

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA**



**“Daño genotóxico, enzimas hepáticas GOT y GPT y su
relación con el polimorfismo PON1 en agricultores expuestos a
plaguicidas de diferentes municipios del Departamento de
Santa Cruz - Bolivia”**

**“TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS CON LA MENCIÓN DE: GENÉTICA”**

POR:

Lic. ABEL JAFET LUNA CHOQUE

LA PAZ-BOLIVIA

2023

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE GENÉTICA**



**“Daño genotóxico, enzimas hepáticas GOT y GPT y su
relación con el polimorfismo PON1 en agricultores expuestos a
plaguicidas de diferentes municipios del Departamento de
Santa Cruz - Bolivia”**

**“TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS CON LA MENCIÓN DE: GENÉTICA”**

POR:

Lic. ABEL JAFET LUNA CHOQUE

TUTOR:

NOEMI SANDRA TIRADO BUSTILLOS MSc.

LA PAZ-BOLIVIA

2023

DEDICATORIA

*A Dios, a mi familia, a mis compañeros y amigos
sin el apoyo de ustedes no hubiese sido
posible concluir este sueño*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser luz en mi vida, por guiar mis pasos con amor día a día y a quien le debo todo lo que soy, quien me ha permitido en su infinita misericordia alcanzar esta meta.

A esta prestigiosa casa de estudios, la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme acogido y permitido realizar este trabajo de post grado.

A la Unidad de Genética Toxicológica del Instituto de Genética de la Facultad de Medicina, Enfermería, Nutrición y Tecnología Médica por abrirme sus puertas y haberme dado la oportunidad de realizar la parte práctica de esta Tesis.

Al Grupo de Trabajo Cambio Climático y Justicia Regional (GTCC-J), por la gestión y coordinación a través de INCADE para la realización de la investigación.

A mi estimada asesora de tesis, la Dra. Noemi Sandra Tirado Bustillos, que con una incomparable paciencia y dedicación supo guiarme durante la elaboración de este trabajo.

A mis queridos colegas del Instituto de Genética, en especial a la Dra. Gina Torrez y Tco. Sup. Marina Cuti, por el agradable tiempo compartido y la transmisión de sus experiencias profesionales dentro de la Unidad de Genética Toxicológica.

A mi familia por el apoyo y aliento durante el periodo en el cual me encontraba realizando la maestría, de manera especial a mi hermana Lourdes, por ser un ejemplo de fortaleza, perseverancia, valentía y mostrarme en sus últimos momentos de vida que lo más importante siempre será Dios y por qué su recuerdo es mi motivación de vida.

Finalmente, a todos mis queridos amigos que en su debido momento me dieron palabras de aliento y ánimo, en especial a Milena Mendoza, Delma Zapata y Diego Villarroel.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	DISEÑO TEÓRICO.....	2
2.1	Marco teórico	2
2.1.1	Qué son los plaguicidas y cuál es su impacto sobre la salud en Bolivia. .2	
2.1.2	Estudios de biomonitorización como medio de control para grupos de riesgo.....	7
2.1.3	Evaluación de anomalías nucleares en células de la mucosa oral.....	9
	a) Células binucleadas.....	12
	b) Células con nuclear buds (Broken eggs).....	12
	c) Células con núcleo en picnosis.	12
	d) Células con núcleo en cariólisis.....	12
	e) Células con núcleo en cariorrexis.	12
	f) Células con núcleo condensado.	13
2.1.4	Polimorfismos genéticos.	15
2.1.5	Variantes del gen de la Paraoxonasa 1.	17
2.2	Marco conceptual.....	20
3.	JUSTIFICACIÓN.....	25
4.	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	26
5.	HIPÓTESIS.....	26
6.	OBJETIVOS.....	26
6.1	Objetivo general.	26
6.2	Objetivos específicos.....	26
7.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	27
7.1	Diseño.....	27
7.2	Lugar de estudio.....	27
7.3	Población de estudio.....	27
7.4	Métodos y técnicas a ser empleados.....	27
	A. Métodos	28
	a. Evaluación de anomalías nucleares	28

b. Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1	28
B. Técnicas	29
a. Evaluación de Anomalías nucleares	29
b. Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1 (Q192R) por PCR-RFLP.....	30
c. Estandarización del protocolo para la amplificación del polimorfismo PON1 (Q192R) por qPCR.....	33
7.5 Análisis estadístico.	33
8. RESULTADOS.....	34
8.1 Análisis demográfico	34
8.1.1 Descripción poblacional	34
8.1.2 Análisis demográfico en los grupos con exposición directa e indirecta a plaguicidas.....	35
8.2 Evaluación de las anomalías nucleares	37
8.3 Evaluación de la frecuencia del polimorfismo genético PON 1	40
8.3.1 Validación de las técnicas de PCR-RFLP y qPCR	40
8.3.2 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y frecuencia alélica para el polimorfismo PON1192Q/R	43
8.4 Análisis estadístico de distribución y modelaje de datos	44
8.5 Análisis comparativo de los niveles de las enzimas hepáticas GOT y GPT con los factores higiénicos, biomarcadores de efecto y susceptibilidad	45
8.5.1 Análisis comparativo con los factores higiénicos.....	46
8.5.2 Análisis comparativo con los biomarcadores de efecto	51
8.5.3 Análisis comparativo con los biomarcadores de susceptibilidad	53
9. DISCUSIÓN.....	55
9.1 Análisis demográfico.....	55
9.2 Evaluación de anomalías nucleares.....	57
9.3 Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencia alélica para el polimorfismo PON1 (Q192R).....	58
9.4 Análisis comparativo de los niveles de las enzimas hepáticas GOT y GPT con los factores higiénicos, biomarcadores de efecto y susceptibilidad.....	60

9.4.1 Factores higiénicos.....	60
9.4.2 Biomarcadores de efecto.....	62
9.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad.....	63
10. CONCLUSIONES.....	64
11. REFERENCIAS.....	66
12. ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Ciclo de los plaguicidas en el medio ambiente. Fuente: Sal&Roca, 2022, 14 de abril.....	2
Figura 2: Actividad de la enzima acetilcolinesterasa como inhibidor del neurotransmisor Acetilcolina A) Función biológica normal de la enzima Acetilcolinesterasa (Hidrolisis del neurotransmisor Acetilcolina en colina y acetato). B) Inhibición de la acetilcolinesterasa y sus posibles consecuencias. (AChE: Acetilcolinesterasa; ACh: Acetilcolina; CoA: Acetiltransferasa; AcCoA: Acetil Coenzima A; ChAT: Colinaacetiltransferasa; ChT: Transportador de Colina; Ca ⁺² : Ion Calcio). Fuente: Caro-Gamboa, L.J., et al., 2020.....	5
Figura 3: Intoxicación por Paraquat – mecanismo de acción Fuente: Ballesteros, D., Soto Oviedo, A., Murillo Palacios, J y García, C., 2021	6
Figura 4: Formación de micronúcleos. A) Provocado por daño clastogénico, se forma un micronúcleo más pequeño; B) Provocado por efecto aneuploidógeno, se forma un micronúcleo de mayor tamaño. Fuente: Núñez Figueroa L.J., Ramos Ibarra M. L., Zalapa Hernández S. S., Guerrero Vázquez S., Zavala Cerna M. G. y Torres Bugarín O., s.f.....	10
Figura 5: Ensayo de micronúcleos en cultivo celular de linfocitos en el cual se observa la acción de la citocalasina B permitiendo la formación de células binucleadas. Fuente: Zalacain, M., et. al., 2005.....	10
Figura 6: Esquema de los diferentes tipos de anomalías nucleares que pueden evaluarse en células exfoliadas de la mucosa bucal. Fuente: Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Siegfried Knasmueller, S., y Fenech, M., 2009.....	13
Figura 7: Tipos de anomalías nucleares en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal. a) célula binucleada; b) célula con núcleo en Broken egg; c) célula con núcleo en picnosis; d) célula con núcleo en cariólisis; e) célula con núcleo en cariorrexis; f) célula con núcleo condensado. Fuente: Bolognesi, C., et al., 2013.....	13
Figura 8: Fenómenos moleculares de la exposición del ADN a la hidrólisis acida. Fuente: Zamorano Vásquez, C., 2014	15
Figura 9: Reacción de hidrólisis de Paraoxon realizada por la enzima PON. Fuente: Mohammed, C.J., Lamichhane, S., Connolly, J.A., Soehnen, S.M., Khalaf, F.K., Malhotra, D., Haller, S.T., Isailovic, & Kennedy D.J., 2022.....	17
Figura 10: Síntesis de PON 1 y PON 3, su liberación y transporte a circulación y su relación con diferentes patologías. Fuente: Mohammed, C.J., et al., 2022.....	18

Figura 11: Corrida electroforética en gel de agarosa, mostrando los polimorfismos PON 1 Q192R por PCR – RFLP. Carriles 1 y 2 Homocigoto QQ; Carriles 3 y 6 Homocigoto RR; Carriles 4, 7 y 8 Heterocigoto QR y Carril 5 Ladder de 50 pb. Fuente: Carranza, A., et al., 2017.....	19
Figura 12: Anomalías nucleares observadas con la tinción de Feulgen Fast-green. Fuente: Elaboración propia (2022). A: dos células pegadas ambas con un núcleo en Broken egg; B: Célula con el núcleo fragmentado; C: Célula con el núcleo en cariolisis; D: Campo de microscopio donde se observa una célula con núcleo en cariolisis, una célula binucleada y varias células pegadas con núcleo normal.....	38
Figura 13: Validación de la técnica de PCR-RFLP para el polimorfismo genético PON1192Q/R en un gel de agarosa al 3%. Fuente: Elaboración propia (2022).....	40
Figura 14: Corrida electroforética sobre muestras de la población en estudio para la evaluación del polimorfismo PON1192Q/R en un gel de agarosa al 3%. Fuente: Elaboración propia (2022).....	41
Figura 15: Amplificación del polimorfismo PON1Q192R por qPCR y análisis de scatter-plot para discriminación genotípica de ambos SNPs. Fuente Elaboración propia (2022)..	42
Figura 16: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histograma sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el hábito de beber. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis el p~valor = 0.935 para Bebe vs GPT y p~valor = 0.9236 para Bebe vs GOT. Fuente: Elaboración propia (2022).....	48
Figura 17: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histograma sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el Sexo. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis el p~valor = 0.1345 para Sexo vs GPT y p~valor = 0.06247 para Sexo vs GOT. Fuente: Elaboración propia (2022).....	49
Figura 18: Diagramas de dispersión de valores de la enzima GPT en relación con las anomalías nucleares. A) GPT vs células binucleadas, B) GPT vs cariolisis, C) GPT vs Cariorrexis, D) GPT vs Broken egg y E) GPT vs micronúcleos.....	51
Figura 19: Diagramas de dispersión de valores de la enzima GOT en relación con las anomalías nucleares. A) GOT vs cédulas binucleadas, B) GOT vs cariolisis, C) GOT vs Cariorrexis, D) GOT vs Broken egg y E) GOT vs micronúcleos. Fuente: Elaboración propia (2022).....	52
Figura 20: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histogramas sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el polimorfismo PON1. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis el p~valor = 0.9878 para PON1 vs GPT y p~valor = 0.4102 para PON1 vs GOT. Fuente: Elaboración propia (2022).....	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pag.
Gráfica 1: Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio.....	39
Gráfica 2: Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1: Análisis demográfico de la población participante.....	35
Tabla 2: Análisis demográfico de la población participante con exposición directa a plaguicidas.....	36
Tabla 3: Análisis demográfico de la población participante con exposición indirecta a plaguicidas.....	36
Tabla 4: Anomalías nucleares en la población de estudio y sub grupos.....	39
Tabla 5: Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencia del alelo WT para el Polimorfismo PON1192Q/R.....	44
Tabla 6: Modelaje de datos según selección por pasos utilizando el Criterio de inclusión de Akaike (AIC) para la variable de respuesta Daño Genotóxico.....	45
Table 7: Análisis general comparativo de factores higiénicos entre participantes con valores normales y elevados para la enzima GPT con relación a los factores higiénicos.....	46
Tabla 8: Análisis general comparativo de factores higiénicos entre participantes con valores normales y elevados para la enzima GOT con relación a los factores higiénicos.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Aval ético otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad Católica Boliviana “San Pablo “ Unidad académica Santa Cruz con el código de protocolo # 025 del 9 de diciembre del 2019.....	82
Anexo 2: Hoja de consentimiento informado.....	85
Anexo 3: Encuesta realizada a los participantes.....	86
Anexo 4: Distribución de la población en estudio que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.....	99
Anexo 5: Distribución según el sexo.....	99
Anexo 6: Distribución según intervalos de edad.....	100
Anexo 7: Porcentaje de exposición directa o indirecta a plaguicidas.....	100
Anexo 8: Distribución de la población en estudio con exposición directa a plaguicidas que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.....	101
Anexo 9: Distribución de la población en estudio con exposición indirecta a plaguicidas que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.....	101
Anexo 10: Distribución según el sexo con exposición directa a plaguicidas.....	102
Anexo 11: Distribución según el sexo con exposición indirecta a plaguicidas	102
Anexo 12: Distribución según intervalos de edad con exposición directa a plaguicidas.....	103
Anexo 13: Distribución según intervalos de edad con exposición indirecta a plaguicidas.....	103
Anexo 14: Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio con exposición directa.....	104
Anexo 15: Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio con exposición indirecta.....	104
Anexo 16: Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio con exposición directa a plaguicidas.....	105
Anexo 17: Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio con exposición indirecta a plaguicidas.....	105

RESUMEN

Los plaguicidas son una clase de sustancias químicas muy utilizadas en la industria agrícola para el control y/o eliminación de plagas. Existen antecedentes que demuestran que el uso constante de estos compuestos tiene un impacto sobre la salud pública, donde los agricultores son considerados como un grupo de alto riesgo al encontrarse expuestos de manera crónica a estos agentes. La biomonitorización es la acción más empleada para el control de enfermedades provocadas por la exposición a plaguicidas, la misma que consiste en la evaluación de diferentes biomarcadores sobre los grupos de alto riesgo. Se realizó un estudio de corte transversal en el cual se recabó información mediante el uso de encuestas y se evaluaron biomarcadores de efecto (evaluación de anomalías nucleares en células del citoma bucal) y susceptibilidad (polimorfismo genético PON1 Q192R) y se los relacionó con biomarcadores de daño hepático (Enzimas transaminasas). Se incluyeron 180 participantes entre hombres y mujeres de cinco localidades del departamento de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. La evaluación de anomalías nucleares en células exfoliadas del citoma bucal evidenció daño citotóxico, ya que la mayoría de las placas leídas al microscopio presentaban células binucleadas (74,40%) y con núcleo en cariólisis (100%), asimismo, se validaron las técnicas de PCR-RFLP y qPCR lo cual permitió evaluar la frecuencia del polimorfismo genético PON1 Q192R donde los resultados muestran una mayor frecuencia del polimorfismo mutado con el 48,90% (PON1 192/RR, frecuencia alélica = 0.32, $\chi^2 = 4.13851$, p-valor = 0.041918) el cual está asociado a una mayor actividad de la enzima Paraoxonasa 1. Finalmente se hizo un análisis comparativo entre los factores higiénicos y los biomarcadores de efecto y susceptibilidad empleados con biomarcadores de daño hepático, donde en su mayoría no se encontró una relación estadísticamente significativa, esto posiblemente se debe a que el daño hepático es un problema multifactorial, además de que gracias al modelaje de datos realizado por una selección de pasos utilizando los criterios de inclusión de Akaike, se determinó que las variables analizadas (factores higiénicos y biomarcadores) se encontraban demasiado dispersas además de no presentar una distribución normal.

