b>Más de 60</b>	4(4.3%)	9(9.9%)
<b>Municipio</b>		
<b>Sapahaqui</b>	16(17.4%)	52(56.5%)
<b>Luribay</b>	7(7.6%)	17(18.5%)
<b>Ocupación</b>		
<b>Agricultor</b>	22 (23.9%)	62 (67.4%)
<b>No agricultor</b>	1 (1.1%)	7 (7.6%)
<b>Estado civil</b>		
<b>Casado</b>	6(6.5%)	26(28.3%)
<b>Soltero</b>	4(4.3%)	17(18.5%)
<b>Concubino</b>	6(6.5%)	7(7.6%)
<b>Divorciado</b>	0(.0%)	1(1.1%)
<b>Dato no obtenido</b>	7(7.6%)	18(19.6%)
<b>Consumo de tabaco</b>		
<b>Fumador</b>	5 (5.4%)	28 (30.4%)
<b>No fumador</b>	18 (19.6%)	41 (44.6%)
<b>Consumo de alcohol</b>		
<b>Si</b>	14 (15.2%)	54 (58.7%)

<b>No</b>	9 (%)	15 (%)
<b>Mastica hojas de coca</b>		
<b>Si</b>	17 (18.5%)	49 (53.3%)
<b>No</b>	6 (6.5%)	20 (21.7%)
<b>Familiar con cáncer</b>		
<b>Si</b>	3 (3.3%)	4 (4.3%)
<b>No</b>	20 (21.7%)	65 (70.7%)

**TABLA Nº 11 Distribución por comunidad**

Válidos	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>Macamaca</b>	25	27,2	27,2	27,2
<b>Bravo</b>	14	15,2	15,2	42,4
<b>Khola</b>	42	45,7	45,7	88,0
<b>Luribay centro</b>	5	5,4	5,4	93,5
<b>Sanucachi</b>	1	1,1	1,1	94,6
<b>Anchallani</b>	1	1,1	1,1	95,7
<b>Poroma</b>	1	1,1	1,1	96,7
<b>Cutty</b>	3	3,3	3,3	100,0
<b>Total</b>	92	100,0	100,0	

En la figuras Nº 8 y 9 además de la tabla Nº 11 podemos apreciar cómo está distribuido nuestro universo de estudio, donde encontramos mayor participación en la comunidad de Khola, pero se puede deber a la mayor población.

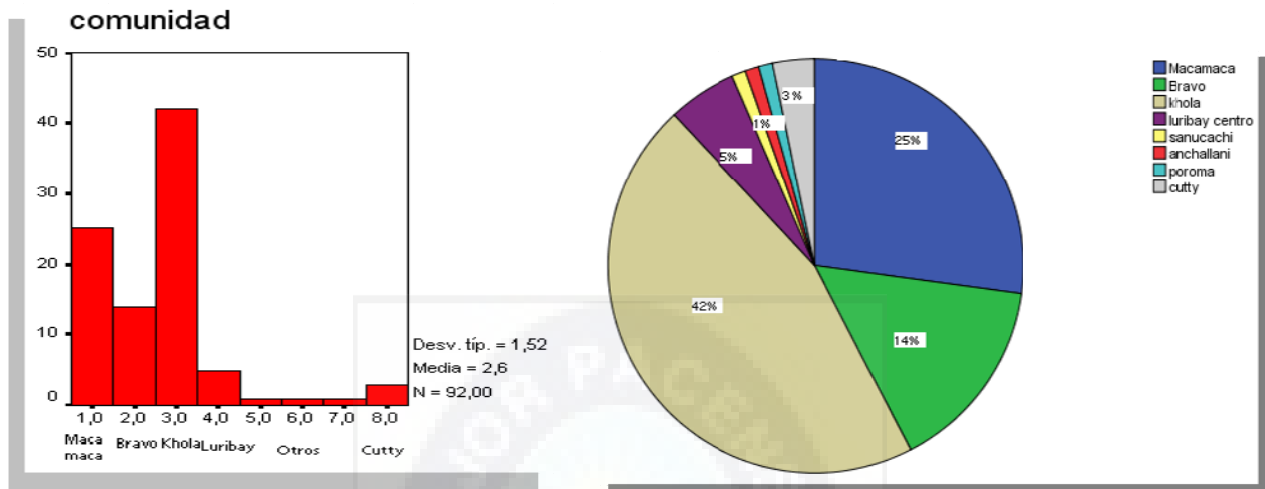


Figura N° 7 Distribución de frecuencias por comunidades

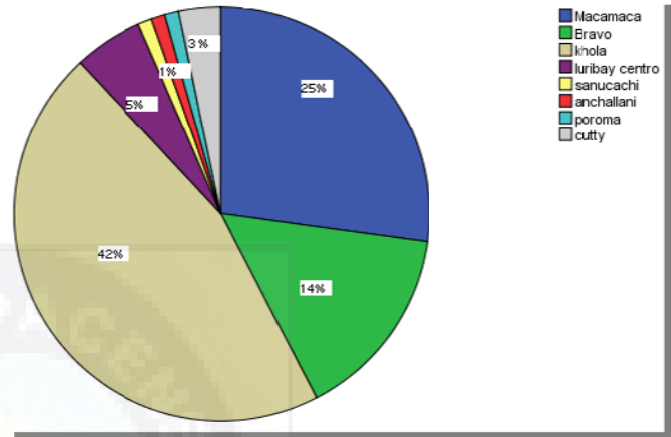


Figura N° 8 Distribución de frecuencias por comunidades

La mayoría de los que participaron en el presente estudio son agricultores en un 91.3 % y el restante 8.7% son estudiantes, profesores y otros.

**DISTRIBUCION POR OCUPACION**

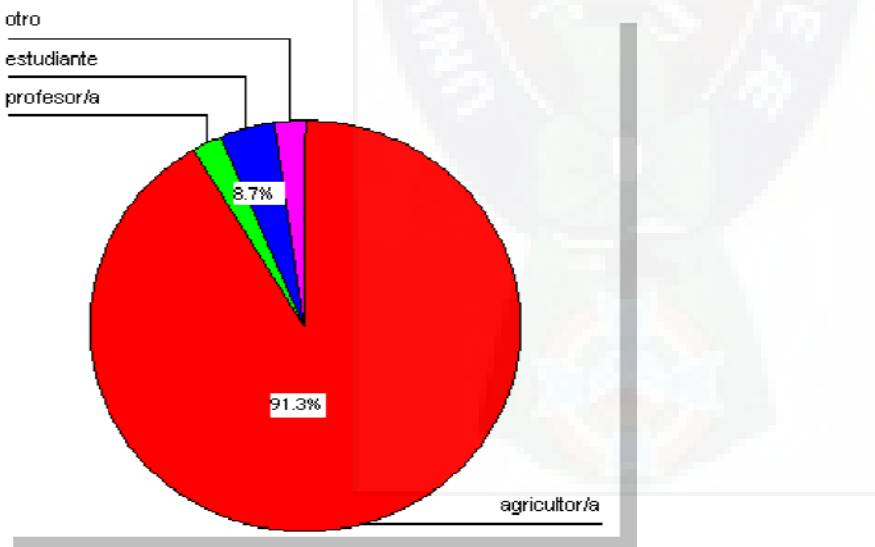


Figura N°9. Distribución por ocupación



De las 92 personas que participaron en el estudio, 91.3% fueron de ocupación agricultores, el 8.7% restante fue personal de salud y educación. El 18.6% fue del sexo femenino y el 81.4% del sexo masculino; el 35.8% tienen hábito tabáquico; el 73.9% consume bebidas alcohólicas. El 71.8% mastica hojas de coca. Un porcentaje muy bajo 7,6% tiene antecedentes familiares de cáncer.

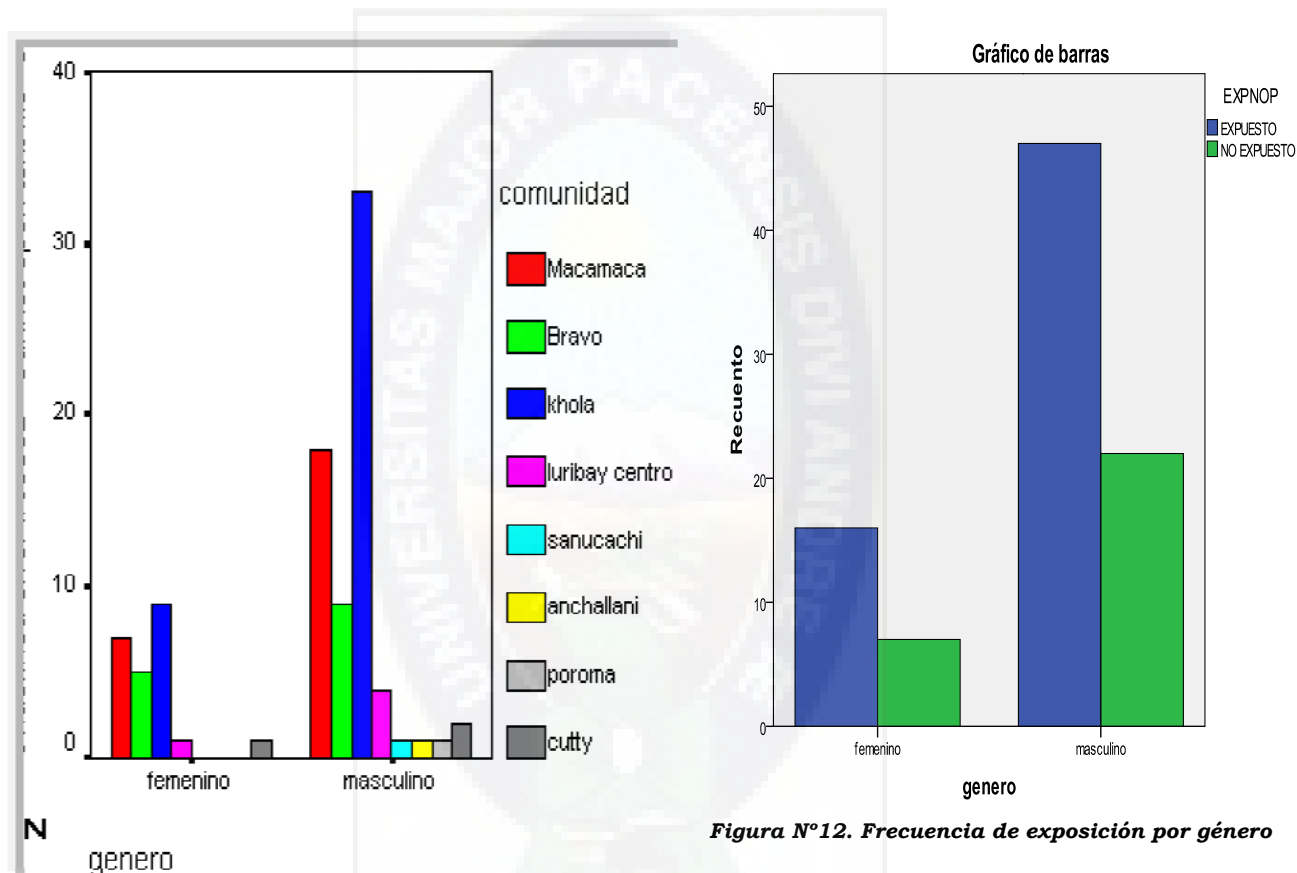
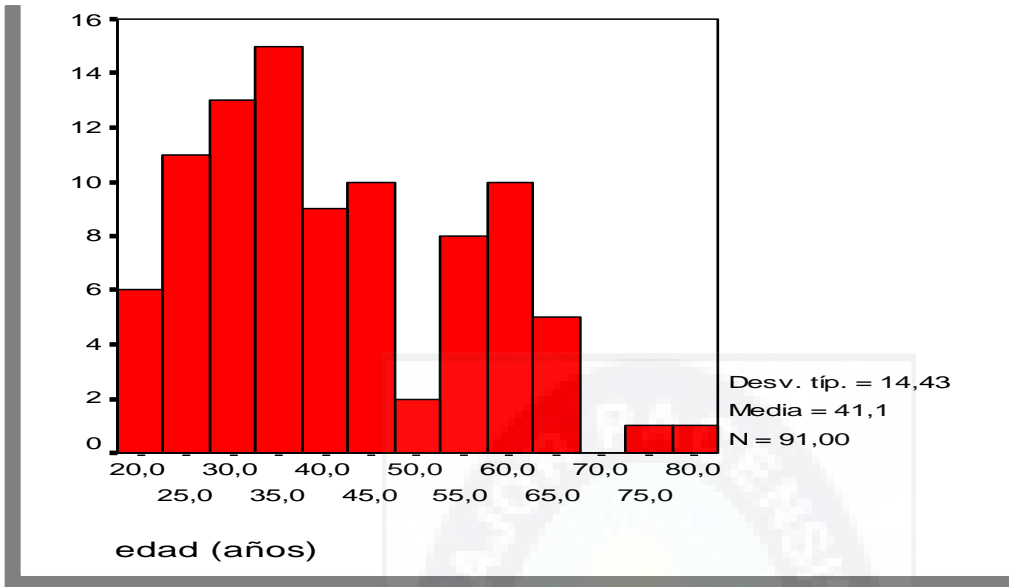