Palabras claves: Plaguicidas, daño genotóxico, polimorfismos PON 1, daño hepático, transaminasas.

ABSTRACT

Pesticides are a class of chemical substances widely used in the agricultural industry for the control and/or elimination of pests. There are precedents that show that the constant use of these compounds has an impact on public health, where farmers are considered a high-risk group as they are chronically exposed to these agents. Biomonitoring is the most used action for the control of diseases caused by exposure to pesticides, which consists of the evaluation of different biomarkers on high-risk groups. A cross-sectional study was carried out in which information was collected through the use of surveys and biomarkers of effect (evaluation of nuclear abnormalities in buccal cytoma cells) and susceptibility (PON1 Q192R genetic polymorphism) were evaluated and related to biomarkers of liver damage (transaminase enzymes). 180 participants between men and women from five locations in the department of Santa Cruz de la Sierra, Bolivia were included. The evaluation of nuclear abnormalities in cells exfoliated from the buccal cytoma showed cytotoxic damage, since most of the plates read under a microscope presented binucleated cells (74.40%) and with a nucleus in karyolysis (100%), similar, the techniques were validated. of PCR-RFLP and qPCR which allowed evaluating the frequency of the genetic polymorphism PON1 Q192R where the results show a higher frequency of the mutated polymorphism with 48.90% (PON1 192/RR, allele frequency = 0.32, $\chi^2 = 4.13851$, $p\text{-value} = 0.041918$) which is associated with a higher activity of the Paraoxonase 1 enzyme. Finally, a comparative analysis was made between the hygienic factors and the biomarkers of effect and susceptibility used with biomarkers of liver damage, where most of them did not find a statistically significant relationship, this is possibly due to the fact that liver damage is a multifactorial problem, in addition to the fact that thanks to the data modeling carried out by a selection of In the steps using Akaike's inclusion criteria, it was limited that the variables analyzed (hygiene factors and biomarkers) were found to be too dispersed, in addition to not presenting a normal distribution.

Keywords: Pesticides, genotoxic damage, polymorphisms PON 1, liver damage, transaminases.

1. INTRODUCCIÓN.

Los plaguicidas son una clase de sustancias químicas utilizadas en la industria agrícola para el control y/o eliminación de plagas, lastimosamente estos compuestos son nocivos para el medio ambiente y también para la salud pública en general, siendo los agricultores el grupo de más alto riesgo.

Existe una gran variedad de plaguicidas, muchos de los cuales han demostrado ser más dañinos que beneficiosos en su uso, por consiguiente, organizaciones como la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) han prohibido la venta de aquellos pesticidas que representan un verdadero riesgo para salud a nivel internacional.

Bolivia es uno de los países en los cuales no existe un control exhaustivo sobre la comercialización de estas sustancias, motivo por el cual muchos de estos agroquímicos que han sido prohibidos por su alto riesgo, entre ellos varios plaguicidas organofosforados (OP), se venden de manera libre en todo el territorio nacional, afectando de manera negativa la salud de quienes manipulan estos compuestos considerados también como agentes genotóxicos.

Asimismo, el departamento de Santa Cruz de la Sierra se ha caracterizado, desde hace varios años atrás, por ser una de las zonas con mayor actividad agrícola dentro de Bolivia, esto debido a las características climáticas favorables de la región, pero también, por este motivo es un sector bastante afectado por diversos tipos de plagas.

Este hecho ha obligado al empleo excesivo de plaguicidas por los agricultores, los cuales en la mayoría de los casos realizan malas prácticas, como por ejemplo el uso de los famosos cocteles de plaguicidas, descuidando además los protocolos de bioseguridad que deberían ser siempre empleados, ya sea por falta de información o simple desinterés hacia los mismos, convirtiéndose en un grupo de alto riesgo por exposición aguda o crónica a estos agentes.

Esto ha permitido que desarrollen con el paso del tiempo cierta susceptibilidad genética a presentar mutaciones puntuales dentro del ADN, las mismas que pueden llegar a ser perjudiciales desencadenando por ejemplo distintos tipos de cáncer, al afectar mecanismos de reparación del material genético o trastornos neurodegenerativos por acción directa de los pesticidas y también la expresión de variantes o polimorfismos genéticos que se traducen en la expresión de isoenzimas con una actividad menor a la enzima silvestre (wild type), y que además, por las características de estas mutaciones estas puedan ser heredadas, si es que no lo han sido ya.

2. DISEÑO TEÓRICO.

2.1 Marco teórico.

2.1.1 Qué son los plaguicidas y cuál es su impacto sobre la salud en Bolivia.

Los plaguicidas son una variedad de compuestos químicos (insecticidas, herbicidas, fungidas entre otros), utilizados normalmente para promover la salud pública eliminando vectores transmisores de enfermedades y también en la agricultura protegiendo los cultivos evitando la baja productividad de los mismos (Barron Cuenca, J., Tirado, N., Vikström, M., Lindh, C., Steinus, U., Leander, K., Berglund, M., & Dreij, k., 2019). Estas sustancias pueden clasificarse según el grupo o familia química en: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados bipiridilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de las triazinas, compuestos orgánicos del estaño, compuestos inorgánicos y los compuestos de origen botánico (Del Puerto, A., Suárez, S. & Palacio, D., 2014).

Lamentablemente estos compuestos traen consigo también una serie de perjuicios bastante graves dirigidos hacia el medio ambiente, contaminando y/o alterando los suelos y fuentes de agua natural cercanas, lo cual se ha visto que tiene a su vez un efecto sobre el ciclo de ciertos nutrientes y también favoreciendo al cambio climático (Barrón Cuenca, J., Aguilar Mercado, X., y Navia Bueno, P., 2015).

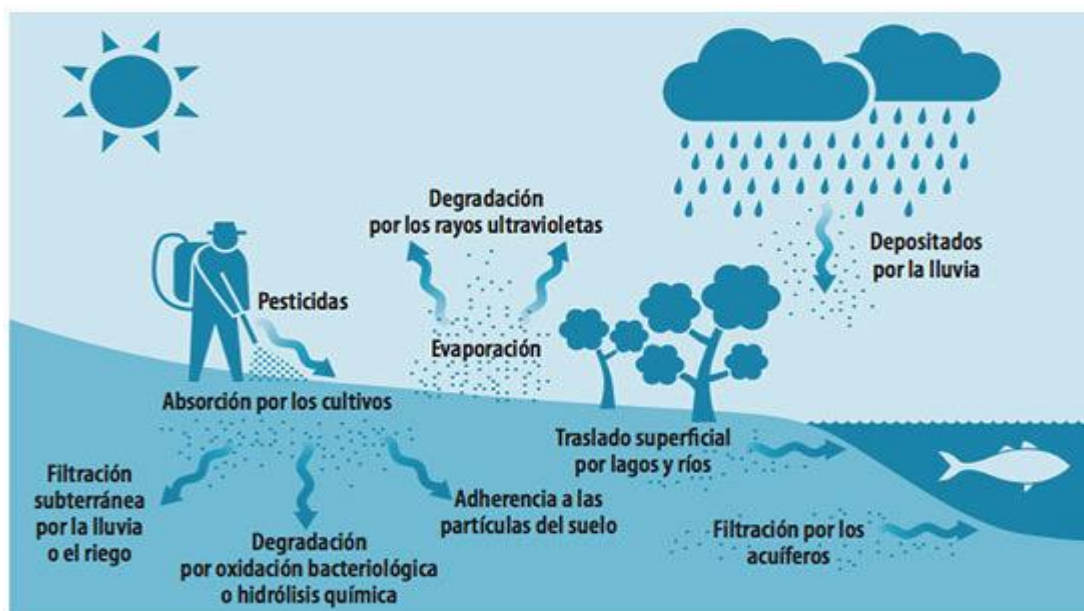


Figura 1: Ciclo de los plaguicidas en el medio ambiente. Fuente: Sal&Roca, 2022, 14 de abril.

Pero no solamente los problemas se limitan al ecosistema y medio ambiente, sino también al uso de estas sustancias y al impacto importante sobre la salud humana, ya sea de manera directa o indirecta. Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberd H, Mikoczy Z., 2001, mencionan

que “la exposición a plaguicidas, ya sea durante su formulación, producción o utilización puede tener efectos adversos en la salud, además de que estos efectos no siempre están relacionados con lesiones inmediatas y aparentes, sino que pueden tardar incluso años en manifestarse”.

Existen varios estudios que denotan una relación clara del uso de estos agroquímicos con enfermedades muy conocidas como diferentes tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, enfermedades respiratorias como el asma entre otras, aunque la gravedad de las mismas dependerá del grado de exposición que se tenga (Kim, K. H., Kabir, E., y Jahan, S. A., 2017).

Sabiendo esto, es evidente que un grupo de alto riesgo son los mismos agricultores, esto lo afirman Larrea Poma, M., Tirado Bustillos, N., y Ascarrunz, M. E., 2010: “aunque la población en general está expuesta a este tipo de compuestos, los agricultores se constituyen en un grupo de alto riesgo”, pero tampoco se debe dejar de lado a la población perteneciente a las zonas rurales que están próximas a sitios de explotación agrícola, ya que corren el riesgo de ingesta de agua o de alimentos contaminados con residuos de plaguicidas utilizados en los sembradíos (Barrón Cuenca, J. et ál., 2019).

Asimismo, existen estudios donde se han detectado residuos de plaguicidas en leche materna, lo cual implica un riesgo dirigido a la salud infantil (Dhananjayan, V., y Ravichandran, B., 2018).

Dentro de Bolivia, la actividad agrícola es una de las fuentes económicas más importantes, razón por la cual un alto porcentaje de la población boliviana se dedica a esta actividad laboral, los investigadores bolivianos Tirado Bustillos, N., Ascarrunz G., M E., Aguilar M., X., y Rada T., A., 2012 afirman: “en vista de que en nuestro país los agricultores que están expuestos a los plaguicidas, sufren una exposición crónica constante y además realizan un manejo inadecuado de los mismos, ellos constituyen un grupo de riesgo”, esta afirmación concuerda con lo antes mencionado por Larrea Poma et ál., 2010.

Este riesgo aumenta aún más gracias al uso exagerado, mal empleo e incorrecta manipulación de estas sustancias, Bickel, U., 2018 menciona en su tesis de maestría que “existe un uso indiscriminado de plaguicidas en Bolivia, esto por el empleo de mezclas coctel de fungicidas e insecticidas altamente tóxicos, los cuales son preparados en la mayoría de los casos sin la debida protección individual”.

Asimismo, existen varias investigaciones que demuestran que en Bolivia se utilizan pesticidas que están prohibidos en otros países por su alto nivel de toxicidad, Bascopé Zanabria, R., Bickel, U., Jacobi, J., Delgado, F. y Neumeister, L. s.f. mencionan que “existen 229 ingredientes activos presentes en plaguicidas registrados en Bolivia, donde

más de un 70% (164 ingredientes) presentan una alta toxicidad, de los cuales 105 están prohibidos en otros países”. En el trabajo titulado “*Plaguicidas químicos usados en el cultivo de soya en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia: riesgos para la salud humana y toxicidad ambiental*” realizado por Bascopé Zanabria, R., Bickel, U., y Jacobi, J. en 2019 pone al corriente los plaguicidas más utilizados dentro de Bolivia que además son considerados de moderada y alta toxicidad, donde algunos de los mismos se encuentran prohibidos en otros países, Bascopé Zanabria, R., et al., 2019 informan que:

“Entre los pesticidas químicos de uso agrícola más representativos dentro de Bolivia se encuentran: Metamidofos, un insecticida y acaricida del grupo de los organofosforados prohibido en 49 países; Clorpirifos, otro insecticida organofosforado altamente tóxico por ingestión; Imidacloprid y Tiametoxam, insecticidas sistémicos catalogados con una toxicidad moderada y prohibidos en 28 países; Paraquat, un herbicida cuaternario de amonio moderadamente tóxico prohibido en 38 países; el Glifosato, un herbicida de amplio espectro y el más utilizado en el mundo, catalogado por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia internacional para la investigación del Cáncer (IARC) como un herbicida probablemente cancerígeno; Linuron, es un herbicida selectivo posiblemente carcinogénico según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) el cual presenta alto riesgo dentro del embarazo”.

Estos datos muestran claramente el riesgo en contra de la salud pública que se corre dentro de Bolivia ya sea de manera directa manipulando o teniendo contacto cercano con estas sustancias y de forma indirecta consumiendo alimentos o agua natural contaminada con residuos de los mismos (Gonzales Ulibarry, P., 2019). Ahora bien, es importante esclarecer que el tipo de patología a desarrollarse por la exposición aguda o crónica a pesticidas dependerá del mecanismo de acción que tengan estas sustancias.

Como primer ejemplo se tiene al Metamidofos, Clorpirifos y Tiametoxam, mencionados anteriormente como plaguicidas organofosforados, estos inhiben a la enzima acetilcolinesterasa por medio de su fosforilación (Morales, C.A., Rodríguez, N., 2004). La acetilcolinesterasa cumple la función de inhibir al neurotransmisor sináptico acetilcolina al hidrolizarlo en colina y acetato permitiendo que la colina sea reabsorbida para la formación nuevas moléculas de acetilcolina dentro de la célula, por lo tanto, la inhibición de esta enzima provoca una acumulación de acetilcolina (Caro-Gamboa, L.J., Forero Castro, M. y Dallos Báez, A.E., 2020).

La acumulación de este importante neurotransmisor provocada por una intoxicación con plaguicidas organofosforados es capaz de generar tres cuadros clínicos según un estudio realizado por Fernández, D.G., Mancipe, L.C. y Fernández, D.C., 2010, estos cuadros

clínicos son: intoxicación aguda o síndrome colinérgico; el síndrome intermedio; el síndrome neurotóxico tardío o retardado (Figura 1).

Pastor Benito, S., 2002 amplía la información mencionando en su trabajo una relación entre la aparición de neuropatías y trastornos neurológicos con la exposición aguda o crónica a estos agentes, esto se refuerza con lo dicho por Iknurov Mollov, A., Martínez Ponce, D. C., Serrano Puebla, J., y Elías Salcedo, S., 2017, que ejemplifican la exposición a plaguicidas como un factor de riesgo a considerarse para la aparición de la enfermedad de Parkinson.