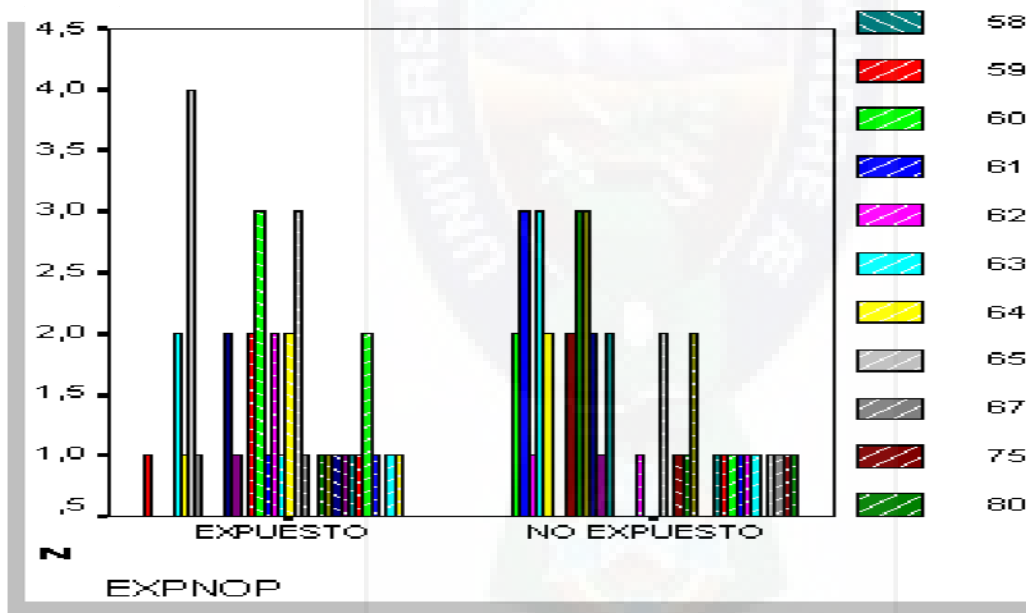
Figura N°10. Frecuencia por comunidad y género

Figura N°12. Frecuencia de exposición por género

Como se observa en la figura N°11 hay una mayor participación del género masculino y en una mayor proporción en la comunidad de Khola. En la figura N°11 se ve la exposición a plaguicidas en el género masculino triplicando el número del sexo femenino.



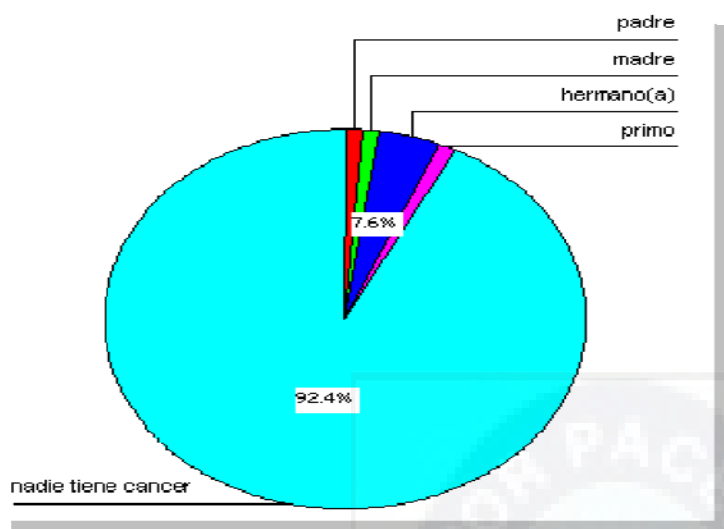
**Figura N°13. Distribución de frecuencias por edades**



**Figura N°14. Distribución de frecuencias de expuestos y no expuestos por edades**

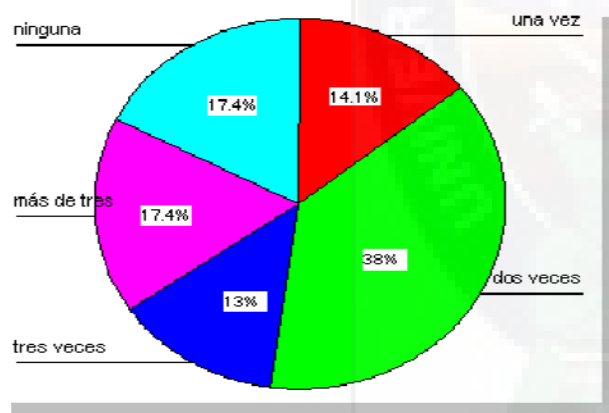
En las figuras N° 13 y 14 de distribución de frecuencias por edades podemos apreciar que hay una moda de 35 años, y una media de 41.1 años. Además también podemos observar que la moda en expuestos son los agricultores que rodean los 60 hasta 67 años de edad.

**Parientes con cáncer**



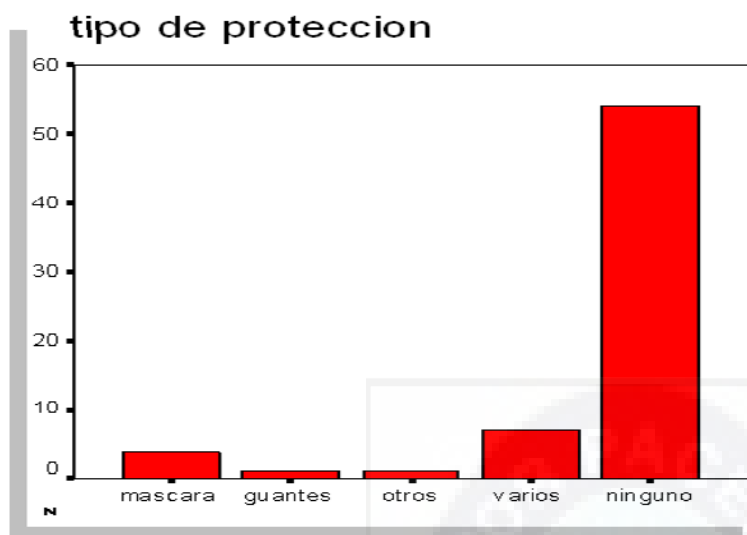
**Figura N°15. Distribución de familiares con cáncer**

La mayoría de la población estudiada no tiene parientes con cáncer, como podemos observar en la grafica de sectores, ya que un 92.4% no los tiene. (Figura N° 15)



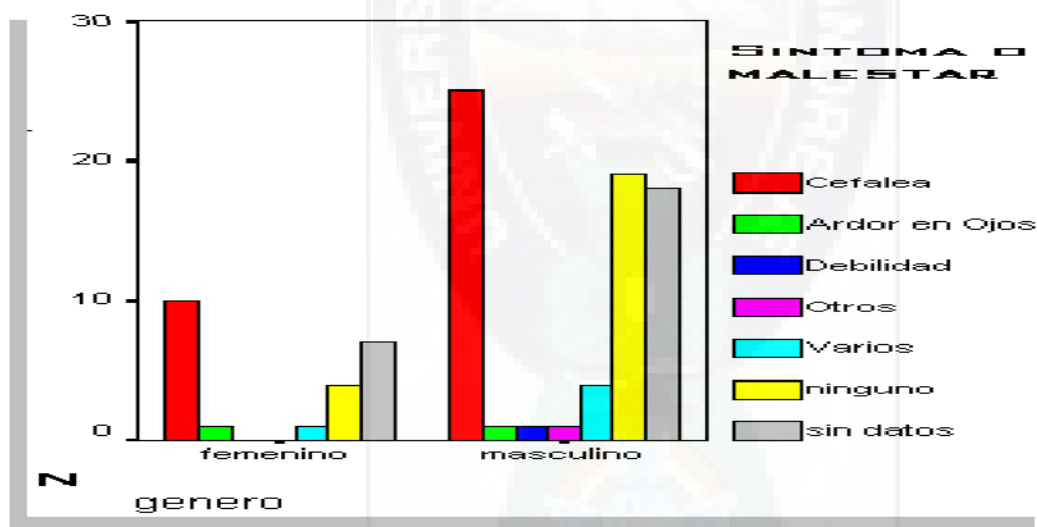
**Figura N°16. Distribución de veces de fumigación por mes**

En la figura N° 16 podemos observar cuantas veces fumigaron en el último mes antes del estudio. De las 92 personas encuestadas 13 fumigaron una vez (14.1%), 35 fumigaron dos veces (38.1%), 12 fumigaron tres veces (13.0%), 16 más de tres veces (17.4%), 16 personas ninguna (17.4%) acá hay que tener en cuenta a personas que no son agricultores.