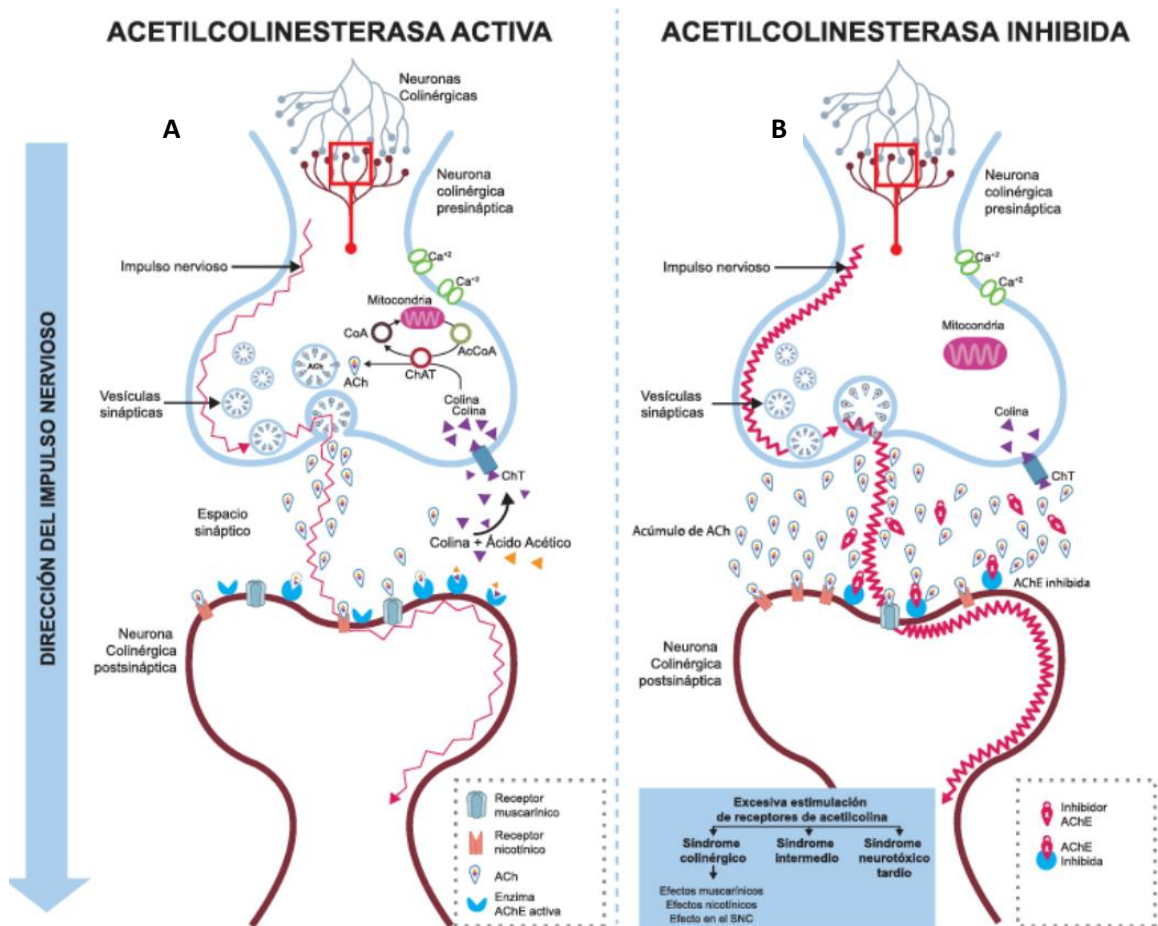


Figura 2: Actividad de la enzima acetilcolinesterasa como inhibidor del neurotransmisor Acetilcolina **A)** Función biológica normal de la enzima Acetilcolinesterasa (Hidrolisis del neurotransmisor Acetilcolina en colina y acetato). **B)** Inhibición de la acetilcolinesterasa y sus posibles consecuencias. (AChE: Acetilcolinesterasa; ACh: Acetilcolina; CoA: Acetiltransferasa; AcCoA: Acetil Coenzima A; ChAT: Colinaacetiltransferasa; ChT: Transportador de Colina; Ca^{+2} : Ion Calcio). Fuente: Caro-Gamboa, L.J., et al., 2020.

Anchatipán Escobar, J., Vailati, J., Viteri-Robayo, C. 2020 explican mejor en qué consisten los tres cuadros clínicos:

“La intoxicación aguda, también conocida como síndrome colinérgico se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora; el síndrome intermedio, el cual aparece posterior a 24 - 48 horas de la exposición se caracteriza por debilidad de los músculos proximales de las extremidades, flexores del cuello, lengua, faringe y músculos respiratorios, disminución o ausencia de los reflejos miotendinosos y compromiso de pares los craneales (principalmente el sexto); la neuropatía retardada o tardía se presenta principalmente con los compuestos que contienen flúor, puede iniciarse entre una a cuatro semanas después de la exposición aguda al pesticida, se manifiesta con debilidad ascendente pero de predominio distal, ataxia, hipotrofia muscular, hiporreflexia en miembros inferiores, calambres, parestesias, dolor neuropático, e hipoestesia”.

Esta además mencionar que la incidencia de estos cuadros clínicos y la aparición de otro de tipo de enfermedades está relacionada directamente con el tipo de contacto que se tenga y el tiempo de exposición a pesticidas organofosforados. Por otro lado la intoxicación por Paraquat tiene un mecanismo de acción muy distinto al de los organofosforados, como lo explica Elena Real, C.A., Pasión Galván, R., Pérez Artés M.R., Puerto, M. y Moreno, I. 2012, este actúa disminuyendo el transporte de electrones de NADP, lo cual permite la formación de radicales iónicos superóxido y peróxido de hidrogeno, estos al descomponerse oxidan lípidos de membrana afectando su permeabilidad llevando a la muerte celular (figura 2), todo esto ocurre principalmente a nivel de las células pulmonares ya que por las características moleculares del Paraquat, este tiene aspectos similares a los receptores de membrana de los alveolos, aunque también tiene un efecto sobre otro tipo de órganos como hígado y riñón. (Viales López, G., 2014).

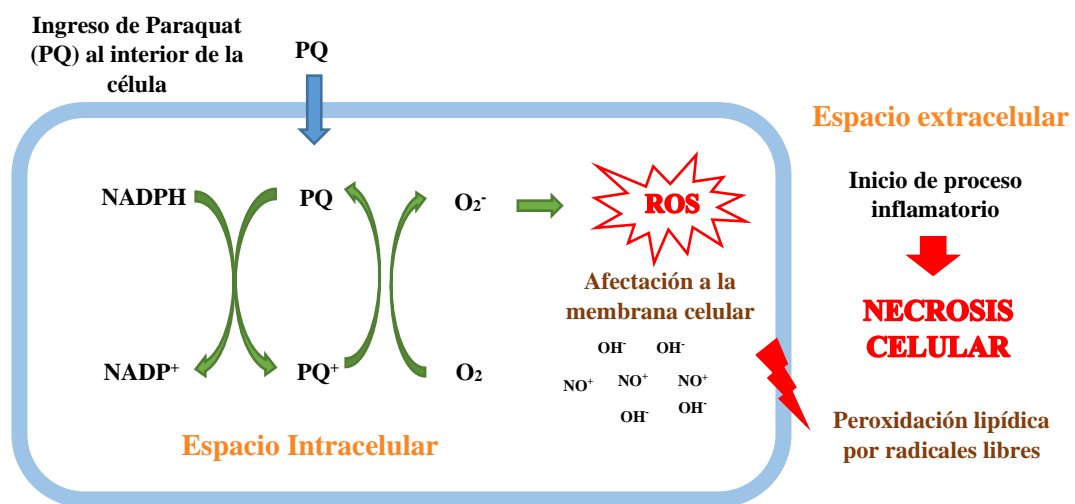


Figura 3: Intoxicación por Paraquat – mecanismo de acción Fuente: Ballesteros, D., Soto Oviedo, A., Murillo Palacios, J y García, C., 2021.

Estos dos ejemplos muestran algo ya mencionado por Astiz M., de Alaniz J.T. y Marra C.A., 2009 que explica que la toxicidad que presentan en su mayoría los plaguicidas es debido a mecanismos de estrés oxidativo, provocando un desequilibrio redox dentro de la célula. En el caso del Glifosato, este tiene repercusiones importantes a nivel genético, ya que se ha visto que tiene la capacidad de afectar la división celular (Barbosa, M.C., Aiassa, D. y Mañas, F., 2017), interviniendo en la activación del complejo ciclina B/CDK1, conocido también como factor promotor de mitosis ya que este complejo es necesario para que la célula ingrese a las primeras fases de la mitosis hasta la formación del huso mitótico (Veas-Pérez de Tudela Rodríguez, M., 2015), siendo también este conocido como un punto de control del ciclo celular, por lo tanto se afirma que perturbaciones en este punto de control dirigen a la célula a una inestabilidad genómica que puede desencadenar algún tipo de neoplasia (Barbosa, M.C. et al., 2017).

Asimismo, existen ciertos órganos como el hígado, que gracias a una de sus funciones como el metabolismo de xenobióticos, pueden ser afectados por la exposición constante a plaguicidas, así lo afirman Sarabia Núñez, C., Negrón Ballarte, L., Meléndez Serrano, M., Pérez González, R. (1998) los cuales describen ciertas alteraciones a nivel de este órgano que son indicadores precisos de reacciones tóxicas que podrían ser provocadas por la exposición crónica o aguda a estos agentes agrotóxicos, por lo cual sugieren que la evaluación diagnóstica de enzimas hepáticas como la Transaminasa Glutámico-Oxalacético (GOT) y la Glutamato-Piruvato Transaminasa (GPT) son relevantes para la evaluación de daño frente a estos tipo de intoxicaciones.

Fuentes Delgado, V.H., Quezada Aguilera, C.L., Martínez Saldaña, M.C., Jaramillo Juárez, F., Rodríguez Vázquez, M.L., Jaramillo Gonzales, F. y Reyes Sánchez, J.L., 2011 realizaron un estudio en ratas donde evaluaron la hepatotoxicidad subaguda y crónica producida frente a la exposición a ciertos plaguicidas organofosforados, mostrando un incremento significativo en las concentraciones séricas de GOT y GPT, además de evidencias de necrosis hepática. Tanto el trabajo de Sarabia Núñez, C., et al., 1998, como el de Fuentes Delgado, V.H., et al., 2011, muestran evidencias sobre la importancia de considerar a estas dos transaminasas como parte de las pruebas de control o monitoreo sobre poblaciones expuestas a estos agentes químicos.

2.1.2 Estudios de biomonitorización como medio de control para grupos de riesgo.

La biomonitorización es la acción más empleada para el control de enfermedades provocadas por la exposición constante a plaguicidas sobre grupos de alto riesgo o directamente afectadas. Larrea Poma, M. et al, 2010, afirman que: “se requieren de estudios de biomonitorización para evaluar las enfermedades agudas y crónicas ocasionadas por la exposición a plaguicidas. La importancia de la biomonitorización de riesgo genotóxico consiste en la identificación de biomarcadores de genotoxicidad que

pueden definir un estado de prepatogénesis y dar las pautas para la prevención de la enfermedad”, esta idea también es apoyada por Gentile, N., Bernardi, N., Bosch, B., Mañas, F., y Aiassa, D., 2016: “El monitoreo de grupos de población humana expuestos a agentes con potencial para producir daño sobre el organismo tiene como objetivo preservar la salud y la calidad de vida en especial de aquellos grupos que son de alto riesgo, debido a la naturaleza de las sustancias a que están expuestos”.

Tal como Larrea Poma, M. et ál., 2010, señala es imprescindible la identificación de biomarcadores que puedan ayudar a definir el estado de salud de una persona, ahora bien, se debe saber que son y como se los clasifica. Arango V, S.S., 2012 da la siguiente definición: Biomarcador es el término utilizado tras medir la interacción entre un sistema biológico y un agente químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. Martínez Valenzuela, C., et al., 2007 menciona que los biomarcadores o marcadores biológicos como también los nombra, se clasifican en tres grupos: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

Arango V, S.S. et al., 2012 explica esta clasificación:

“Los biomarcadores de exposición, evalúan la existencia de alguna sustancia exógena, metabolito o algún producto formado por la interacción entre xenobióticos y una molécula o célula diana. Los biomarcadores de efecto, evalúan alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de comportamiento producidas en el organismo que permite relacionarlas con alguna enfermedad. Los biomarcadores de susceptibilidad muestran la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder frente a la exposición a una sustancia xenobiótica”.

Teniéndose ya conocimiento de lo antes mencionado, de igual modo, es relevante tener en cuenta que, cuando se realiza un estudio de Biomonitorio por exposición a plaguicidas y se pretende evaluar su efecto sobre la salud en una determinada población se deben considerar varios factores que permitan evidenciar la confiabilidad de daño por exposición a estos agentes, la solidez del estudio y los protocolos a ser empleados (Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., & Bettershill, J.M., 2006).

Boogaard, P.J. y Money, C.D., 2008 realizaron la propuesta de un marco que permite interpretar de la mejor manera los datos que se obtienen luego de la biomonitorización a una población. Ellos explican que este marco se desarrolla en base a la integridad analítica (control interno y buen manejo de protocolos en las tres fases analíticas), la capacidad para describir la toxicocinética (conocimiento de la dosis que se traduce en la exposición a una sustancia en función al tiempo), la capacidad para relacionarla con los efectos (relación causal de los biomarcadores empleados con las hipótesis planteadas) y la

evaluación general y peso de la evidencia (se evalúan todos los datos disponibles de manera independiente donde se requiere pericia en el tema).

2.1.3 Evaluación de anomalías nucleares en células de la mucosa oral.

Se tiene claro que la exposición aguda o crónica a plaguicidas ya sea por motivos ocupacionales o contacto indirecto (por medio del consumo de alimentos o agua) trae consigo una serie de problemas o riesgos para la salud humana y el medio ambiente, por lo cual la biomonitorización de estas poblaciones por medio del uso de distintos biomarcadores juega un papel importante como mecanismo de control para la salud pública.

El verdadero reto es el de identificar de manera específica los efectos que se desarrollan en cada individuo, ya que no todos tienen el mismo grado de exposición, puesto que algunos tienen más años que otros expuestos a estos compuestos y no todos utilizan las mismas mezclas para sus cultivos (esto en caso de los agricultores), por lo que se recomienda realizar el Biomonitorio de manera puntual, tomando siempre en cuenta los efectos más comunes y los más relevantes para la salud, sabiendo que estos pueden provocar daño a distintos niveles, tales como, neurotóxico, inmunológico, y también a nivel del material genético. (Matheus, T., Aular, Y., Bolaños, A., Fernández, Y., Barrios, E. y Hung, M-L., 2017).

El daño citogenético es bastante común en la población agrícola debido a la naturaleza de los plaguicidas que utilizan, este consiste en cambios y alteraciones en el número o estructura de los cromosomas, para esto existe un grupo de biomarcadores denominados de genotoxicidad, los cuales forman parte de los marcadores de efecto y han sido aplicados ampliamente en programas de Biomonitorio por exposición a agroquímicos organofosforados, dentro de los cuales destacan el ensayo de micronúcleos (MN) que va de la mano con la evaluación de anomalías nucleares (AN), ensayo del cometa (EC) y aberraciones cromosómicas (AC) (Martínez Valenzuela, C., y Gómez Arroyo, S., 2007).

Los micronúcleos son material genético nuclear no incorporado al mismo, es decir material genético que se ha separado del núcleo en el proceso de mitosis celular, normalmente se forman entre la metafase y anafase, estos pueden ser fragmentos de cromosomas provocados por daño clastogénico o bien pueden ser cromosomas completos que se separaron por daño al huso mitótico conocido también como efecto aneuploidógeno (figura 3) (Zúñiga Gonzales, G.M. y Gómez Meda, B.C., 2006). Si bien estos efectos pueden suceder de manera espontánea dentro del núcleo de la célula Taborga Manrique, X., Quispe Aruhuito, R., Larrea Poma, M.M., Farfán Ochoa, P., y Revollo Zepita, S., 2016 aseguran que ciertos factores como la radiación, errores en la replicación y la exposición a sustancias genotóxicas provocan la formación de micronúcleos.

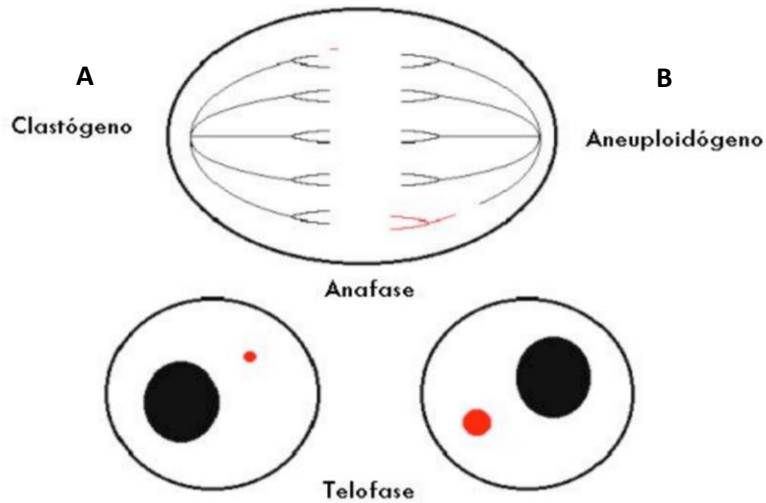


Figura 4: Formación de micronúcleos. A) Provocado por daño clastogénico, se forma un micronúcleo más pequeño; B) Provocado por efecto aneuploidógeno, se forma un micronúcleo de mayor tamaño. Fuente: Núñez Figueroa L.J., Ramos Ibarra M. L., Zalapa Hernández S. S., Guerrero Vázquez S., Zavala Cerna M. G. y Torres Bugarín O., s.f..

De manera convencional el ensayo de micronúcleos se realiza en cultivos celulares de linfocitos a partir de sangre total (Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. y Marques, E.K., 2003), en el cual se frena la citocinesis utilizando citocalasina B, una molécula venenosa aislada de ciertos hongos que impide la polimerización de filamentos de actina y miosina que son necesarios para la creación del anillo contráctil que permite la división celular luego de la telofase, lo cual permite la formación de linfocitos binucleados que han sufrido una sola división y en los cuales es posible evaluar daño citotóxico (Figura 4) (Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., y Patiño, A., 2005).

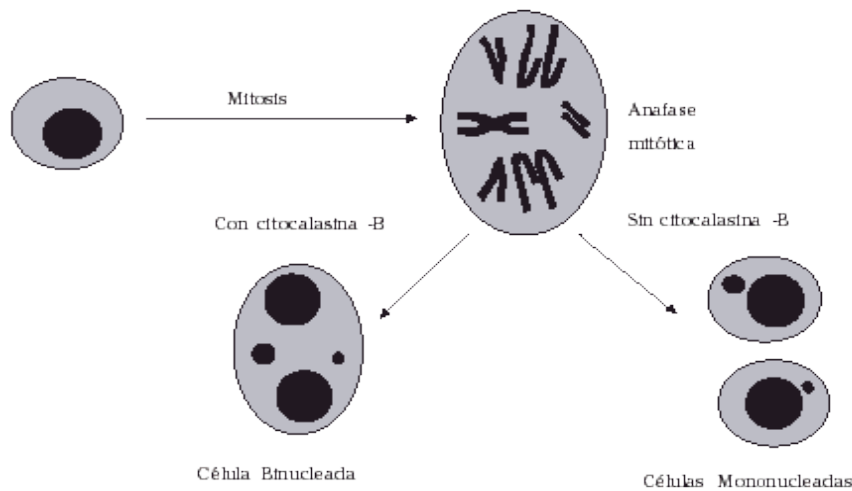


Figura 5: Ensayo de micronúcleos en cultivo celular de linfocitos en el cual se observa la acción de la citocalasina B permitiendo la formación de células binucleadas. Fuente: Zalacain, M., et. al., 2005.

El ensayo de micronúcleos también puede realizarse sobre células del epitelio de la mucosa bucal, esto permite a su vez evaluar no solamente los micronúcleos sino también anomalías nucleares tales como cariorrexis, cariólisis, picnosis, broken eggs entre otros, que también tienen una relación con el daño genotóxico. Estas características permiten que estos ensayos sean muy empleado en los laboratorios, ya que la recolección de la muestra es menos invasiva y más cómoda para los pacientes (comparada con la toma de muestra de sangre), esto lo respalda Ferré, D. M., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., Carracedo, R., y Gorla, N.B., 2018, afirmando: “El ensayo de MN en células exfoliadas del epitelio bucal no requiere del cultivo de células, por lo tanto además de ser un método mínimamente invasivo y con una obtención de la muestra en forma sencilla, requiere de un menor tiempo de realización comparado con los estudios en sangre”, esta característica es más beneficiosa si para el estudio se toma en cuenta a una población infantil.

Torres Bugarín, O. y Ramos Ibarra, M.L., 2013, comentan lo siguiente:

“Se ha descrito a la cavidad oral como el espejo que refleja la salud del individuo, pues en la mucosa que recubre la boca se observan cambios indicativos de enfermedad, además permite identificar efectos locales de tabaco o alcoholismo; puede revelar condiciones sistémicas, como la diabetes o la deficiencia vitamínica o bien, podría mostrar efectos secundarios originados por tratamientos quimioterapéuticos y radioterapia, ya que estas limitan la capacidad proliferativa de las células epiteliales (...), las características del epitelio de la mucosa oral que favorecen su utilización en pruebas para evaluar genotóxicos o citotóxicos, es el punto de contacto que tiene con muchos agentes potencialmente peligrosos, como los plaguicidas, por lo tanto; representa una barrera protectora para potenciales carcinógenos los que al ser metabolizados generarían múltiples metabolitos reactivos; este tejido sí protege al resto del organismo de que estos compuestos penetren a otros órganos; sin embargo, la mucosa al estar expuesta a estos agentes, es susceptible de sufrir daño”.

Asimismo, la evaluación de anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa bucal brinda también información valiosa relacionada con el daño citotóxico o genotóxico y puede ser considerado como biomarcador de daño cromosómico en personas expuestas a agentes dañinos como los plaguicidas (Tonina, E., Garcete, T., Samaniego, M.J., Aveiro, R., Aranda, A., Ortiz, J., Thielmann, B., Segovia, J., Castiglioni, D. y Franco de Diana, D., 2017). Existe una variedad de anormalidades nucleares, donde cada una presenta características particulares (figura 5):

a) Células binucleadas.

Las células binucleadas se caracterizan por tener dos núcleos morfológicamente idénticos o muy parecidos, su formación se da principalmente por fallas en la citocinesis, por lo cual una célula binucleada es una célula que no ha podido completar su fase de división o mitosis. Se ha relacionado la presencia abundante de células binucleadas en individuos que presentan aneuploidías, siendo la relación célula binucleada/célula mononucleada un biomarcador eficaz para evaluar fallas en la citocinesis y la susceptibilidad a la aneuploidía (Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyanyan, A., Thomas, P., & Fenech, M., 2013) (Figura 6a).

b) Células con nuclear buds (Broken eggs).

También conocidas como células con brotes nucleares (NBUD), son células que muestran lóbulos nucleares que se encuentran aún unidos al núcleo principal por un hilo o puente delgados de cromatina, estos lóbulos tienen características idénticas al núcleo exceptuando su tamaño. Se les ha dado el nombre de "Broken egg" de manera general y se les ha relacionado como indicadores de genotoxicidad en cultivos de linfocitos, pero en células exfoliadas de la mucosa bucal se las puede relacionar con más tipos de enfermedades o problemas de salud (Torres Bugarín, O., et al., 2013) (Figura 6b).

c) Células con núcleo en picnosis.

Las células en picnosis se caracterizan por tener un núcleo encogido llegando a medir hasta una tercera parte de su tamaño normal, esto debido a la condensación de la cromatina que sufren las células que entraran en apoptosis, es por eso que este tipo de células se las relaciona también con muerte celular por necrosis cuando existe un daño irreparable, por lo cual ciertos autores consideran que este antecede a otro tipo de anomalías nucleares como la cariorrexis (Zamzami, N., y Kroemer, G., 1999) (Figura 6c).

d) Células con núcleo en cariólisis.

Las células en cariólisis tiene la peculiaridad de presentar un núcleo "fantasma", es decir que su material genético se ha degradado casi o en su totalidad, pero algunas células presentan restos de proteínas que formaron parte del armazón nuclear. De manera general las células en cariólisis se presentan luego de los procesos de apoptosis o necrosis, es decir que son un signo de completa muerte celular al haberse perdido por completo el material genético (Majno, G. y Joris, I., 1995) (Figura 6d).

e) Células con núcleo en cariorrexis.

Las células en cariorrexis se caracterizan por tener un núcleo denso en el cual la cromatina se encuentra extensamente agregada, es decir que estas células presentan un núcleo muy

fragmentado. Las células en cariorrexis son indicadores de muerte celular por necrosis el mismo que puede ser provocado por intoxicación al estar expuesto a plaguicidas (Benítez-Leite, S., Macchi, M.L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E., Mojoli, A., Cuevas, F., Alfonso, J. y Sales, L., 2012) (Figura 6e).

f) Células con núcleo condensado.

Son células que presentan un núcleo con un patrón de condensación estriado o moteado, es decir que ciertas regiones al tñirlas denotan una mayor intensidad que otras, estas características se las asocia con etapas iniciales de la apoptosis (Torres Bugarín, O., et al., 2013) (Figura 6f).

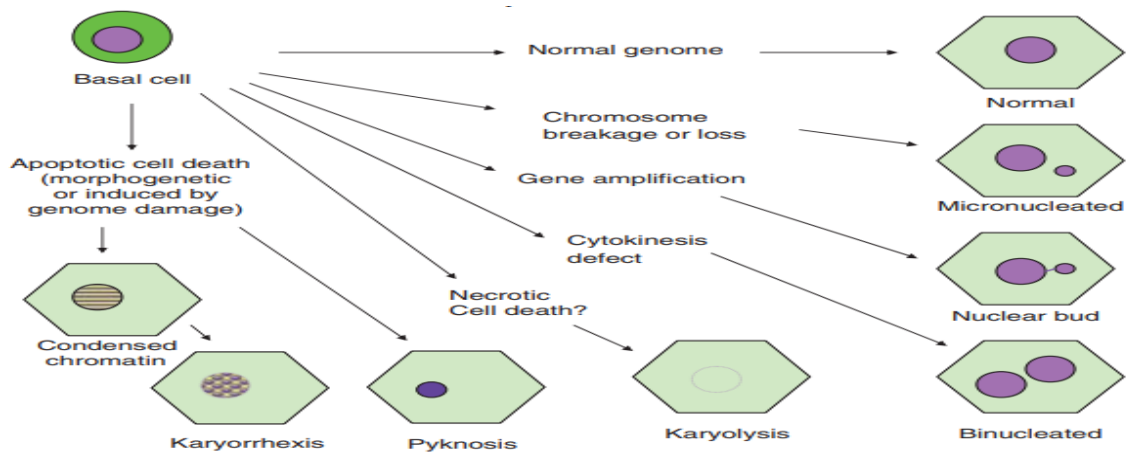


Figura 6: Esquema de los diferentes tipos de anomalías nucleares que pueden evaluarse en células exfoliadas de la mucosa bucal. Fuente: Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Siegfried Knasmueller, S., y Fenech, M., 2009.

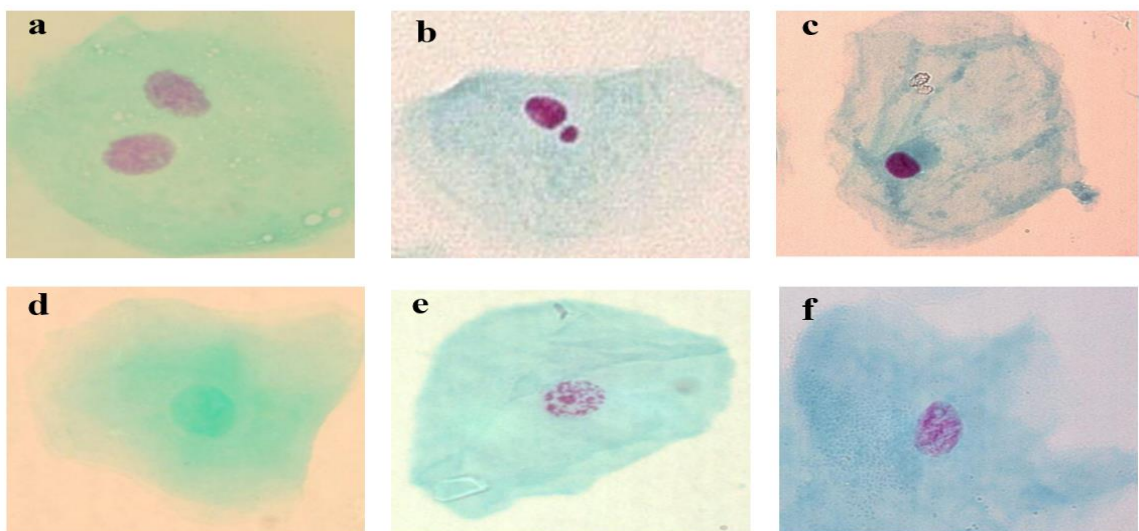


Figura 7: Tipos de anomalías nucleares en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal. a) célula binucleada; b) célula con núcleo en Broken egg; c) célula con núcleo en picnosis; d) célula con núcleo condensado; e) célula con núcleo fragmentado; f) célula con núcleo condensado.

con núcleo en cariólisis; e) célula con núcleo en cariorrexis; f) célula con núcleo condensado. Fuente: Bolognesi, C., et al., 2013.

Un detalle importante a considerarse cuando se utiliza este tipo de biomarcadores para evaluar el daño genotóxico en una determinada población es contar con un protocolo que garantice una buena puntuación de células. Bolognesi, C., et al., 2013 realizó una encuesta en la cual comparó datos recopilados de 30 laboratorios, donde encontró una alta variabilidad entre resultados, y la que le permitió concluir que esta alta variabilidad estadísticamente se debía al protocolo de tinción utilizado para las células bucales, observando que en los estudios en los cuales se aplicó la tinción de Giemsa o Aceto orceína, la frecuencia de micronúcleos por ejemplo era más elevada, dando a entender que la poca especificidad de la tinción llevaba a un mayor número de resultados falsos positivos, es por ese motivo que la mencionada autora recomienda que se utilicen tinciones específicas para material genético nuclear, como la tinción de Feulgen Fast-green. Además, cuando el objetivo es el poder observar de manera específica material nuclear varios autores recomiendan utilizar fijadores también específicos, uno bastante utilizado es la solución de Farmer.