**Figura N° 17. Tipo de protección al momento de fumigar**

En la figura N° 17 se puede apreciar el tipo de protección al fumigar donde claramente se aprecia que la mayoría de los agricultores no utiliza protección al fumigar.



**Figura N° 18. Sintomatología en expuestos a Plaguicidas**

En la sintomatología causada por la exposición a los plaguicidas lo más frecuente fue la cefalea por la aspiración de partículas de la mezcla de los diferentes plaguicidas. El segundo malestar fue el ardor de ojos. (Figura N° 18).

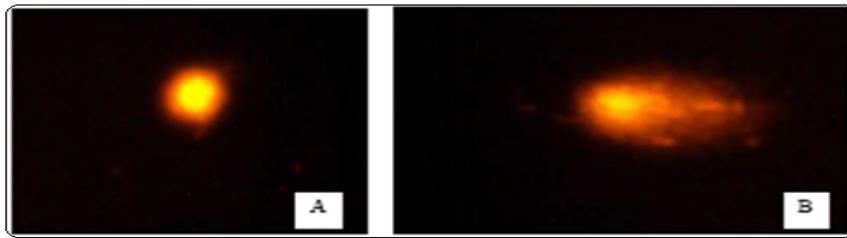
**Tabla N°12. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

<b>Variable</b>	<b>Femenino N(%)</b>	<b>Masculino N(%)</b>	<b>Total N(%)</b>
<b>Tipo de sujeto</b>			
<b>Expuesto a plaguicidas</b>	16(17.4%)	47(51.0%)	<b>63(68.4%)</b>
<b>No expuesto a plaguicidas</b>	7(7.6%)	22(24.0%)	<b>29(31.6%)</b>
			<b>92(100%)</b>
<b>Veces de fumigación/mes</b>			
<b>1 vez</b>	7(7.6%)	6(8.7%)	<b>13(14.1%)</b>
<b>2 veces</b>	6(6.5%)	29(31.5%)	<b>35(38.0%)</b>
<b>3 veces</b>	1(1.1%)	11(12.0%)	<b>12(13.0%)</b>
<b>Más de 3</b>	4(4.3%)	12(13.0%)	<b>16(17.4%)</b>
<b>Ninguna</b>	5(5.4%)	11(12.0%)	<b>16(17.4%)</b>
			<b>92(100%)</b>
<b>Uso de ropa de protección</b>			
<b>Si</b>	18(19.5%)	48(52.2%)	<b>66(71.7%)</b>
<b>No</b>	5(5.4%)	21(22.9%)	<b>26(28.3%)</b>
			<b>92(100%)</b>
<b>Habito tabáquico</b>			
<b>Fumador</b>	5(5.4%)	28(30.4%)	<b>33(35.9%)</b>
<b>No fumador</b>	18(19.6%)	41(44.6%)	<b>59(64.1%)</b>
			<b>92(100%)</b>
<b>Veces de chequeos al año</b>			
<b>1 vez</b>	6(6.5%)	13(14.1%)	<b>19(20.7%)</b>
<b>2 veces</b>	1(1.1%)	3(3.3%)	<b>4(4.3%)</b>
<b>3 veces</b>	1(1.1%)	2(2.2%)	<b>3(3.3%)</b>
<b>Ninguna</b>	15(16.3%)	51(55.4%)	<b>66(71.7%)</b>
			<b>92(100%)</b>
<b>Consumo de alcohol</b>			
<b>1/sem</b>	0(0.0%)	2(2.2%)	<b>2(2.2%)</b>

<b>2/mes</b>	0(0.0%)	4(4.3%)	<b>4(4.3%)</b>
<b>Ocasional</b>	14(15.2%)	48(52.2%)	<b>62(67.4%)</b>
<b>No bebe</b>	9(9.8%)	15(16.3%)	<b>24(26.1%)</b>
<b>92(100%)</b>			
<b>Habito de mascar coca</b>			
<b>c/día</b>	11(12.0%)	36(39.1%)	<b>47(51.1%)</b>
<b>1/sem</b>	1(1.1%)	6(6.5%)	<b>7(7.6%)</b>
<b>1/mes</b>	1(1.1%)	0(0.0%)	<b>1(1.1%)</b>
<b>Ocasional</b>	4(4.3%)	7(7.6%)	<b>11(12.0%)</b>
<b>No mastica</b>	6(6.5%)	20(21.7%)	<b>26(28.3%)</b>
<b>92(100%)</b>			
<b>Consumo de mate de coca</b>			
<b>Si</b>	6(6.5%)	21(22.8%)	<b>27(29.3%)</b>
<b>No</b>	3(3.3%)	5(5.4%)	<b>8(8.7%)</b>
<b>Dato no obtenido</b>	14(15.2%)	43(46.7%)	<b>57(62.0%)</b>
<b>92(100%)</b>			
<b>Familiar con cáncer</b>			
<b>Si</b>	3(3.3%)	4(4.3%)	<b>7(7.6%)</b>
<b>No</b>	20(21.7%)	65(70.7%)	<b>85(92.4%)</b>
<b>92(100%)</b>			
<b>Expuesto a rayos X</b>			
<b>Si</b>	4(4.3%)	25(27.2%)	<b>29(31.5%)</b>
<b>No</b>	19(20.7%)	38(41.3%)	<b>57(62.0%)</b>
<b>No sabe</b>	0(0.0%)	6(6.5%)	<b>6(6.5%)</b>
<b>92(100%)</b>			

## 7.2. Efecto genotóxico por el ensayo del cometa por registro visual

El efecto genotóxico evaluado a través del ensayo del cometa se puede observar en la figura 17 a y el b).



(Fuente Tirado Noemí et.al)

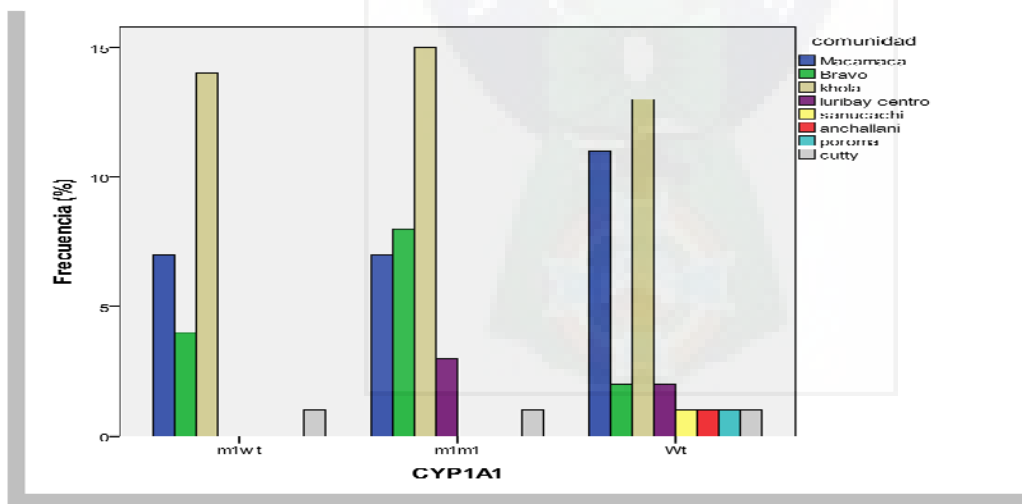
**Figura N°19. a) Célula sin daño genotóxico b) Célula con daño genotóxico.**

En la figura se observan los datos del score del cometa en expuestos y no expuestos donde se aprecian diferencias estadísticamente significativas.

### 7.3. Polimorfismos de la Citocromo p 450

El análisis de los polimorfismos de la CYP1A1 fue realizado por PCR RFLP en un total de 92 personas. En la tabla se muestran las frecuencias de los distintos genotipos para los genes CYP1A1 observados en la población total estudiada,

En la cual un 59,1% presenta el gen homocigoto silvestre c1c1, un 36,5% presenta el gen heterocigoto c1 c2, y un 4,4% presenta el gen mutado c2c2.



**Figura N° 20. Frecuencia de distribución en genes mutados por comunidad.**

En la figura 19 se muestran las frecuencias de los polimorfismos CYP1A1 distribuidos por comunidad, pudiéndose apreciar que en las comunidades de Khola, Macamaca, Luribay centro se encuentran los individuos con el gen mutado 2, 1 y 1 respectivamente.

**Tabla N°13. Citocromo P450 (CYP1A1)**

Polimorfismos		Frec.	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
<b>Válidos</b>	<i>m1wt</i>	26	24,1	28,3	28,3
	<i>m1m1</i>	34	31,5	37,0	65,2
	<i>Wt</i>	32	29,6	34,8	100,0
	<b>Total</b>	92	85,2	100,0	
<b>Perdidos</b>	<i>Sistema</i>	16	14,8		
<b>Total</b>		108	100,0		

En la tabla 12 podemos apreciar frecuencias y porcentajes de la CYP1A1, donde resalta los válidos y los perdidos en el sistema (16) con un porcentaje de 14.8%, los cuales el programa SPSS versión 18 no los registro, esto por posibles faltas en el llenado de información al banco de datos.