La solución de Farmer es un fijador anhidro compuesto por una mezcla de alcohol etílico y ácido acético (3:1). Por separado el etanol es un fijador simple que deshidrata a la célula y coagula a las proteínas, especialmente las presentes en el citosol, el ácido acético permite que ocurran cambios del estado coloidal de las proteínas y se considera un fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas, pero trae algunos inconvenientes como la destrucción de mitocondrias y mala fijación de membranas y citoplasma, por lo cual se recomienda el uso del ácido acético combinado con algún otro fijador. Por este motivo el también conocido como reactivo de Farmer es utilizado comúnmente como fijador para muestras histológicas en las cuales el objetivo principal sea observar las características del material genético, como en los trabajos de evaluación de daño genotóxico Marcela Delgado, L., Uribe Lastra, M., Marulanda Ángel, M.L. (2010) afirman: “Por regla general, en citogenética es de gran interés principalmente realizar observaciones de morfología, asociación y número de cromosomas, por lo que es de gran utilidad un fijador de acción rápida y violenta; de reacción ácida y deshidratante, que conserve el nucléolo, los cromosomas y el huso acromático, uno de los fijadores más comúnmente utilizados por cumplir con estas características es el Reactivo de Farmer”.

La tinción de Feulgen – Fast-green (FFG) es una de las tinciones más utilizadas actualmente para el estudio de los micronúcleos y otras anomalías nucleares en células de mucosa bucal, ya que facilita la identificación y conteo de micronúcleos al microscopio (Salas Arias, J.R. 2018), esto es debido a que es una tinción específica para ADN (Carvajal, D., Manquillo, J.C., Rosero Caldon, A.B., Perafán Collazos, J., Álvarez Rosero, R., Montero, J., y Cajas Salazar, N., 2017). Además, si bien la metodología como tal

implica una inversión de tiempo más prolongado en comparación a otras técnicas, esta permite obtener un resultado más estético (Carvajal, D. et al., 2017).

De manera general la tinción de FFG inicia con una hidrolisis ácida suave con ácido clorhídrico (HCl), el cual rompe los enlaces glucosídicos entre la desoxirribosa y las bases púricas (adenina y guanina), produciendo la apertura de los anillos de las desoxirribosas, las cuales reaccionan y pasan de su forma furanósica a la de aldehído (Guerrero, R. (Ed.), 1980) (figura 7), luego se trata con el reactivo de Schiff, el cual es una fucsina básica que al tener contacto con grupos aldehídos, formados a partir de la desoxirribosa, toma una coloración magenta intensa (Brusco, H. A., López Costa, J.J., Loidl, C. F., 2014), dando como resultado ADN (cromatina nuclear o cromosomas dependiendo de la fase de ciclo celular en la que se encuentre la célula) teñido de color magenta y el citoplasma incoloro. Además, gracias a la hidrolisis acida gran parte del ARN sino es que en su totalidad desaparece, el ARN se solubiliza y se pierde en el tejido, sin ser removidos los grupos ribosil debido a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, por lo cual este no forma grupos aldehídos, por lo tanto, no reaccionará posteriormente con el reactivo de Schiff. Zamorano Vásquez, C., 2014).

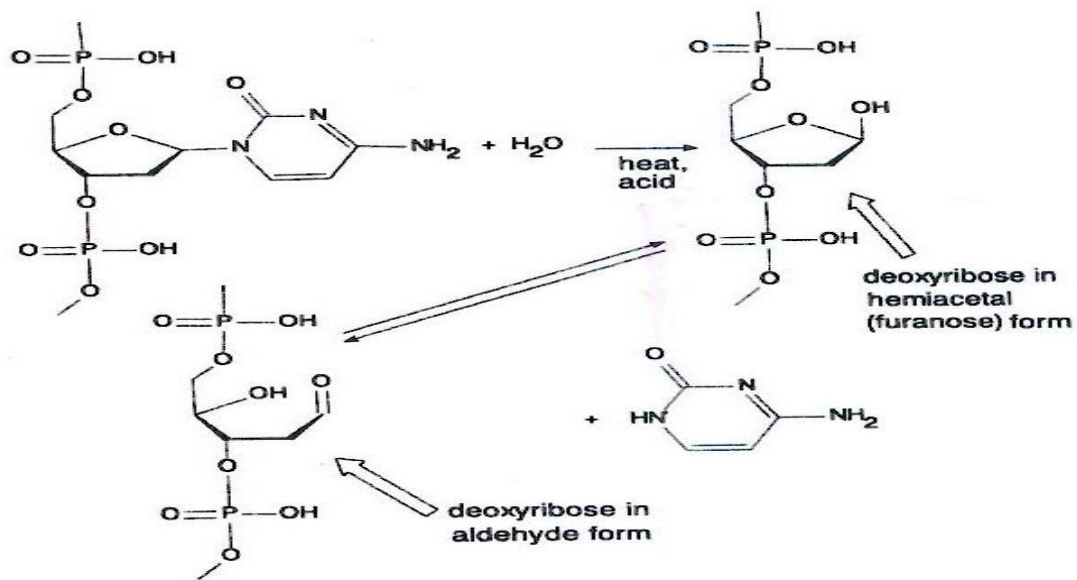


Figura 8: Fenómenos moleculares de la exposición del ADN a la hidrolisis acida. Fuente: Zamorano Vásquez, C., 2014.

2.1.4 Polimorfismos genéticos.

Un polimorfismo genético es aquella variación presente en el genoma que se da por la aparición de mutaciones, normalmente por cambio de una única base (single nucleotide polymorphism o SNP), o por repeticiones en tándem de fragmentos de bases más grandes (pueden ser: variable number tandem repeat o VNTR; short tándem repeat o STR),

además, estas variaciones se pueden transmitir a la descendencia (Salazar Montes, A.M., Sandoval Rodríguez, A.S. y Armendáriz Borunda, J.S., 2013).

Los polimorfismos pueden provocar ciertas ventajas en los individuos que las presentan, pero también se ha visto una relación con la aparición de ciertas patologías o la susceptibilidad a contraer alguna de las mismas, es por esa razón que existen muchos trabajos dirigidos a identificar genes polimórficos específicos que tengan influencia con el riesgo de padecer alguna enfermedad pero con una baja probabilidad (conocidos como polimorfismos de baja penetrancia), comúnmente para que se expresen estos polimorfismos es preciso la exposición a ciertos agentes. (Iniesta, R., Guinó, E. y Moreno, V., 2005).

Dicho de otra forma, ciertos polimorfismos genéticos son empleados como biomarcadores para evaluar exposiciones que pueden causar enfermedades, encontrar factores genéticos o adquiridos que pueden cambiar la susceptibilidad individual hacia una enfermedad y validar los biomarcadores de efecto temprano que puedan predecir el riesgo de cáncer y ser empleados para el diseño de estrategias de intervención, prevención y promoción en la salud (Gentile, N. et ál., 2016).

Tirado Bustillos, N.S., 2010 brinda varios ejemplos de polimorfismos genéticos de enzima implicados en el metabolismo de Xenobióticos tales como: ALDH2 (aldehído-deshidrogenasa 2), CYP1A1, CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 EPHX, GSTM1, GSTP1, GSTT1, NAT2, NQO1 (NADPH-quinona-oxidoreductasa) y PON1 (paraoxonasa), donde luego afirma que: “se ha demostrado que distintos genes polimórficos como los que codifican para el Citocromo P450 (CYP), las Glutatión S transferasas (GST) y los genes Paraoxonasa (PON) son algunos responsables del metabolismo de los plaguicidas”.

Se ha creado una asociación entre las variaciones genéticas del citocromo P450 y condiciones patológicas relacionadas con la exposición a compuestos organoclorados (Docea, A.O., Vassilopoulou, L., Fragou, D., Arsene, A.L., Fenga, C., Kovatsi, L., Petrakis, D., Rakitskii, V.N., Nosyrev, A.E., Izotov, B.N., Golokhvast, K.S., Zakharenko, A.M., Vakis, A., Tsitsimpikou, C., y Drakoulis, N., 2017).

Además, el citocromo P450 también está involucrada en el metabolismo de los organofosforados, trabajando de forma conjunta con las GST y PON1. Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B.D., Singh Rautela, R., Sunder Grover, S., Singh Rawat, D., Tazeen Pasha, S., Kumar Jain, S., Rai, A., 2011 explican el mecanismo de acción: “Los organofosforados son metabolizados principalmente por diferentes citocromos P450s hepáticos transformándolos en intermediarios activos llamados oxones-organofósforados. Este oxon-organofosforado intermedio activo es hidrolizado por la

paraoxonasa a fosfato de dietilo y 4- nitrofenol o conjugado a glutatión, con la posterior catálisis por varios Glutatión S-transferasas (GST)”.

Gracias al mecanismo descrito anteriormente se evidencia las funciones que cumplen los genes PON1 en la hidrólisis de oxones bioactivos (Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Singh Rautela, R., Sunder Grover, S., Singh Rawat, D., Tazeen Pasha, S., Kumar Jain, S., Lal Ichhpujani, R., & Rai, A. 2011), que son activados por el citocromo p450 (Miranda Adad. L.M., Rodrigues de Andrade. H.H., Kvitko, K., Lehmann, M., Carvalho Melo Cavalcante, A.A. y Rodrigues Dihl, R., 2015), y la acción de los distintos polimorfismos de la glutatión transferasa, GST M1 (mu), T1 (theta), y P1 (pi), que de manera general participan en el metabolismo de muchos compuestos endógenos y exógenos (Singh, S., et ál., 2011) y, en el caso particular de los plaguicidas ayudan a su detoxificación por conjugación a glutatión (Saad-Hussein, A., Noshay, M., Taha, M., El-Shorbagy., H. Shahy, E., y Abdel-Shafy, E., 2017).

2.1.5 Variantes del gen de la Paraoxonasa 1.

La paraoxonasa 1 es una enzima lactonasa ligada a lipoproteínas de alta densidad o HDL (siglas por su nombre en inglés high density lipoprotein), además depende del ion calcio. Se ha visto que esta enzima cumple distintas funciones dentro del organismo, principalmente la hidrólisis de distintas moléculas tales como: lactonas, tiolactonas, ésteres arílicos, esto le permite colaborar en la reducción de formación de lípidos peroxidados por lipoproteínas de baja densidad o LDL (siglas por su nombre en inglés low density lipoprotein) previniendo su oxidación, y también está relacionada con el metabolismo de los plaguicidas organofosforados (OP) (Carranza Alva, E., Peña Suasnábar, C. y Florentini Carranza, A., 2017) ayudando a la desintoxicación del paraoxon activado que se forma por los mismos (Figura 8).

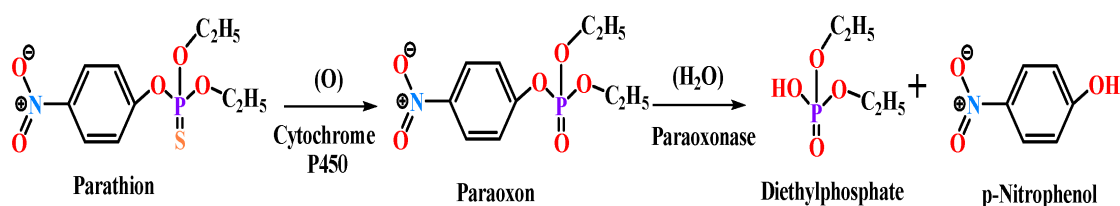


Figura 9: Reacción de hidrólisis de Paraoxon realizada por la enzima PON. Fuente: Mohammed, C.J., Lamichhane, S., Connolly, J.A., Soehnlén, S.M., Khalaf, F.K., Malhotra, D., Haller, S.T., Isailovic, & Kennedy D.J., 2022.

Esta enzima se expresa gracias al gen PON, el cual en el ser humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21-q22) (Rodríguez Esparragón, F., Hernández Trujillo, Y., Macías Reyes, A., Hernández Ortega, E., Medina, A. y Rodríguez Pérez, J.C., 2006) y presenta algunas variantes de interés, esto es mencionado por Fridman, Osvaldo, Fuchs,

Alicia Graciela, Porcile, Rafael, Morales, Analía Verónica, & Gariglio, Luis Osvaldo., 2011, los cuales explican que este pertenece a una familia de 3 genes: PON 1, PON 2 y PON 3, donde los tres comparten un 70% de similitud en sus respectivas secuencias, pero son expresadas en distintos tejidos. Los genes PON 1 y PON3 se expresan a nivel hepático, en cambio PON 2 lo hace además en cerebro, riñón y testículos. Otra diferencia es que tanto PON 1 y PON 3 son secretados a circulación y transportados, como ya se mencionó, mediante su unión a las HDL (Figura 10), en cambio PON 2 se encuentra solo dentro de la célula. Además, se ha podido comprobar que las tres isoformas de PON tienen una acción antioxidante, por consiguiente, tienen efectos antiinflamatorios en distintas patologías como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares.

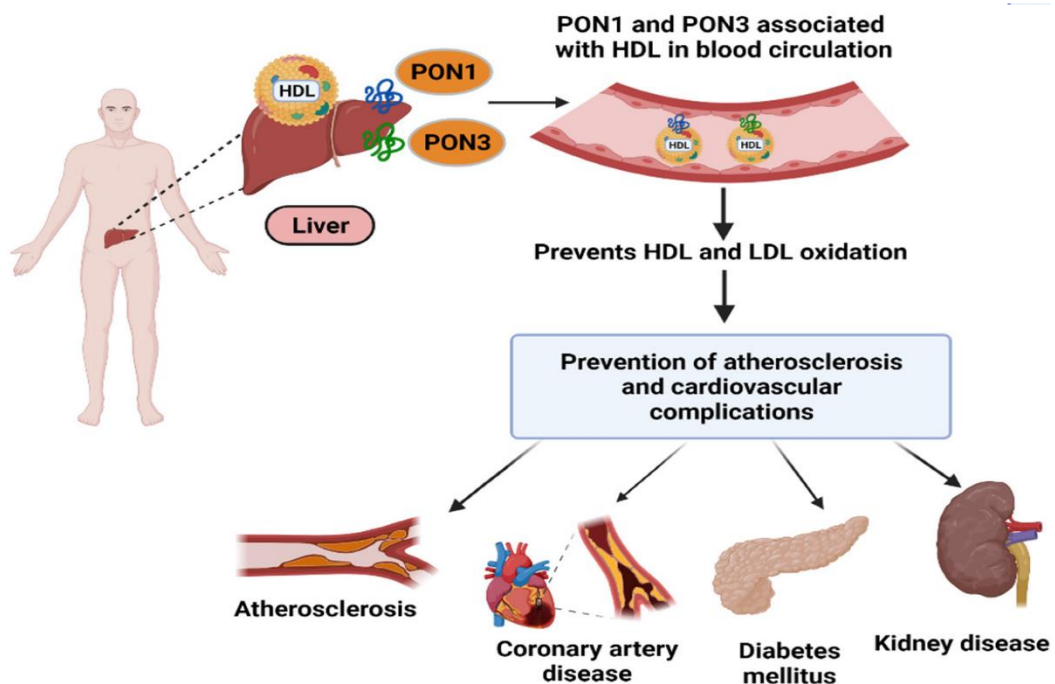


Figura 10: Síntesis de PON 1 y PON 3, su liberación y transporte a circulación y su relación con diferentes patologías. Fuente: Mohammed, C.J., et al., 2022.