**Tabla N° 14 Parámetro del Citocromo P calculado por formula**

Citocromo P	Media	N	Desv. típ.	Error típ. de la asimetría
<b>m1wt</b>	56,67	24	50,352	,472
<b>m1m1</b>	53,89	28	45,607	,441
<b>Wt</b>	48,50	28	45,707	,441
<b>Total</b>	52,84	80	46,632	,269



Tabla N° 15

<b>Polimorfismo</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>E. T.</b>	<b>P</b>
<b>CYP1A1</b>				
<b>m1wt</b>	24	41,92	,472	<b>0,694</b>
<b>m1m1</b>	28	42,30	,441	
<b>Wt</b>	<b>28</b>	<b>37,48</b>	,441	

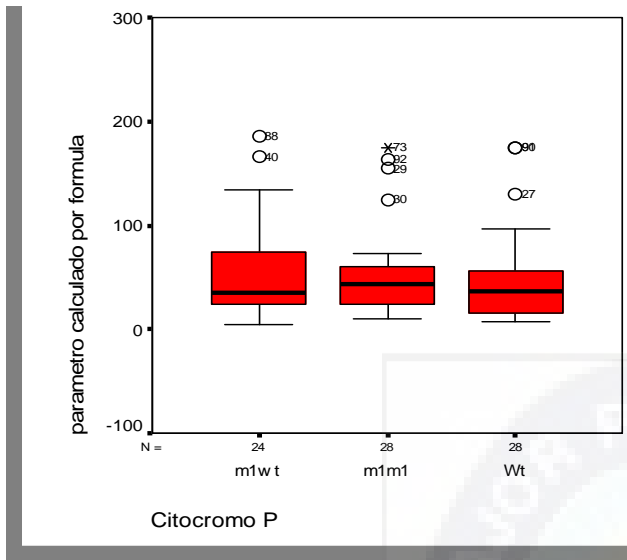
a U Mann-Whitney; nivel de significancia  $p=0,2$ ,  $p=0,3$ ; b Kruskal Wallis  $p=0,4$

ET: Error Típico

Tabla N° 16

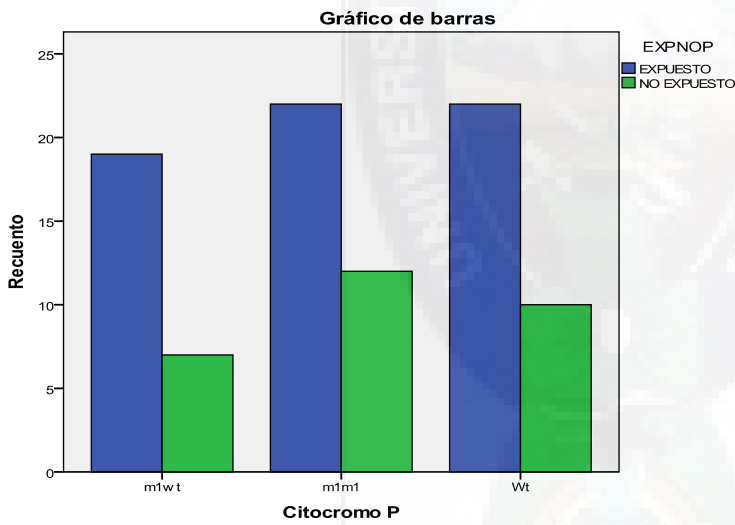
<b>Tabla de contingencia habito tabáquico * Citocromo P</b>				
<b>Habito tabáquico</b>	<b>Citocromo P</b>			<b>Total</b>
	<b>m1wt</b>	<b>m1m1</b>	<b>Wt</b>	
Fumador	12	15	6	33
No fumador	14	19	26	59
Total	26	34	32	92

En la tabla N° 16 podemos observar la si el habito tabáquico influye en nuestro estudio con respecto a si se presenta polimorfismos en el Citocromo P.



\*(p < 0.05, Prueba de Kruskal-Wallis)

**Figura N°21.** Heterocigoto mutado (m1wt), Homocigoto (m1m1), wild type (wt).



**Figura N°22.** Polimorfismos expuestos y no expuestos

En esta grafica podemos evidenciar los polimorfismos en expuestos y no expuestos.

TABLA N° 17

Tabla de contingencia Citocromo P* comunidad									
Recuento CYP1A1	Comunidad								Total
	Maca maca	Bravo	Khola	Luribay centro	Sanucachi	Anchallani	Poroma	Cutty	
m1wt	7	4	14	0	0	0	0	1	26
m1m1	7	8	15	3	0	0	0	1	34
Wt	11	2	13	2	1	1	1	1	32
<b>Total</b>	25	14	42	5	1	1	1	3	92

En la tabla de contingencia de recuento de CYP1A1 por comunidad encontramos la variabilidad que existe con respecto a los citocromos p 450 (m1wt, m1m1 y Wt) donde encontramos 11 Wt en Macamaca de 25, 2 en Bravo 13 en Khola, 2 en Luribay centro y en las demás comunidades 1, la que está presente en todas las comunidades de estudio.

La CYP1A1 (m1m1) se encontró en mayor proporción 34 de 92 pero la cual no está presente en Sanucachi, Anchallani y Poroma. La menor proporción fue dada por la CYP1A1 (m1wt) con 26 de 92 que tampoco se presentó en las comunidades donde no encontramos m1m1, pero además también en Luribay centro.

## 8. DISCUSIÓN

El universo de estudio que fueron las poblaciones de los Municipios de Sapahaqui y Luribay, por sus características netamente agrícolas, están en una continua exposición a plaguicidas todo el año, debido a que la mayoría de las personas (90%) realizan rotación de cultivos en sus parcelas de acuerdo a las épocas del año, otra situación que agrava la exposición de los agricultores a los diferentes plaguicidas es la asociación de cultivos, puesto que no solo utilizan un tipo de plaguicida sino una mezcla compleja.

De las 7 comunidades estudiadas, Kholá fue la que participó en mayor porcentaje (42%), luego Macamaca (25%), Bravo (14%), Luribay Centro (5%), Cutty (3%), Anchallani (1%), Poroma (1%) y finalmente Sanucachi (1%).

Los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas laboralmente expuestas a diferentes agentes, constituye en la actualidad el objetivo de numerosos estudios. Cualquier exposición a productos peligrosos debe ser evitada en la medida de lo posible. Los individuos que, debido a su trabajo, están en contacto directo con productos tóxicos o genotóxicos ven incrementada la probabilidad de sufrir efectos adversos sobre la salud y, es por ello, que han sido y son el objeto de estudio de numerosas investigaciones, principalmente epidemiológicas y toxicológicas.

No todas las investigaciones sobre exposiciones a agentes potencialmente peligrosos se traducen en un incremento de daño o en alteraciones inmunológicas o bioquímicas. Así, por ejemplo en el estudio de Surralles y col., 1997, no se observa un aumento de las anomalías cromosómicas. A pesar de que la exposición de los individuos sea a benceno, un reconocido agente clastogénico y carcinogénico en humanos.

Considerando la clasificación química de los plaguicidas (Antezana O., 1998) los agricultores participantes en este estudio, utilizaron los siguientes: Acetamida/ditiocarbonato, Organofosforado, Piretroide, Inorgánico, Carbamato, Ditiocarbamato, Piretroide/organofosforado, pero en su mayoría utilizaron *mezclas* de plaguicidas piretroide/organofosforado de clase II, como ser el Lorsban plus, organofosforados de clase II (altamente toxico) como ser tomaron y organofosforado de clase III (moderadamente toxico) como ser Curacron, Dimetoato, etc. Estos tipos de plaguicidas actúan en el organismo inhibiendo la actividad enzimática de la acetilcolinestara por fosforilación, enzima encargada de hidrolizar la neurotransmisión de la acetilcolina, produciendo efectos tóxicos en el organismo (Obiols, 1998). También utilizaron Piretroides (nurelle y cipertrín) que son neurotóxicos que actúan sobre los ganglios basales del sistema nervioso central, estos no inhiben las colinesterasas. Estos datos llaman la atención debido a que el uso de estos tipos de plaguicidas aumenta el riesgo de contraer enfermedades relacionadas con desordenes neurológicos, ya que existen estudios que han demostrado la asociación entre exposición excesiva a plaguicidas, especialmente organofosforados, y enfermedades neurológicas, como ser la enfermedad de Parkinson. Engel, (2001)

En este estudio el 20.7% de los agricultores de Sapahaqui y Luribay, chequean 1 vez al año y el 4.5% 2 veces al año y 3.3 % tres veces al año, en cuanto a la frecuencia de fumigación, el 14.1% fumigo 1 vez, el 38.0% dos veces y el 13.0% más de 3 veces en el último mes, condiciones que suponen un uso permanente de plaguicidas durante todo el año y por varios años, adicionalmente están expuestos a otros factores de riesgo, habito de masticar coca, consumo de tabaco, alcohol entre otros. Estas condiciones cumplen las características de la evaluación genotóxica, cuyo requisito particular es la exposición a largo plazo y a dosis subtoxicas.

Los ensayos empleando biomarcadores son particularmente valiosos para la detección y cuantificación de la toxicidad cuando los organismos están expuestos a mezclas de sustancias (Walker, 1998). Entre los plaguicidas que han sido estudiados existen 28 que producen efecto genotóxico demostrable a nivel experimental y 19 considerados probables cancerígenos categoría B2 por la Environmental Protection Agency (EPA).

Estudios realizados por Bian y col. 2004 con el propósito de determinar la integridad del DNA espermático nuclear e investigar la relación de la exposición entre fenvalerato, (insecticida piretroide sintético) y daño al DNA del espermatozoide mediante el ensayo del cometa, el Momento Olive y el porcentaje del DNA de la cola mostraron que las personas expuestas a fenvalerato está asociado con un aumento en el daño al DNA espermático y que influye en la función espermática y en la fertilidad masculina.

El presente estudio al igual que estudios anteriores realizados en Bolivia (Ascarrunz et ál. 2006, Larrea et ál. 2008 y Tirado et ál. 2010) revelan que existe un incremento de daño genotóxico utilizando el ensayo del cometa, de individuos expuestos a mezclas de plaguicidas. Como es bien conocido, muchos de los efectos adversos para la salud son el resultado del daño genético inducido por agentes genotóxicos, tanto en las células somáticas como en las germinales. Si el daño se produce en la línea somática, entre otros efectos, puede derivar en cáncer (Bishop, 1987; Aust, 1991); contribuir al envejecimiento prematuro (Rattan, 1991; DeMarini y col., 1994); producir enfermedades vasculares, entre otros. Al realizar el análisis de los resultados del ensayo del cometa por Municipios se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $P=0,000$ ) encontrándose mayor daño en el municipio de Luribay en relación al de Sapahaqui.

La caracterización genotípica está adquiriendo un peso importante en los estudios epidemiológicos ambientales, así como en la interpretación de los procesos

cancerígenos. Se intenta comprender por qué los individuos reaccionan de manera diferente frente a la exposición de un agente. Y es entonces donde se pone en juego, entre otros aspectos, la determinación de los perfiles metabólicos individuales.

En este estudio, se analizaron en 92 muestras, las variantes alélicas de CYP1A1, enzima que bioactiva hidrocarburos aromáticos como el benzo(a)pireno transformándolos en epóxidos y productos fenólicos mutagénicos y carcinogénicos; por consiguiente, una alta actividad enzimática puede predisponer a los pacientes al riesgo de cáncer por aumento de los compuestos carcinogénicos a nivel de los tejidos.