A pesar de conocerse estas 3 isoformas, la más estudiada es la PON 1, la bibliografía permite saber que este gen presenta dos polimorfismos de simple nucleótido o "SNP" (siglas por su nombre en inglés Single Nucleotide Polymorphism) en regiones codificantes que afectan su actividad, la primera implica el intercambio de metionina por leucina en la posición 55 (55 L/M), y el segundo, el intercambio de arginina por glutamina en la posición 192 (192 Q/R). (Blanco Muñoz, J., Aguilar Garduño, C., Gamboa Avila, R., Rodríguez Barranco, M., Pérez Méndez, O., Huesca Gómez, C., González Alzaga, B & Lacasaña, M., 2013).

Se ha visto que el polimorfismo PON 1 (192 Q/R), tiene una importancia relevante frente al metabolismo de compuestos xenobióticos como algunos fármacos y también a los

plaguicidas organofosforados como el paratión, por su función como enzima paraoxonasa, esto excluye tanto a PON2 como a PON3, ya que a pesar de estar estrechamente relacionadas con PON1, estas no muestran una verdadera actividad paraoxonasa (referenciar), debido a que este polimorfismo "192 Q/R" afectara la actividad enzimática. La isoforma Q (genotipo PON 1 A), la cual se traduce en la glutamina, presenta una menor actividad enzimática que la isoforma R (genotipo PON 1 B), la cual se traduce en arginina. (Singh, S., et al., 2011).

Este concepto se respalda gracias a varias investigaciones realizadas, como por ejemplo Carranza Alva, E., et al., 2017 que asevera: "El alelo con arginina en la posición 192 (PON1R192) hidroliza paraoxon a una tasa más alta que el alelo con glutamina en esta posición (PON1Q192) ", también está el trabajo presentado por Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. y Furlong, C.E., 1993, que concluyen haber demostrado que la arginina especifica en la posición 192 para el gen PON 1 es de alta actividad mientras que una glutamina especifica en la posición 192 es la variante de baja actividad; por otra parte Trenk, D., Hochholzer, W., Fromm, M.F., Zolk, O., Valina, C.M., Stratz, C. y Neumann, F.J., 2011, mencionan que existen indicios de una formación más activa de metabolitos activos en pacientes homocigotos RR para el polimorfismo Q192R en relación a la acción del fármaco clopidogrel.

Además, Serrato, M. & Marian, A.J., 1995, complementa estas afirmaciones mencionando que la actividad enzimática del genotipo B (posición 192 R o arginina) es 10 a 40 veces superior al genotipo A (posición 192 Q o glutamina), es decir que, la actividad de esta enzima está determinada genéticamente de forma independiente en cada individuo.

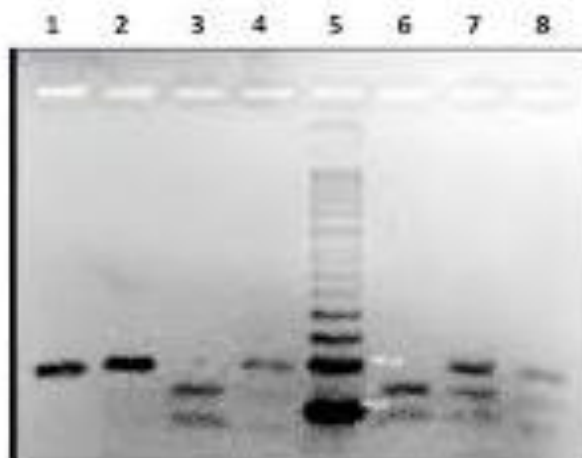


Figura 11: Corrida electroforética en gel de agarosa, mostrando los polimorfismos PON 1 Q192R por PCR – RFLP. Carriles 1 y 2 Homocigoto QQ; Carriles 3 y 6 Homocigoto RR; Carriles 4, 7 y 8 Heterocigoto QR y Carril 5 Ladder de 50 pb. Fuente: Carranza, A., et al., 2017.

2.2 Marco conceptual.

- **Acetilcolina:** La acetilcolina es un neurotransmisor que ejerce su acción en diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) así como en ganglios periféricos y en la placa neuromuscular. La neurotransmisión mediada por Acetilcolina es fundamental en la función del SNC; su interrupción abrupta es letal y su pérdida gradual, como en múltiples atrofas y en la enfermedad de Alzheimer, está asociada al deterioro cognitivo progresivo, autonómico y a la función neuromuscular. (Sánchez Chávez, G., Salcedo, R., 2008).
- **Acetilcolinesterasa:** La acetilcolinesterasa es una enzima que se encarga de la hidrólisis de acetilcolina en acetato y colina terminando su acción neurotransmisora, regulando a su vez la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (Sánchez Chávez, G., et al., 2008).
- **Agricultor:** Persona que se dedica a cultivar o labrar la tierra (Real Academia Española, 2021).
- **Alelo:** Formas alternativas de un gen o de una secuencia de ADN en un locus determinado. Cada individuo puede poseer un máximo de dos alelos distintos en cada locus, uno heredado del padre y otro de la madre (Torrico Arzadi, BN., 2006).
- **Amplificación genética:** Es el incremento en el número de copias de una secuencia génica ya sea *in vivo* o *in vitro*.
- **Anomalía nuclear:** Son diferentes estados de la cromatina nuclear que se utilizan como marcadores de citotoxicidad, estos normalmente se evalúan en células exfoliadas de la mucosa oral (Lazalde-Ramos, B.P., Zamora-Pérez, A.L., Sosa-Macías, M., Galaviz-Hernández, C. y Zúñiga-González, G.M., 2017).
- **Biomarcador:** son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico, además, suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades y se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos (Martínez Valenzuela, C., et al., 2007).
- **Biomonitorización:** Es la evaluación de la exposición a sustancias químicas sobre una población determinada en la cual se miden distintos tipos de biomarcadores presentes en diferentes tipos muestras biológicas, lo cual según los resultados

permite determinar el grado de exposición y daño que se ha alcanzado (Ríos B, J.C. y Solari G, S., 2010).

- **Cambio climático:** Cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo comparables (Responsabilidad Social Empresarial y Sustentabilidad, 2022).
- **Carbamatos:** Los carbamatos son sustancias orgánicas de síntesis conformadas por un átomo de nitrógeno unido a un grupo lábil, el ácido carbámico. Este tiene un efecto neurotóxico que, en la dosis correspondiente, conlleva a la muerte. Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos, característica ésta que lo posiciona en ventaja con respecto a los organoclorados de baja degradabilidad y gran acumulación (Carbamatos, s.f.).
- **Daño Clastogénico:** daño al núcleo celular provocado por compuestos químicos conocidos como clastógenos los cuales provocan la rotura o fragmentación de cromosomas ya que actúan como análogos de base intercalándose en el ADN e inhibiendo su síntesis y ocasionando debilitamiento de enlace entre las bases lo cual termina con la fractura cromosómica. (Cedano Díaz, A., Martínez González, S., Escalera Valente, F., Salgado Moreno, S., Carrillo Díaz, F., Macías Coronel H. y Peña Parra B., 2012).
- **Ecosistema:** El ecosistema es el conjunto de especies de un área determinada que interactúan entre ellas y con su ambiente abiótico; mediante procesos como la depredación, el parasitismo, la competencia y la simbiosis, y con su ambiente al desintegrarse y volver a ser parte del ciclo de energía y de nutrientes. (Biodiversidad Mexicana, s.f.).
- **Efecto aneuploidógeno:** Fenómeno celular en el cual un cromosoma entero no se une al huso mitótico y queda fuera del núcleo, puede ser provocado por sustancias conocidas como aneuploidogénicas, las cuales bloquean la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico, rezagando así cromosomas completos (Cedano Díaz, A., et al., 2012).
- **Enfermedad cardiovascular:** Son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos entre los que se incluyen: La cardiopatía coronaria, Las enfermedades cerebrovasculares, Las arteriopatías periféricas, La cardiopatía reumática, Las cardiopatías congénitas, Las trombosis venosas profundas y

embolias pulmonares (Sánchez Arias, A. G., Bobadilla Serrano, M. E., Bárbara Dimas Altamirano, B., Gómez-Ortega, M. y González González, G., 2016).

- **Enfermedad de Parkinson:** La enfermedad de Parkinson (EP) es un proceso neurodegenerativo complejo de aparición en la edad adulta, se caracteriza clínicamente por la presencia de la tríada motora acinesia o lentitud de movimientos, temblor de reposo y rigidez y por ello ha sido clásicamente considerada y estudiada como un trastorno motor (Martínez Fernández, R., Gasca Salas C., Sánchez Ferro, A. y Obeso, J.A., 2016).
- **Estrés oxidativo:** Ocurre cuando el cuerpo pierde la capacidad de mantener el balance de oxido-reducción, es decir que existe un desequilibrio entre la formación de moléculas oxidantes y la acción de moléculas antioxidantes (Dorado Martínez, C., Rugerio Vargas, C. y Rivas Arancibia, S., 2003).
- **Fungicidas:** Un fungicida es un producto químico tóxico utilizado para eliminar aquellos hongos que son una potencial amenaza para el desarrollo normal de las plantas o para la vida de los animales (Boletín Agrario, 2019).
- **Genotoxicidad:** Es la capacidad de desencadenar daño en una parte o en la integridad del material genético de una célula, en definitiva, sobre la molécula del ADN (Cosquillo-Rafael, M.F., Placencia-Medina, M.D., Miranda-Tomasevich, T.Y., Moreno-Hinojosa, M. y Retuerto-Figueroa, M.G., 2020).
- **Herbicidas:** Son productos químicos que se utilizan para inhibir o interrumpir el desarrollo de plantas indeseadas, también conocidas como malas hierbas, en terrenos que han sido o van a ser cultivados (Agroterra, 2021).
- **Ingrediente activo:** Los ingredientes activos son aquellas sustancias químicas que forman parte de los ingredientes de los pesticidas, estos se encargan de llevar a cabo la función principal del mismo, ya sea eliminar, controlar o repeler a la plaga. Normalmente se encuentran en cantidades mínimas dentro del producto y pueden existir diversas maneras para mencionarlo o nombrarlos (National Pesticide Information Center, 2015).
- **Insecticidas:** Son compuestos químicos utilizados para controlar o matar insectos portadores de enfermedades (Boletín Agrario, 2019).
- **Lactona:** Son ésteres carboxílicos cíclicos que contienen un enlace éster que tienen la capacidad de afectar el crecimiento celular, la señalización y la diferenciación (Mohammed, C.J., et al., 2022).

- **Micronúcleo:** Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicas (Zalacain, M., et al., 2005).
- **Medio ambiente:** Es el conjunto de todos aquellos elementos químicos, físicos y biológicos con los cuales los seres vivos interactúan. (Juste, I., 2022).
- **Mutación:** Cambios en la secuencia del ADN dentro de una célula provocados por factores internos como errores durante la división celular o factores externos como la exposición a ciertas sustancias presentes en el ambiente. Las mutaciones pueden provocar un efecto perjudicial, beneficioso o ninguno de estos anteriores, todo esto depende de donde y que tipo de mutación haya ocurrido.
- **Neuropatía:** Se define como un conjunto de consecuencias provocadas por el daño a los nervios principalmente periféricos (nervios fuera del cerebro y medula espinal), algunos síntomas comunes de neuropatía son debilidad, entumecimiento y dolor en manos y pies, aunque también estas pueden afectar otras regiones del cuerpo (Diccionario del Instituto Nacional del Cáncer., s.f.).
- **Neurotransmisor:** Es aquella sustancia que se libera por una neurona en la sinapsis y que afecta de manera específica a otra célula, ya sea una neurona o un órgano efector (Charroo Portilla, O., Cantalapedra Luque, A., Torres Quiala, M., Fernández Ortega, M., Fuentes Prats R.A., García Pérez, A. y Cantalapedra Luque, A., 2006).
- **Organofosforados:** Son sustancias orgánicas que tiene una estructura química de fósforo-carbono, que inhiben enzimas con actividad de la acetilcolinesterasa, lo que produce una acumulación de acetilcolina y como consecuencia una alteración en el impulso nervioso, muy utilizados en agricultura como insecticidas, para el control de plagas (Orias Vásquez, M., 2020).
- **Paraoxonasa:** Son una familia multigénica que consta de tres enzimas, PON1, PON2 y PON3, ubicadas en el cromosoma humano 7 (7q21.3–22.1), su papel fisiológico nativo es el de una lactonasa, aunque también poseen actividades de arilesterasa y organofosfatasa (Mohammed, C.J., et al., 2022).

- **Plaga:** En agricultura, una plaga es todo aquel organismo ya sea de origen animal, vegetal o microorganismo que tiene un efecto negativo sobre la producción agrícola (Zepeda Jazo, I., 2018).
- **Plaguicidas:** Es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos (Hurtado Clavijo, C.M. y Gutiérrez de Salazar, M., 2005).
- **Polimorfismo genético:** Son variaciones que ocurren dentro el ADN, ya sea por el cambio de una base (SNP) o varias (STR) (Almañ, M. 2015), normalmente para que se considere polimorfismo la frecuencia de uno de sus alelos debe estar presente en al menos más del 1% de la población en estudio (Checa Caratachea, M.A., 2007).
- **Radical libre:** Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital, capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas a través de su oxidación (Sánchez Valle, V. y Méndez Sánchez, N., 2013).
- **Salud pública:** Es una disciplina médica que integra conocimiento de variadas ramas de la medicina y otras disciplinas. (Hernández, I. Boluma, F. y Gil, A, 2005).
- **Transaminasas:** También llamadas aminotransferasas son enzimas celulares cuya función es la de catalizar la transferencia de grupos amino para producir ácido oxalacético y ácido pirúvico. La AST o GOT se localiza principalmente en el hígado, miocardio, riñón, encéfalo y musculatura esquelética; la ALT o GPT está presente en el hígado más que en los demás órganos (Mejía García, D.D., 2019)
- **Trastorno neurológico:** Son enfermedades del sistema nervioso central y periférico, es decir, que se originan por problemas en el cerebro, la médula espinal, los nervios craneales y periféricos, las raíces nerviosas, el sistema nervioso autónomo, la placa neuromuscular, y los músculos (Organización Panamericana de Salud).
- **Tinción:** Es una técnica utilizada en microscopía para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio, en la cual se utilizan colorantes y tinturas para resaltar estructuras en tejidos biológicos que van a ser observados con la ayuda de diferentes tipos de microscopios. Los diferentes colorantes pueden ser utilizados

para aumentar la definición y examinar grandes cortes de tejido o incluso para resaltar orgánulos dentro de células individuales (Tinción, 2022).

- **Xenobiótico:** compuesto químico que no se encuentran en la naturaleza y se obtienen de forma sintética (Nelson, D.L. y Cox, M.M., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN.

La actividad agropecuaria dentro del territorio nacional representa una de las fuentes de ingresos económicos más importantes, lo que se convierte en una práctica común el empleo de pesticidas para poder cuidar los campos y sembradíos de diversas plagas que amenacen los mismos, en virtud a esto los agricultores sufren de una exposición constante a estas sustancias convirtiéndolos en un grupo de alto riesgo.

Este problema repercute de manera alarmante sobre la salud de un gran número de habitantes, ya que la actividad agrícola es una de las fuentes laborales más importantes dentro del país. Según datos publicados el año 2020 por el Instituto Nacional de Estadística de Bolivia - INE, en su boletín sectorial número 1, referente al sector agropecuario, aproximadamente 1,6 millones de personas se dedican a actividades agropecuarias, de los cuales el 43,19 % (seiscientos noventa y un mil cuarenta personas) se dedican a la actividad agrícola propiamente dicha y el 38,93 % (seiscientos veintidós mil ochocientos ochenta personas) a una actividad mixta entre agricultura y ganadería, dando como total un 82,12% de personas (un millón trecientos trece mil novecientas veinte personas) que se encuentran por su actividad laboral expuestos constantemente a estos agentes genotóxicos.

Como ya se ha mencionado dentro del marco teórico, existen antecedentes que demuestran daño genotóxico en agricultores que están expuestos a plaguicidas en Bolivia, lo cual ha creado la necesidad de realizar estudios que permitan evaluar su estado de salud, para lo cual la biomonitorización utilizando marcadores biológicos específicos termina siendo la mejor alternativa a emplearse.

Situación antes expuesta que convierte en pertinente e importante la realización del presente trabajo, ya que se realizó el biomonitoreo en agricultores de distintas localidades del departamento de Santa Cruz (que se encuentra entre los dos departamentos con mayor actividad agrícola), localidades en las cuales solamente se había realizado un levantamiento de información, por lo cual se ha empleado biomarcadores de efecto y susceptibilidad genética, que permitieron evaluar la magnitud del daño genotóxico que podría influir en el riesgo de adquirir futuras enfermedades, como distintos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas, con el fin de contribuir y apoyar a las políticas de prevención del sector salud.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

¿Existirá relación entre el análisis de enzimas hepáticas GOT y GPT con el daño genotóxico y la frecuencia de polimorfismos PON 1 en agricultores expuestos a plaguicidas de diferentes municipios del departamento de Santa Cruz – Bolivia?

5. HIPÓTESIS.

Existe una relación entre los análisis de enzimas hepáticas GOT y GPT con el daño genotóxico y la frecuencia del polimorfismo PON 1 en agricultores expuestos a plaguicidas de diferentes municipios del departamento de Santa Cruz – Bolivia.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

- Evaluar el daño genotóxico, las enzimas hepáticas GOT y GPT y su relación con el polimorfismo PON 1 en agricultores expuestos a plaguicidas de diferentes municipios del Departamento de Santa Cruz – Bolivia.

6.2 Objetivos específicos.

- Analizar los factores higiénicos y de salud de los participantes en relación a la exposición a plaguicidas.
- Determinar el daño genotóxico mediante la evaluación de anomalías nucleares en células de mucosa bucal.
- Evaluar la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1 por medio de las técnicas de PCR-RFLP y qPCR en la población de estudio.
- Establecer la relación de los niveles séricos de las enzimas Glutaril Piruvato Transaminasa (GTP) y Transaminasa Glutámico-Oxalacético (GOT) en la población en estudio con los biomarcadores de efecto y susceptibilidad.

7. DISEÑO METODOLÓGICO.

7.1 Diseño.

Esta investigación implica el desarrollo de *un estudio correlacional de corte transversal*. Correlacional, porque se pretende conocer la relación o grado de asociación existente entre las variables en estudio. Transversal, porque se analizó la relación entre las variables en un punto de tiempo específico.

7.2 Lugar de estudio.

Las muestras y datos para el estudio se recolectaron de cinco localidades pertenecientes a cuatro municipios del departamento de Santa Cruz, Bolivia los cuales son: localidades de Mataral y Los Negros, pertenecientes al municipio de Pampa Grande de la provincia Florida; localidad El Carmen, perteneciente al municipio de El Carmen Rivero Torres de la provincia German Busch; localidad de Santa Rosa, perteneciente al municipio de Santa Rosa de Sara de la provincia Sara y localidad Yateirenda, perteneciente al municipio Cabezas de la provincia Cordillera. Se conoce que en estas regiones se emplea plaguicidas en agricultura debi la producción distintos productos agrícolas tales como hortalizas, frutas, maíz y soya.

7.3 Población de estudio.

La población de estudio fue registrada bajo el marco del Proyecto "*Biomonitorización de la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas de cuatro zonas agroecológicas de Santa Cruz*"; dicho proyecto, cuenta con el aval ético otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad Católica Boliviana "San Pablo" "Unidad Académica Santa Cruz con el código de protocolo # 025 del 9 de diciembre del 2019 (Anexo 1).

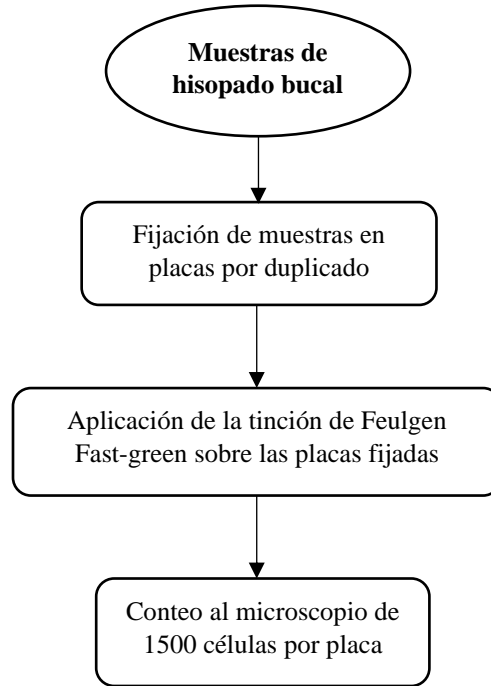
La población del referido estudio fue de 180 personas entre hombres y mujeres, que radican dentro de las localidades precitadas, ubicadas en las zonas agroecológicas de dicho Proyecto. Asimismo, a cada uno de los participantes se les entregó de forma escrita y se explicó de manera verbal la hoja de consentimiento informado (Anexo 2).

7.4 Métodos y técnicas a ser empleados.

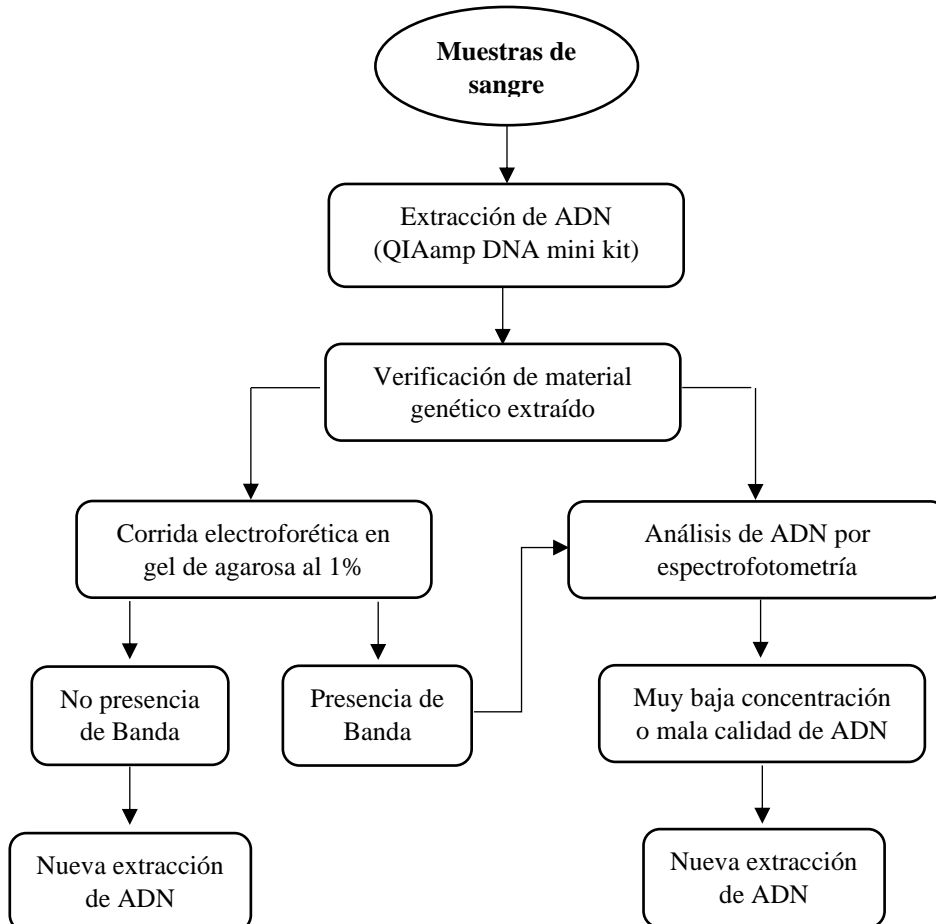
El Método experimental fue utilizado para el desarrollo del presente trabajo, el mismo que se desarrolla a continuación:

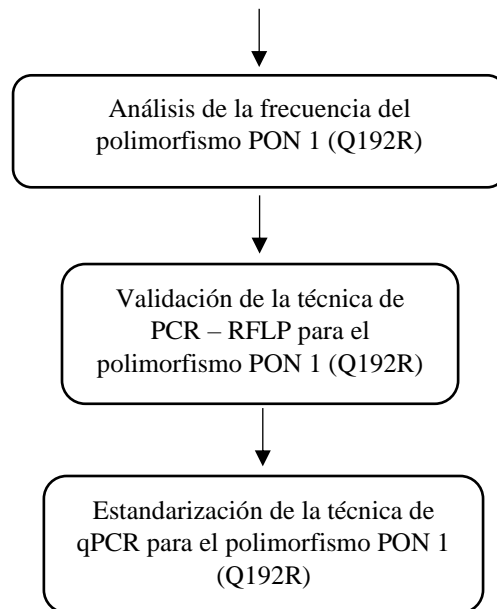
A. Métodos.

a. Evaluación de Anomalías nucleares.



b. Evaluación la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1.





B. Técnicas

a. Evaluación de Anomalías nucleares.

i. Fijación de placas.

- Las muestras recolectadas se conservaron en tubos cónicos de 10mL con una solución buffer para la conservación de las células de mucosa bucal.
- Se exprimió cada hisopo sobre la misma pared del tubo y se los retiró.
- Se centrifugó la solución a 1500 rpm durante diez minutos.
- Se aspiró el sobrenadante y se desechó teniendo cuidado de no resuspender el pellet formado.
- Se añadió tres mL de solución tampón TRIS.
- Se centrifugó nuevamente a 1500 rpm durante diez minutos.
- Se aspiró y desechó el sobrenadante sin tocar el pellet.
- Se resuspendió el pellet con tres mL de solución tampón TRIS.
- Se centrifugó nuevamente a 1500 rpm durante diez minutos.
- Se desechó una parte del sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en el sobrenadante restante (con el fin de obtener una buena densidad de células).
- Por goteo se añadió 50 uL aproximadamente de la muestra resuspendida sobre láminas de vidrio previamente identificadas.
- Se dejó secando las láminas a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

- Se realizó la fijación sumergiendo 5 segundos cada lámina en una solución de Etanol:Ácido acético (3:1).
 - Se dejó secando a temperatura ambiente y luego se las guardo hasta el momento de teñirlas.
- ii. Tinción de Feulgen Fast-green.**
- Se sumergió las láminas en etanol al 50% por un minuto.
 - Se secó la placa sobre papel absorbente (únicamente los bordes para retirar el etanol arrastrado por la misma).
 - Se sumergió las láminas en etanol al 20% por un minuto.
 - Se secó la placa sobre papel absorbente (realizar este procedimiento luego de cada paso).
 - Se enjuago las láminas en agua desionizada por dos minutos.
 - Se sumergió las láminas en ácido clorhídrico (HCl 5 Molar) durante treinta y cinco minutos.
 - Se enjuago las láminas con agua del grifo por dos minutos.
 - Se sumergió las láminas en solución de Schiff por setenta minutos.
 - Se enjuago las láminas con agua del grifo por 5 minutos.
 - Se enjuago las láminas nuevamente con agua desionizada por dos minutos.
 - Se sumergió las láminas en solución Fast-green 0,2% por diez segundos.
 - Se enjuago las láminas con agua desionizada por un minuto aproximadamente.
 - De dejo secando las placas a temperatura ambiente y se las guardo hasta el momento de sus lecturas.
- iii. Conteo de células al microscopio.**
- Se encendió el microscopio electrónico y se colocó la placa ya teñida sobre la platina.
 - Se enfoco la placa a un aumento de 40x.
 - Con ayuda de un contador se realizó la lectura de 1500 células epiteliales por placa.
 - Se utilizó el aumento de 100x (con aceite de inmersión) para observar núcleos bastante particulares.
- b. Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1 (Q192R) por PCR-RFLP.**
- i. Extracción del material genético.**
- Se alisto todo el material necesario para la extracción de ADN (micropipetas, tubos de 1,5 mL, tips, etc).

- Se pipeteo 20 μ L de proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en el fondo de un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
 - Se agregó 200 μ L de muestra de sangre al tubo de microcentrífuga.
 - Se agregó 200 μ L de tampón AL a la muestra. Mezclar vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 15 a 20 segundos.
 - Se llevó a incubación a 56°C durante 60 minutos.
 - Se realizó un spin para eliminar las gotas del interior de la tapa.
 - Se agregó 200 μ L de etanol absoluto a la muestra y se mezcló con ayuda de un vórtex durante 15 a 20 segundos.
 - Se realizó un spin para eliminar las gotas del interior de la tapa.
 - Se traspaso el volumen total de la mezcla a una columna QIAamp Mini.
 - Se llevo a centrifugación a 10000 rpm (revoluciones por minuto) por 5 minutos.
 - Se eliminó el filtrado dentro del tubo colector de la columna en un frasco de vidrio con una solución de hipoclorito al 1%.
 - Se adicionó 500 μ L de tampón AW1 a la columna QIAamp Mini y llevar a centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
 - Se eliminó el filtrado dentro del tubo colector de la columna en un frasco de vidrio con una solución de hipoclorito al 1%.
 - Se adicionó 500 μ L de tampón AW2 sin mojar el borde de la columna QIAamp Mini y llevar a centrifugación a 14000 rpm por 8 minutos.
 - Se eliminó el filtrado dentro del tubo colector de la columna en un frasco de vidrio con una solución de hipoclorito al 1%.
 - Se desecho el tubo colector y se llevó la columna QIAamp Mini a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL nuevo.
 - Se adicionó 200 μ L de Buffer AE y se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Se llevo a centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
 - Se desecho la columna y se conservó el ADN eluído hasta su próximo uso.
- ii. Verificación de material genético en geles de agarosa al 1%.**
- Con ayuda de una balanza analítica se pesó 1.8 gramos de agar y se vertió en 180 mL de buffer TBE al 0,5x de concentración.
 - Se homogenizo la solución someténdola a calor con ayuda de una hornilla.
 - Ya homogenizada se dejó enfriar un poco la solución y se adiciono bromuro de etidio (1 μ L por cada 10 mL de buffer TBE).
 - Se armó el molde de gel de electroforesis con 20 pocillos.