Muchos de los cancerígenos requieren activación metabólica antes de poder ser activos y otros sufren inactivación después de ser metabolizados. Por lo tanto, las variaciones individuales en la capacidad metabólica son importantes en la inducción de una mutación o en el desarrollo de un cáncer y, por consiguiente, en los estudios de biomonitorización. Según las variantes génicas (polimorfismos) que un individuo posea, le conferirá mayor o menor susceptibilidad frente a sustancias con potencial genotóxico, como lo son muchos de los plaguicidas.

El metabolismo de muchos xenobioticos es catalizado por enzimas de las familias supergénicas de la fase I, citocromo P450 (CYP), y de la fase II, glutatión S-transferasas (GST). Estas familias están involucradas en la respuesta adaptativa a las agresiones de los productos químicos ambientales. Se cree que la coordinación de expresión de estas dos familias enzimáticas es necesaria para garantizar la eficiencia en la detoxificación de mutágenos tales como los plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos,

nitrosaminas, fenoles, cloroformo y otros. Por lo tanto, con su determinación estas enzimas se convierten en biomarcadores de susceptibilidad.

Actualmente las principales enzimas conocidas involucradas en el metabolismo de sustancias cancerígenas pertenecen a las familias citocromo P450 y glutatiónS-transferasa. Estas participan en la activación y desintoxicación de sustancias que podrían actuar como factores de riesgo o de protección de cáncer gástrico. Las sustancias cancerígenas pueden provenir de los alimentos, drogas u otro tipo de sustancias químicas que ingresan al cuerpo o de sustancias endógenas (LangyPelkonen1999). Los individuos que cargan la forma más activa de una enzima relacionada con la activación de los carcinógenos, o los alelos menos eficientes de las enzimas de desintoxicación, podrían presentar un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Krajinovic et al.1999).

Se considero oportuno el realizar el estudio del gen CYP1A1 como fuente de variabilidad individual, que podía afectar a los resultados citogeneticos, el estudio se compara con resultados de estudios realizados en Perú y Chile, variando en el tamaño muestral y con variabilidad genética ya que el valor p en las pruebas de U Mann-Whitney (nivel de significancia  $p=0,2$ ,  $p=0,3$ ), y Kruscal Wallis ( $p=0,4$ ) no son significativas ( $p=0,694$ ).

Respecto a los polimorfismos CYP1A1 los individuos con el gen homocigoto mutado presentaron un mayor número de en relación a los heterocigotos y a los homocigotos, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Muchos artículos se han escrito acerca de las interacciones genéticas y genético-ambientales, de su relación con la susceptibilidad a diferentes tipos de cáncer, y, en especial, sobre polimorfismos en genes de que codifican para determinadas vías metabólicas en el organismo.



Los resultados obtenidos muestran que los genotipos de CYP1A1 denominados de riesgo (m1wt), por sí solos no se encuentran asociados a cáncer, sin embargo, en individuos fumadores o bebedores, la asociación es muy clara, con valores de riesgo muy superiores a los obtenidos para cada uno de los factores individuales. Esto se debería a que para la manifestación del riesgo es necesario considerar el factor ambiental, dado que, si bien es cierto se ha sugerido que el alelo m2 de CYP1A1 (Carrano AV;1999) sería responsable de una mayor actividad de la enzima, se requiere la presencia del sustrato para su manifestación clínica, es decir, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, los que son componentes importantes del humo del cigarrillo y presente también en el humo de chaqueos, en general, de los procesos de combustión incompleta de materia orgánica. A pesar de que el alcohol no es sustrato de la enzima CYP1A1, se observó una asociación significativa, esto podría deberse a que, en general, los individuos fumadores son los mismos bebedores, por lo que existe una autocorrelación que no permite una disociación entre estos dos factores. Por otro lado, ha sido demostrado que el alcohol potencia la formación de aductos de benzo(a)pi-reno, lo que en parte podría explicar la asociación observada.

Numerosos estudios epidemiológicos han sugerido un mayor riesgo de cáncer de pulmón en individuos portadores de una sola copia del alelo CYP1A1 \* 2A variante en América del Norte (predominantemente caucásica, en los escandinavos, y en otras poblaciones étnicas). También demostró una asociación de heterocigosidad para el CYP1A1 \* 2B variante con un incremento de 2 veces en el riesgo de cáncer de pulmón en México y los afro-americanos, y al (Dresler

et al.) encontraron un mayor riesgo de cáncer de pulmón en un grupo de mujeres, la gran mayoría de los cuales fueron heterocigotos para CYP1A1 \* 2C, el aumento del riesgo fue particularmente evidente cuando se combina con GSTM1 nulo. En contraste, un reciente meta-análisis de Houlston encontraron poca evidencia para apoyar una asociación de CYP1A1 2A \* o \* variantes 2C con el riesgo de cáncer de pulmón. El polimorfismo genético del CYP-450 y diversos factores biológicos y sociales como la dieta, la presencia de otras enfermedades, el uso de medicamentos y sus interacciones, entre otros contribuyen a la gran variabilidad que se observa en el metabolismo de los medicamentos como de los xenobioticos, incluso en una misma persona. Sin embargo, solo en los últimos años se han investigado las bases genéticas de los citocromos y se han dilucidado los mecanismos de acción de algunos complejos químicos y su metabolismo, lo que ha permitido caracterizar el proceso de biotransformación.

En la presente investigación se utilizaron dos biomarcadores de efecto el ensayo del cometa y su relación con el gen *CYP1A1* y se lograron establecer mediante la comparación de resultados obtenidos en el estudio con publicaciones en revistas científicas referentes al tema. También este estudio podría tener relevancia transegeneracional por que en las siguientes generaciones descendientes de los agricultores que ahora son objeto de nuestro estudio se pudiera presentar deficiencias inmunológicas, predisposición a cáncer de estomago, mama, próstata entre otros, sirviendo así para posteriores estudios de los descendientes de los agricultores.

## 9. CONCLUSIONES

Después de la discusión sobre los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Se logro determinar que la influencia de los polimorfismos de la Citocromo p450 CYP1A1 la cual no es estadísticamente significativa para el ensayo del cometa con el cual se detectó daño genético por la exposición a plaguicidas.
- Se establecieron las isoformas del gen *CYP1A1*.
- Se ha demostrado que la ausencia de los *genes* que codifican enzimas de biotransformación de xenobioticos constituye un factor importante para determinar la magnitud del riesgo de tener enfermedades crónicas degenerativas.
- Factores modificadores son los hábitos tabáquicos como los más sobresalientes, además de edad, fumigación y sexo, por lo que estos factores deben ser tomados en cuenta para la realización de evaluaciones citogenéticas.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam SM. Pesticides; Health and environmental hazards. Available at: [www.dawn.com/2006/11/13/ebr5.ht](http://www.dawn.com/2006/11/13/ebr5.ht). Accessed on 15 January, 2008.
- Albertini RJ. Why use somatic mutations for human biomonitoring. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; (23 suppl. 24) 18 – 22.
- Alldrick, A. J.: Modification of in vivo Heterocyclic amine genotoxicity by dietary flavonoids. *Mutagenesis.* 1989. 4: 365 – 370.
- Allen RH, Gottlieb M, Clute E, Pongsiri MJ, y col. Breast cancer and pesticides in Hawaii: the need for further study. *Environ. Health Perspect.* 1997; (105 suppl. 3) 679 – 683.
- Anttila S, Hirvonen A, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Hayes JD, Ketterer B. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung. *Cancer Res* 1993;53:5643–5648.[Abstract/Free Full Text]
- Anwar WA. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ. Health Perspect.* 1997; (105 suppl. 4) 801 – 806.
- Ascarrunz M.E. Tirado N. Gonzales A.R. Cuti M. Cervantes R. Huici O. Jors E.; Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca, y Mecapaca, expuestos a plaguicidas; Cuadernos del Hospital de Clínicas vol. 50 No2, 2005: 29 – 31.
- Aust AE. Mutations and cancer. In: *Genetic toxicology* A. H. Li. R. H. Heflich (eds) CRC Press. Florida, 1991: 93-117.
- Bejarano, F. Plaguicidas. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. [www.laneta.apc.org/emis/sustanci/plaguici/plagui.htm#nom](http://www.laneta.apc.org/emis/sustanci/plaguici/plagui.htm#nom)
- Betti C., Davini L., Giannesi N., Loprieno. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mut. Res.* 1994. 307: 323-333.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research.* 2003;543: 251-272.
- Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenetic and Genome Research* 2004; 104:376-382.
- Bowery TG, Gabrielsen GN, Skaare JU. Biomagnification of organochlorine a long a Barents. *Sea Food. Chem.* 1965: (13) 356 – 359.
- Branda RF, O'Neill SP, Sullivan LM, Albertini RJ. Factors influencing mutation at the hprt locus in T-lymphocytes: women treated for breast cancer. *Cancer Res.* 1991;(51) 6603 – 6607.
- Carbonell E, Puig M, Xamena N, Creus A, Marcos R. 1995. Sister chromatid exchanges in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagen* 5:403–405.
- Carrano AV, Moore DH. The rationale methodology for quantifying sister-chromatid exchanges in humans Heddie J. A. *New Horizons in Genetic Toxicology.* Academic Press New York. 1982; 99: 267-304.
- Castillo L, Chaverri F. Manual de plaguicidas, guía para América Central. Costa Rica. 1995: 7 – 9.
- Cervantes M.R. y col. Diagnóstico, Tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas por plaguicidas; Proyecto PLAGBOL, La Paz - Bolivia, 2003: 9 – 14.

- Costantini AS, Miligi L, Kriebel D y col. A multicenter case-control. Study in Italy on hematology neoplasms and occupation. *Epidemiology*. 2001; (12) 78 – 81.
- Collins Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 2004;(26)249-261.
- Cook DG, Strachan DP. Health effects of passive smoking. 10: summary of the effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax* 1999;54:357–366.[Abstract/Free Full Text]
- Cuenca P., Ramírez R. Castro. Efecto genotóxico de los plaguicidas en una población ocupacionalmente expuesta. Evaluación por medio de micronúcleos de linfocitos y del epitelio bucal, aberraciones cromosómicas, mecanismos de reparación y electroforesis de células únicas, controlando paralelamente los niveles de colinesterasa sérica y eritrocítica. Proyecto PLAGSALUD/ MASICA, San José, Costa Rica. 1997:62.
- D.M. Parkin, S.L. Whelan, J. Ferlay, L. Teppo, D.B. Thomas(Eds.), *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. VIII, No 155, IARC Scientific Publications, Lyon, France, 2003.
- Daniel V, Huber W, Baverk K y col. Association of elevated blood levels of pentachlorophenol with cellular and humoral immunodeficiencies. *Arch. Environ. Health*. 2001;56) 77 – 83.
- Dyer S M, Catan M, Pisaniello DL y col. Peripheral cholinesterase inhibition by occupational chlorpyrifos exposure in Australian termiticide applicators. *Toxicology*. 2001: (169) 177 – 185.
- Eisner MD, Forastiere F. Passive smoking, lung function, and public health. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1184–1185.[Free Full Text]
- Escriche, I. *Toxicología Industrial de Alimentos*, Universidad Politécnica de Valencia, España. 1996:56.
- Fenech M, Morley AA.: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. 1985: (147)29-36.
- Fisher SW. Changes in the toxicity of three pesticides as a function of environmental pH and temperature. *Bull. Environ. Toxicol*. 1991: (46) 197 – 202.
- Gabbianelli R, Nasuti C, Falcioni G, Cantalamessa F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology* 2004; 203: 17-26.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J.Appl Toxicol* 2002; 22: 249-255.
- García, C. M. 1997. Evaluación de la contaminación de plaguicidas organoclorados en La Comarca Lagunera. Tesis Doctoral. Col. de Postgraduados. México.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie A-K, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, *et al*. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1239–1248.[Abstract/Free Full Text]
- Gilliland F, Lee YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:429–436.[Abstract/Free Full Text]
- González, M. 2003. Polimorfismos en los genes de desintoxicación química CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 y GSTM1 en la susceptibilidad al cáncer gástrico. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 77 p.

- Foundas M, Hawkrigg NC, Smith SM, Devadason SG, Le Souef PN. Urinary cotinine levels in early pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1997;37:383–386.[Medline]
- Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberd H, Mikoczy Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health*. 2001; 2204(1): 43-47.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000;61:154–166.[CrossRef][Medline]
- Holsapple MP. Autoimmunity by pesticides: a critical review of the state of the science. *Toxicol Lett*. 2002: 127, 101-109.
- Huici O. El mundo de los plaguicidas. Fundamentos técnicos para el uso y manejo correcto de plaguicidas. 2ª. ed . Bolivia. 2007: 1
- Instituto Nacional de Salud Ocupacional. Investigación sobre intoxicación de trabajadores agrícolas por plaguicidas. Bolivia. 1990: 31 – 32, 45 – 50.
- Kawajiri, K. 1999. CYP1A1. pp. 159-172. In P. Vineis, N.Malats, M. Lang, A. D' Errico, N. Caporaso, J. Cuzick & P. Boffeta (eds.). *Metabolic polymorphisms*.
- Krauer B, Dayer P. Fetal drug metabolism and its possible clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1991;21:70–80.[Medline]
- Kremlin R. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. 5ta. ed. México. 1992:13 – 18.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*.1997: 137-148.
- Laffon B., Perez B., Méndez J. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. Departamento de biología celular y molecular. Universidad de Coruña. 2004: 100.
- Lara G. Plaguicidas en la biodiversidad del suelo: su comportamiento como contaminantes. [www.biociencias.org/odisea/plaguicidas/](http://www.biociencias.org/odisea/plaguicidas/). Tiu, C. Plaguicidas -La salud del niño y el ambiente-. 2003. [www.ssa.gob.mx/unidades/dirgsa/downloads/saludinf/cap07.pdf](http://www.ssa.gob.mx/unidades/dirgsa/downloads/saludinf/cap07.pdf).
- Lee KA, Kim SH, Woo HY, Hong YJ, Cho HC. Increased frequencies of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) gene deletions in Korean patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 2001;98:3483–3485.[Abstract/Free Full Text]
- Le Souef PN. Paediatric origins of adult lung diseases: tobacco related lung diseases begin in childhood. *Thorax* 2000;55:1063–1067.[Free Full Text]
- Li R, Boerwinkle E, Olshan AF, Chambless LE, Pankow JS, Tyroler HA, Bray M, Pittman GS, Bell DA, Heiss G. Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoking-related coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;149:451–462.[CrossRef][Medline]
- Lofroth G. Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat Res* 1989;222:73–80.[CrossRef][Medline]
- Loewy, R. M. 2000. Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquen. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Comahue. Argentina.
- Márquez ME, López JB, Londoño M, et.al. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *IATREIA* 2003; 16 (4): 275-282
- Meneses, M. H, R. 2001. Contaminación de Suelos por el uso de plaguicidas. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM. México.

- Mora MA, Popoulias D, Nava J, Buckler DR. A comparative assessment of contaminants in fish from four reservoirs of the Texas, USA – Tamaulipas, Mexico border region. *Environ. Ind.* 2001 (27) 15 – 20.
- Mudry M., Carballo A. *Genética Toxicológica*. 1ra. ed. Buenos Aires. 2006:221 -229.
- Paramjit G, Danadevi K, Mahbood M, Rozati R, Band BS, Rahman MF. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(2): 201-205
- P. Perry, S. Wolff, New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature* 1974; 251: 156-158
- Pacifici GM, Franchi M, Colizzi C, Giuliani L, Rane A. Glutathione S-transferase in humans: development and tissue distribution. *Arch Toxicol* 1988;61:265–269.[CrossRef][Medline]
- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulka-Wasilewska A, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides *Mutation Research* 2001; 495: 147-155
- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. 2001b. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 6:539–545.
- Pastor S. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronucleos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002:1, 5 – 7,
- Paz y Mino C, Bustamante G, Sánchez ME, León PE. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1077-1080
- Plan De Desarrollo Municipal De Luribay: La Paz - Bolivia. 2005: 4 – 45.
- Plan De Desarrollo Municipal De Luribay: La Paz – Bolivia. Versión ajustada. 2006 – 2010: 1 - 72.
- Poli P, de Mello M, Buschini A, de Castro V, Restivo F, Rossi C, Zucchi T. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 2003; 540: 57-66
- Raijmakers MM, Bruggeman SM, Steegers EP, Peters WM. Distribution of components of the glutathione detoxification system across the human placenta after uncomplicated vaginal deliveries. *Placenta* 2002;23:490–496.[CrossRef][Medline]
- Ramirez V, Cuenca P. DNA damage in female workers exposed to pesticides in banana plantations at Limon, Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1998: ( 50) 507-518
- Rita P, Reddy PP, Reddy SV. 1987. Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. *Environ Res* 44:1–5.
- Sachs, L.: Crecimiento, diferenciación y remisión del Cáncer. *Investigación y ciencia.* 1986. 114: 24 – 32.
- Saleha B, Danadevi K, Rahman MF, Aheya YR, Kaiser J. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using. Comet assay. *Food chem.. toxicol.* 2001: (39)361 – 366.
- Santivañez T. Plaguicidas, Salud y Medio Ambiente. *PLAGBOL.* 2005: 1 – 9

- Scarpato R, Migliore L, Angotzi G, Fedi A, Miligi L, Loprieno N. 1996. Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: Noevidence of DNA damage related to pesticide exposure. *MutatRes* 367:73–82.
- SEMARNAP-INE. 1999. Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas. Serie Plaguicidas No. 1. México.
- SEMARNAP-INE. 1999. ¿Por qué, para qué y cómo se evalúan los riesgos para la salud y el ambiente de los plaguicidas?. Serie Plaguicidas No. 2
- SEMARNAP-INE. 1999. Lo que usted debe saber sobre la gestión de los plaguicidas en México. Serie Plaguicidas No. 4. México.
- Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley, Nelson V, Jackson RJ. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital. *Epidemiology*. 1999: (10)60 – 66.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001;360:1–16.[CrossRef][Medline]
- Speit G., Hartmann A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test): A sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *Iotowa.NJ*.1995: Vol 113: 20-212pp.
- Tirado Noemi y col. Evaluación de riesgo genotóxico y susceptibilidad genética por exposición a plaguicidas en agricultores de Sapahaqui y Luribay. *Proyectosconcurablesidh2007*. La Paz – Bolivia. 2010
- Universidad Nuestra Señora de La Paz. III Jornadas de Ingeniería en Alimentos. La Paz – Bolivia. 2001: 48 – 54.
- Van Lieshout EM, Knapen MF, Lange WP, Steegers EA, Peters WH. Localization of glutathione S-transferases alpha and pi in human embryonic tissues at 8 weeks gestational age. *Hum Reprod* 1998;13:1380–1386.[Abstract/Free Full Text]
- Vigreux C, Poul J, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay\_comet assay/and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research* 1998; 419: 79-90
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19:275–280.[Abstract/Free Full Text]
- Webster LR, Mc Kenzie GH, Moriarty HT. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer genet. Cytogenet*. 2002: (133) 112 – 117.
- WHO/PCS. Environmental. Health Criteria ISS. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva. 1993.
- Wu, M-S., Ch-J. Chen, M-T. Lin, H-P. Wang, C-T, Shun,J-C. Sheu & J-T. Lin. 2002. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 2E1, Glutathione S-transferase M1 and T1, nd susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int. J. Colorectal Dis*. 17: 338-343.
- Young S, Le Souef PN, Geelhoed GC, Stick SM, Turner KJ, Landau LI. The influence of a family history of asthma and parental smoking on airway responsiveness in early infancy. *N Engl J Med* 1991;324:1168–1173.[Medline]
- <http://www.allelyus.com/es/servicios/genetica-forense/conceptos-basicos/polimorfismos-y-marcadores-geneticos?start=6>
- <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=510174&indexSearch=ID>



- <http://hinari.gw.who.int/whalecomwww3.interscience.wiley.com/whalecom0/journal/121530616/abstract>
- <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww3.interscience.wiley.com/whalecom0/cgi-bin/fulltext/120779960/PDFSTART>
- <http://www.canarina.com/?gclid=CPm82dSngaECFRQdswodqTcDuA>
- <http://www.ecoportal.net/content/view/full/15790>
- [http://scholar.google.com.bo/scholar?q=cyp1A1+polymorphisms+%2B+pesticide+exposure&hl=es&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholar](http://scholar.google.com.bo/scholar?q=cyp1A1+polymorphisms+%2B+pesticide+exposure&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar)
- La Razón marzo 2008 BOL-13-En Bolivia se usa plaguicidas que provocan enfermedades letales *Javier Badani – Angélica Melgarejo*
- La Prensa, 11 de diciembre de 2010

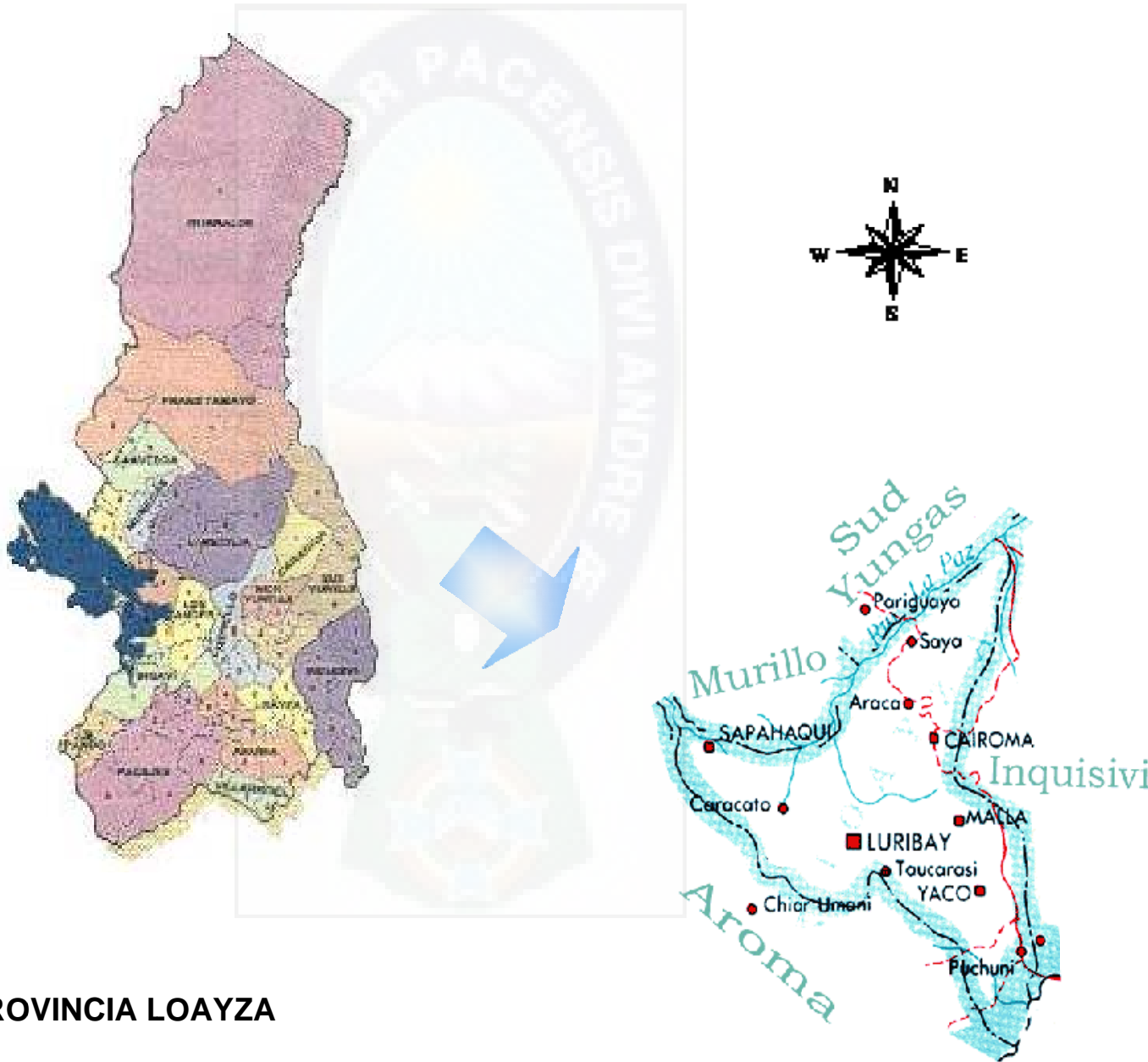


**ANEXOS**

**ANEXO 1**

**UBICACIÓN DE LA PROVINCIA LOAYZA EN EL DEPARTAMENTO DE LA PAZ**

Departamento de La Paz



**PROVINCIA LOAYZA**

## ANEXO 2

### Encuesta

#### DATOS PERSONALES

Nombres y apellidos: .....

Código: .....

Edad: .....

Sexo: masculino  femenino

Localidad: Sahapaqui  Luribay  Especificar nombre.....

Ocupación: minero  agricultor  profesor  estudiante

#### HÁBITOS PERSONALES

Consumo de tabaco

fumador

no fumador

Consumo de mate de coca

si

no

¿Mastica hojas de coca?

si

no

Consumo de alcohol

no

si

rara vez

Consumo de otros mates

si

no

¿Cuántas veces por día?

1 vez

2 veces

más de dos

#### ANTECEDENTES FAMILIARES

Familiar con cáncer

si

no

Tipo de cáncer

parentesco

padre

madre

hermano(a)

primo(a)

hijo(a)

#### DATOS PERSONALES DE SALUD

Enfermedades: cardiaca  renal  pulmonar  nervioso  digestivo  dérmico

cáncer  ninguna  otra  Cual: .....

Consumo de medicamentos: antidiabéticos  antibióticos

psicofármacos  diuréticos  antiácidos  antihistamínicos

vitaminas/minerales  analgésicos/antipiréticos

anticonceptivos/hormonas  ninguno  otro.....

¿Se ha sometido alguna vez a terapia de rayos X (incluso en la niñez)?

- Si   
No   
No sabe

¿Realiza chequeo?

- Si   
No

¿Cuántas veces al año?

1 VEZ  2 VECES  3 VECES

¿En total cuantas veces ha fumigado en el último mes?

1 vez  2 veces  3 veces  más de 3

¿Qué plaguicidas ha usado en el último mes?

- Antracol  
 Cípetrin  
 Curacron  
 Dimetoato  
 Folidol  
 Karate  
 Cumulos  
 Metagol  
 Lorsban  
 Paration  
 Perfection  
 Success  
 Taron  
 Benomil  
 Otros

**ANEXO 3**

**PROYECTO: EVALUACIÓN DEL RIESGO GENOTOXICO Y SUSCEPTIBILIDAD**

**GENÉTICA POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN AGRICULTORES DE LOS**

**MUNICIPIOS DE SAPAHAQUI Y LURIBAY**

N° de identificación.....

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo \_\_\_\_\_ con CI: \_\_\_\_\_

Dirección: ----- Municipio: .....

*Tengo conocimiento del trabajo de investigación que está realizando el Instituto de Genética, el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina y el proyecto Plaguicidas Bolivia, para evaluar el riesgo genotóxico y la susceptibilidad genética por exposición a plaguicidas en agricultores de los municipios de Sapahaqui y Luribay.*

*Después de haber leído y haberme informado en detalle del estudio, doy mi consentimiento para participar en el estudio.*

*Entiendo que mi participación es voluntaria.*

\_\_\_\_\_

*Nombre, CI y Firma del participante*

\_\_\_\_\_

*Noemi Tirado Bustillos*

*CI: 2369439 LP*

*INVESTIGADOR PRINCIPAL*

\_\_\_\_\_

*Marina Cuti Anti*

*RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA*

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

## ANEXO 4

### Plaguicidas Prohibidos en Bolivia

<b>Nombre del veneno</b>	<b>Nombre Comercial</b>
<b>DDT</b>	<b>DDT Matador</b>
<b>Endrin</b>	<b>Endrín</b>
<b>Aldrin</b>	<b>Aldrín</b>
<b>Mirex</b>	<b>Mirex</b>
<b>Dieldrin</b>	<b>Dieldrín</b>
<b>Lindano</b>	<b>Lindano, Gama BHC</b>
<b>Heptacloro</b>	<b>Heptacloro, Clorahep</b>
<b>Metoxicloro</b>	<b>Metoxicloro, Marlate</b>
<b>Hexacloro o benceno</b>	<b>BHC</b>
<b>Pentaclorofenol</b>	<b>Pentaclorofenol, Dowcide</b>
<b>Endosulfan</b>	<b>Cyclodon, Thiodan</b>
<b>Toxafeno</b>	<b>Toxafeno</b>
<b>Clordano</b>	<b>Clordano</b>
<b>Heptacloro</b>	<b>Heptacloro</b>

Fuente: Huci. 2004. El mundo de los plaguicidas. Cartilla 2. Proyecto Plaguicidas Bolivia

## Plaguicidas de uso permitido en Bolivia

### FUNGICIDAS

INGREDIENTE ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	N° DE REGISTRO
Azoxystrobin	Priori	1722
Azufre	Kumulus- R DF	1378
	Sulflox 720	1395
Benomil	Benlate	362
	Benomil	1254
Captan	Merpan 48 FW	1495
	Captan 50 PM	1253
	Captan 750	1342
	Merpan 80 WDG	1487
Captan + Molibdeno	Captan 250 Moly	1034
Carbendazin	Bavistin FL	910
Carboxin- Thiran	Vitavax 200 FF	1285
Cyproconazole	Alto 100 SL	1426
Clorotalonil	Bravo 720	1647
	Bravo 500	724
	Hortyl 50	1368
Cymoxanil + Mancozeb	Curathane	1434
Difenoconazole	Score 250 EC	1389
Edifenphos	Hinosan	1201
Epoconazole + Carbendazin	Duett	1448
Flusilazole	Punch	1148
Flutriafol	Impact	1341
	Vincit F	1425
Folpet	Folpan 80 PM	728
	Folpan 80 WDG	1343
Folpet + Prochloraz	Mirage - F	1344

Fosetil Aluminio	Defense 80 WP	1418
Iprodione	Rovral	744
Iprodione + Thiram	Rovrin	1002
Kasugamicina	Kasumin	1379
Mancozeb	Dithane	978
	Dithane M - 45	384
	Manzate 200	661
	Tiozeb	1654
	Manzeb	1552
Mancozeb + Metalaxil	Metaman WP	1370
	Hieloxil Mix 72	
		1551
Metiran	Polyram DF	1501
Ofurace + Mancozeb	Patafol	1259
Oxicloruro de Cobre	Cupravit	1290
	Cobox	1600
	Kupoxil	1082
	Roxicop	1512
	Fungicobre	1464
Prochloraz	Mirage 45 EC	1264
Propiconazole	Bumper 25 EC	1263
Propineb	Antracol	1210
Propineb + Cymonaxil	Fitoraz	1209
Sulfato de Cobre Pentahidratado	Pitón- 27	1711
Tebuconazole	Folicur 259 EC	1337
	Folicur 250 EW	1700
Thiabendazol	Tecto 100	1261

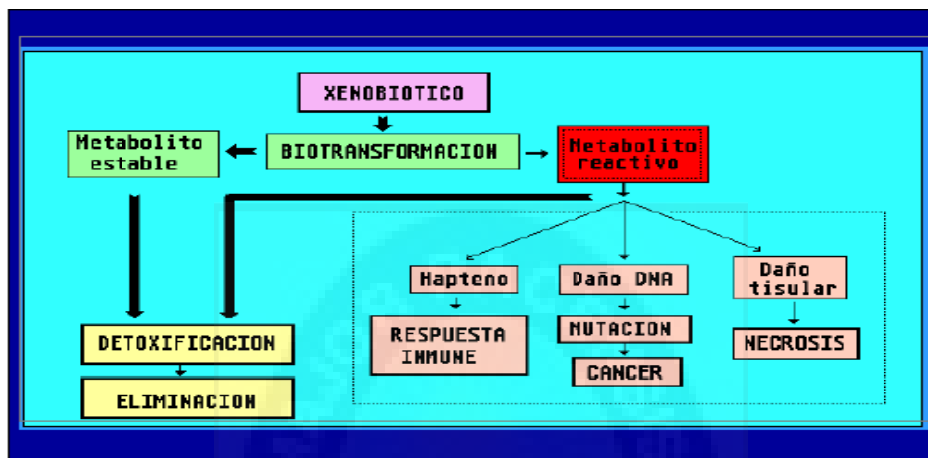


## HERBICIDAS

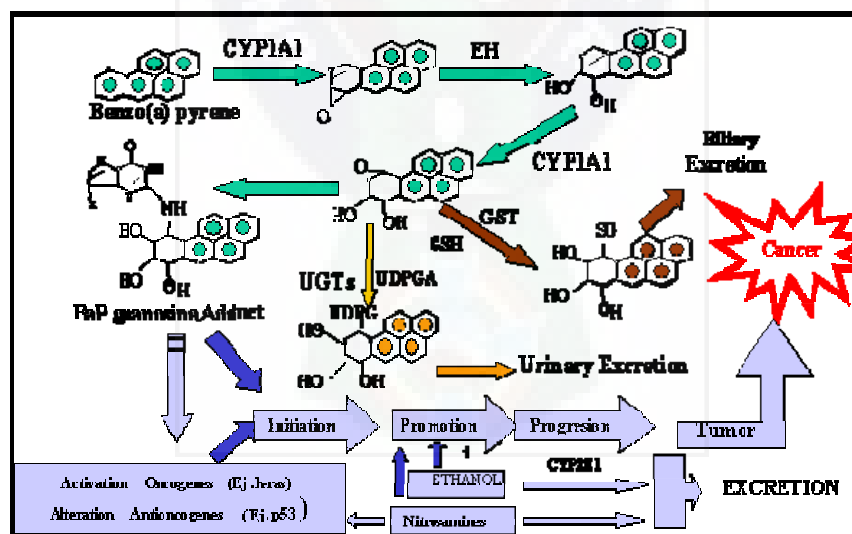
INGREDIENTE ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	N° DE REGISTRO
2,4 D Sal amina	DMA - 6	3345
Acetoclor	Acetoclor	1275
Acifluorfen + Bentazon	Galaxi Top	1556
Aclonifen	Prodigio	1296
Alachlor	Alanex 48 EC	778
Ametrina	Ametrex 50 FW	1359
Atrazina	Atranex 50 FW	1223
Bentazon	Basagran R 600	1376
Bromacil	Hyvar X	1514
Butroxydim	Falcon	1622
Cicloxydim	Focus Ultra	1191
Clethodim	Select 24 EC	1414
Clomazone	Command LE	1115
Clorimuron	Spin 25 PE	1309
Dicamba	Banvel 480 SL	1435
Diquat	Reglone	1032
Diuron	Karmex SF	1141
Fomesafen	Flex 250	848
Metribuzin	Sencor 480	1295
MSMA	Arsonex 96	1301
Paraquat	Gramoxone	365

Fuente: Huci. 2004. El mundo de los plaguicidas.

ANEXO 5



<http://bioweb.uv.es/bioquimica/Documentos/JVCastell/Metabolismoxenobioticos.pdf>



Mecanismo de acción

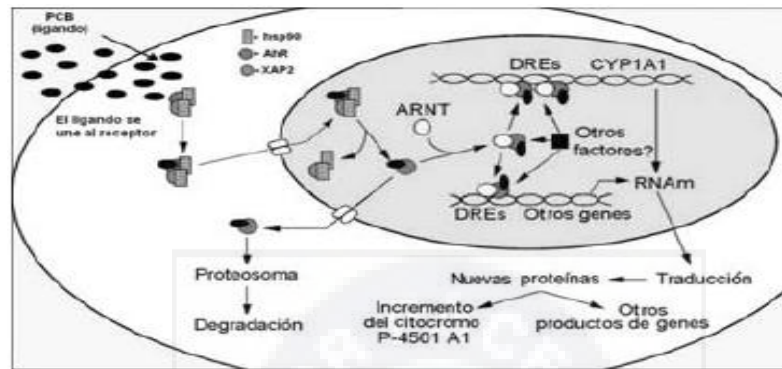
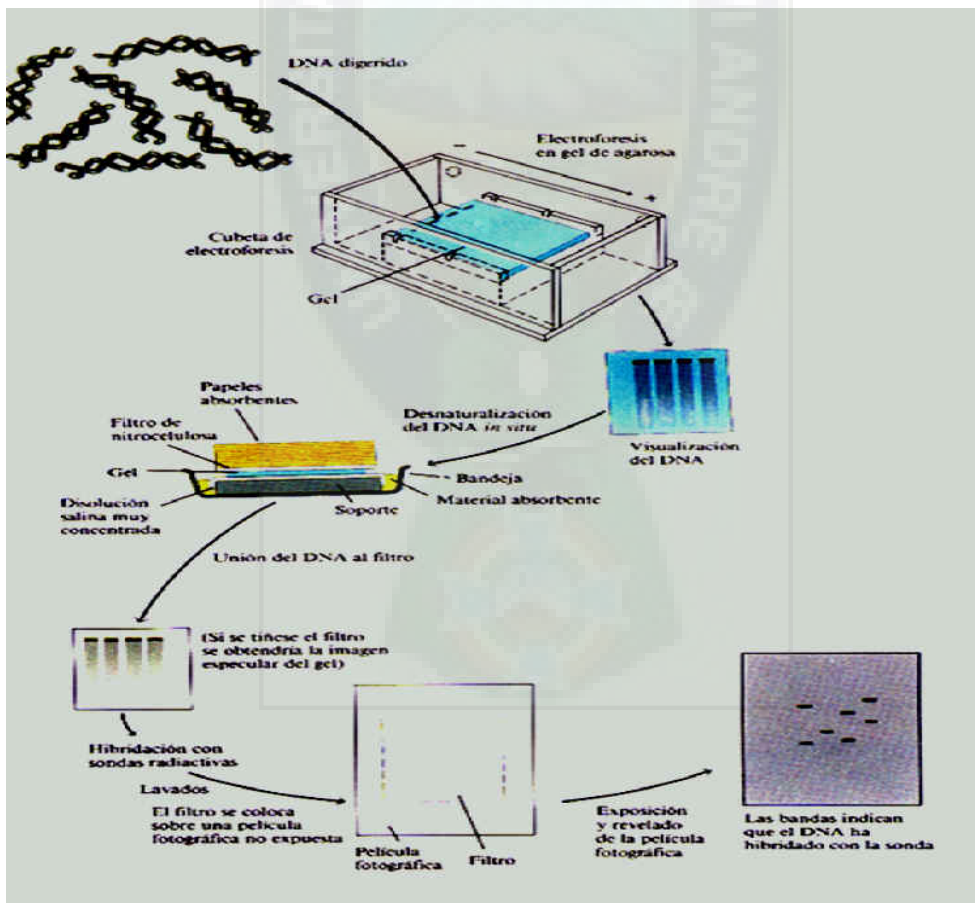


Figura 2. Mecanismo molecular de la activación del receptor aril hidrocarburo (AhR) por los PCB. El AhR tiene unidos dos monómeros de hsp90 (*heat shock proteins 90*) y uno de XAP2 (*hepatitis virus B X-associated protein 2*). ARNT (ARN translocador), genes DREs (*dioxin responsive element*). Véase el texto para más detalles. Modificado de Denison y Nagy (2003).<sup>20</sup>



Esquema de la electroforesis en gel de agarosa

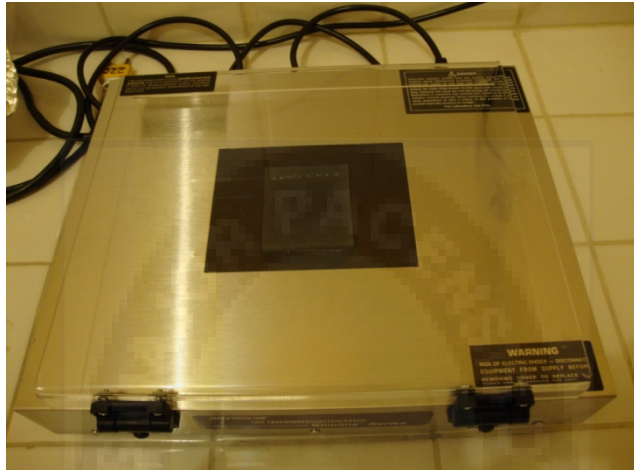
## ANEXO 6

### Toma de muestra



Termociclador, micropipeta y tips.

**ANEXO 7**

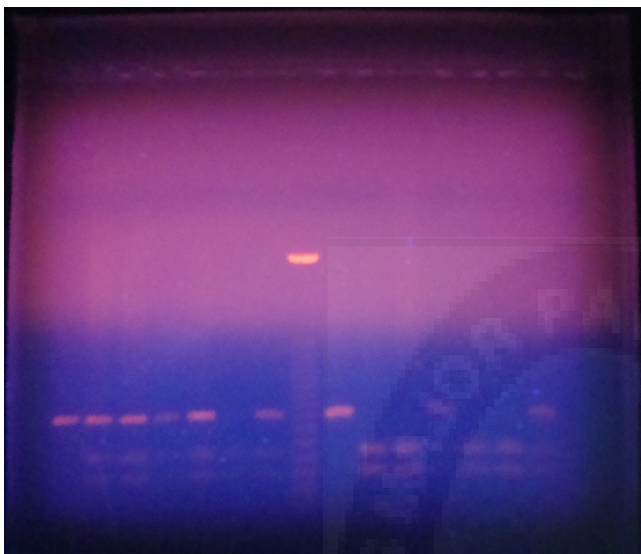


**Transluminador U.V.**



**Tubo eppendorf con muestra de ADN.**

## ANEXO 8



Fotografía de la corrida electroforética en el trasluminador UV.



Agricultor de Sapahaqui.