- Se mezcló suavemente y se vertió la solución sobre el molde previamente armado teniendo el cuidado de no formar burbujas.
 - Se dejó enfriar hasta que la solución gelifique completamente y se trasladó el gel al equipo de electroforesis.
 - Se paso a realizar el sembrado en el gel mezclando 4 uL de muestra extraída con 4uL de SYBR Green y depositando la mezcla en cada pocillo del gel preparado según orden correlativo de codificación.
 - Se dejó corriendo por 45 minutos.
 - Finalizada la corrida se llevó el gel al Transiluminador para observar a presencia de bandas de ADN genómico.
 - En el caso de las muestras en las que no se observaron bandas o estas eran muy tenues se repitió nuevamente la extracción.
- iii. Análisis de material genético extraído por espectrofotometría.**
- Se alistó todo el material necesario para la cuantificación de ADN extraído por electroforesis (micropipetas, tips, etc.).
 - Se colocaron 2 uL de muestra en cada pocillo de la placa *μDrop Duo plates*, usando el Buffer AE como solución "blanco" y colocándola siempre en el primer pocillo.
 - Se introdujo la placa *μDrop Duo plates* dentro del equipo Thermo Scientific *μDrop*, y se procedió a hacer la programación respectiva para la lectura.
 - Al finalizar la lectura se validaron los datos registrados y se procedió a sacar y limpiar la placa *μDrop Duo plates*.
 - Se repitieron estos pasos con todas las muestras extraídas.
 - Se repitieron las lecturas en aquellas muestras que presentaron una concentración o calidad de ADN extraído muy baja para verificar.
 - Se repitió la extracción de ADN en el caso de las muestras que dieron dos veces una concentración muy baja de ADN.
- iv. Amplificación del gen PON1.**
- Se preparó todo el material necesario para la PCR (micropipetas, tips, tubos de 0,2 mL).
 - Se preparó el Master mix para un total de 20 tubos de 0,2 uL con un volumen final de 20 uL.
 - Se depositó 16 uL de Master mix en tubos de 0,2 uL y luego se le adicionó 4 uL de muestra de ADN extraído mezclando suavemente con ayuda de la micropipeta.
 - Se colocaron los tubos dentro del termociclador "*Eppendorf Mastercycler Nexus Thermal Cyclers*" y se inició la corrida con el protocolo preestablecido guardado dentro del equipo llamado PON1 192 (Fase de inicio: 94°C/5min; Desnaturalización: 94°C/30seg,

Alineamiento: 56°C/45seg, Elongación: 72°C/45seg por 35 ciclos; Fase de elongación final: 72°C/10min).

- Finalizada la corrida se sembraron los amplicones en un gel de agarosa al 3% (se utilizó el protocolo ya descrito empleando las modificaciones correspondientes) utilizando un Ladder de 50 pb para verificar que se haya amplificado el gen deseado que tiene un tamaño de 99 pb.
- v. **Análisis de la frecuencia del polimorfismo PON 1 (Q192R) por digestión con la enzima de restricción AlwI.**
- Se preparó todo el material necesario para el procedimiento (micropipetas, tips, tubos de 0,2 mL).
 - Se preparó el Mix de la enzima para un total de 20 tubos de 0,2 uL con un volumen final de 20 uL.
 - Se depositó 15 uL del Mix en tubos de 0,2 uL y luego se adicionó 5 uL del producto PCR (amplicón PON 1) mezclando suavemente con ayuda de la micropipeta.
 - Se colocaron los tubos dentro del termociclador "*Eppendorf Mastercycler Personal*" y se incubó durante 60 minutos a 37 grados centígrados.
 - Finalizada la corrida se sembraron los amplicones digeridos en un gel de agarosa al 3% (se utilizó el protocolo ya descrito empleando las modificaciones correspondientes) utilizando un Ladder de 50 pb para evaluar los fragmentos formados que presentan un tamaño de 99, 63 y 36 pb.
- c. **Estandarización del protocolo para la amplificación del polimorfismo PON 1 (Q192R) por qPCR.**
- Se preparó todo el material necesario para el procedimiento (micropipetas, tips, Strip Tubes and Caps de 0,1 mL).
 - Se preparó el Mix de la enzima para un total de 5 Strip Tubes and Caps de 0,1 mL con un volumen final de 10 uL.
 - Se depositó 5.1 uL del Mix en los Strip Tubes and Caps de 0,1 mL y luego se adicionó 4.9 uL de muestras de ADN extraído de las cuales se conocía el polimorfismo que presentaban para PON1 (Q192R).
 - Se colocaron los Strip Tubes and Caps de 0,1 mL dentro del equipo "*GDS Rotor-Gene Q Thermocycler*" y se inició la qPCR bajo las siguientes condiciones: Fase inicial: Hold time 95°C/15min; 40 Ciclos de 95°C/15seg y 60°C/90seg.

7.5 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo e inferencial en un estudio correlacional de corte transversal. Para efectuar el análisis estadístico de los datos conseguidos en el estudio,

primeramente, se creó una base de datos en Excel, la cual contiene datos obtenidos mediante encuestas y los resultados alcanzados luego de la fase experimental sobre las muestras (evaluación de anomalías nucleares y evaluación de la frecuencia del polimorfismo genético PON 1). La base de datos creada fue adaptada y analizada mediante el programa estadístico *r-project*.

Se aplicó la regresión de Poisson para modelar los datos, lo cual sugirió aplicar una selección de pasos, para lo cual se utilizó tanto el criterio de inclusión de Akaike (AIC) y el criterio de inclusión Bayesiano (BIC) para hallar los factores estadísticamente más significativos para el análisis. Asimismo, se efectuó distintos análisis comparativos entre grupos independiente, para lo cual se aplicó primeramente la prueba de U de Mann Whitney, esto debido a que los datos no presentaron una distribución normal y luego el test de Kruskal-Wallis ya que los datos no fueron paramétricos.

Además, se apoyó el análisis de resultados con tablas y graficas realizadas en Excel para un mejor entendimiento y discusión del mismo.

8. RESULTADOS.

8.1 Análisis Demográfico.

Los datos poblacionales que se muestran han sido recolectados mediante el empleo de encuestas realizadas a cada uno de los participantes en el estudio (Anexo 3).

La información adquirida ayudó a develar si los participantes poseen ciertos hábitos tales como fumar, consumir alcohol, consumir la hoja de coca y otros factores higiénicos que podrían tener cierta relación con el daño genotóxico, esto permitió realizar un análisis descriptivo general de la población en estudio.

Además, la información recabada en las encuestas permitió separar a la población en dos grupos: población con exposición directa a plaguicidas (agricultores) y población con exposición indirecta a plaguicidas, (familiares de agricultores, ayudantes y pobladores de la zona que se dedican a otras actividades), posteriormente se realizó el análisis con los resultados obtenidos. Finalmente, los factores de confusión tomados en cuenta en el estudio son: fumar, beber, sexo.

8.1.1 Descripción poblacional.

La población en estudio fue de un total de 180 personas, las cuales radican en una de las 4 zonas agroecológica y de quienes se recolectó información por medio de encuestas, así como muestras biológicas de hisopado bucal y sangre venosa, todo bajo el marco del Proyecto "*Biomonitorización de la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas de cuatro zonas agroecológicas de Santa Cruz*", dicho proyecto, cuenta con el aval ético otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad Católica Boliviana.

“San Pablo “Unidad Académica Santa Cruz con el código de protocolo # 025 del 9 de diciembre del 2019.

En la tabla 1 que se muestran las características demográficas de hábitos y factores higiénicos. Además, en la parte de anexos se presentan estos datos expresados en graficas (Anexos 4, 5, 6 y 7).

Tabla 1

Análisis demográfico de la población participante.

Variable		Cantidad	Porcentaje
Fuma tabaco	Si	34	18.90 %
	No	146	81.10 %
Bebe alcohol	Si	89	49.40 %
	No	91	50.60 %
Mastica coca	Si	47	26.10 %
	No	133	73,90 %
Sexo	Masculino	88	48.80 %
	Femenino	92	51.20 %
Edad	18 – 29 años	48	26.60 %
	30 – 39 años	31	17.20 %
	40 – 49 años	31	17.20 %
	50 – 59 años	27	15.10 %
	> 60 años	43	23.90 %
Tipo de exposición	Directa	119	66.10 %
	Indirecta	61	33.90 %

***Para cada variable, la población total de estudio es de 180 personas.**

Fuente: Elaboración propia (2022).

8.1.2 Análisis demográfico en los grupos con exposición directa e indirecta a plaguicidas.

De 180 personas que participaron dentro del estudio, 119 (66,10%) están expuestos directamente a plaguicidas ya que su ocupación es la agricultura, el restante 33.90% de personas tienen ocupaciones distintas por lo cual su exposición se considera como indirecta.

En la tabla 2 se observa la distribución de la población con exposición directa a plaguicidas respecto a los hábitos ya mencionados, mostrando un mayor porcentaje de participantes que ingieren alcohol (48,73%) en comparación a los que fuman tabaco (18,48%) o mastican la hoja de coca (26,05%).

Tabla 2

Análisis demográfico de la población participante con exposición directa a plaguicidas.

Variable		Cantidad	Porcentaje
Fuma tabaco	Si	22	18.48 %
	No	97	81.52 %
Bebe alcohol	Si	58	48.73 %
	No	61	51.26 %
Mastica coca	Si	31	26.05 %
	No	88	73.95 %
Sexo	Masculino	57	47.89 %
	Femenino	62	52.11 %
Edad	18 – 29 años	30	25.20 %
	30 – 39 años	20	16.80 %
	40 – 49 años	20	16.80 %
	50 – 59 años	20	16.80 %
	> 60 años	29	24.40 %

***Para cada variable, la población total de estudio es de 119 personas.**

Fuente: Elaboración propia (2022).

Del mismo modo en la tabla 3, se muestran los resultados para la población con la exposición indirecta de plaguicidas.

Tabla 3

Análisis demográfico de la población participante con exposición indirecta a plaguicidas.

Variable		Cantidad	Porcentaje
Fuma tabaco	Si	12	19.67 %
	No	49	80.33 %
Bebe alcohol	Si	31	50.82 %
	No	30	49.18 %
Mastica coca	Si	17	27.87 %
	No	44	72.13 %
Sexo	Masculino	31	50.82 %
	Femenino	30	49.18 %
Edad	18 – 29 años	18	29.52 %
	30 – 39 años	11	18.03 %
	40 – 49 años	11	18.03 %
	50 – 59 años	7	11.47 %
	> 60 años	14	22.95 %

***Para cada variable, la población total de estudio es de 61 personas.**

Fuente: Elaboración propia (2022).

Asimismo, se observa un mayor porcentaje de población que se encuentra entre los 18 a 29 años, 25,20 % para el grupo con exposición directa y 29,52 % para el grupo con exposición indirecta.

Del mismo modo que en el análisis demográfico general, no existe una diferencia significativa con respecto a los porcentajes mostrados en los demás intervalos de edad.

Esta misma información se expresa de manera separada por variables y sub grupos en la sección de anexos (anexos 8, 9, 10, 11, 12 y 13).

8.2 Evaluación de las anomalías nucleares

Se realizó la evaluación de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral. Se empleó la tinción de Feulgen Fast-green y se contaron 1500 células por placa con un aumento de 40x.

En la figura 12, misma que se expone a continuación, se muestran algunas fotografías tomadas de anomalías nucleares observadas tales como núcleos en Broken egg, núcleo fragmentado, células binucleadas y núcleos en cariólisis en diferentes muestras luego de las lecturas realizadas al microscopio.

Luego de estas fotografías en la gráfica 1 se reflejan los resultados descriptivos obtenidos luego de las lecturas de placas al microscopio donde se observa indicios de daño citotóxico debido a la elevada presencia de células con núcleo en cariólisis y células binucleadas.

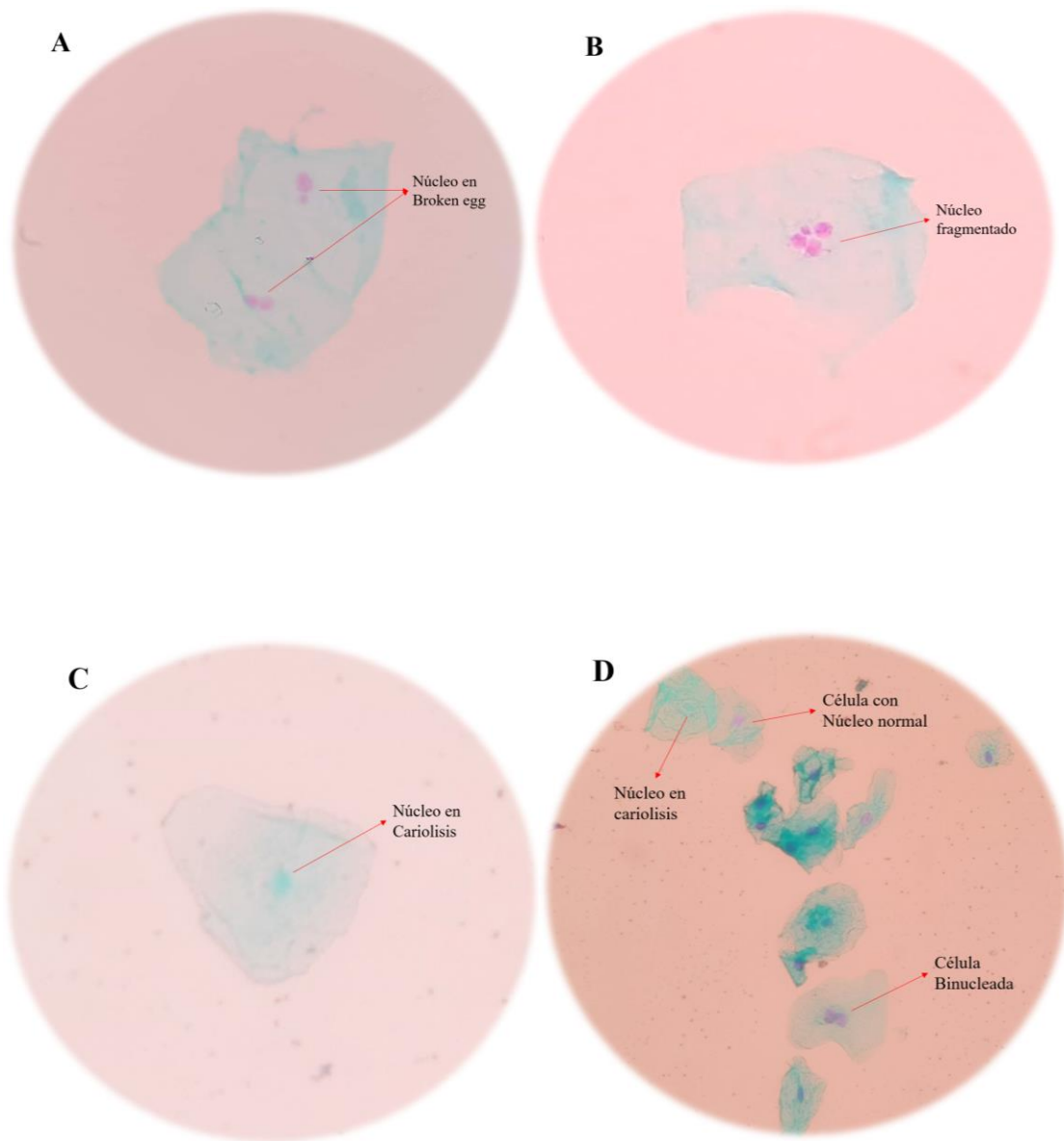
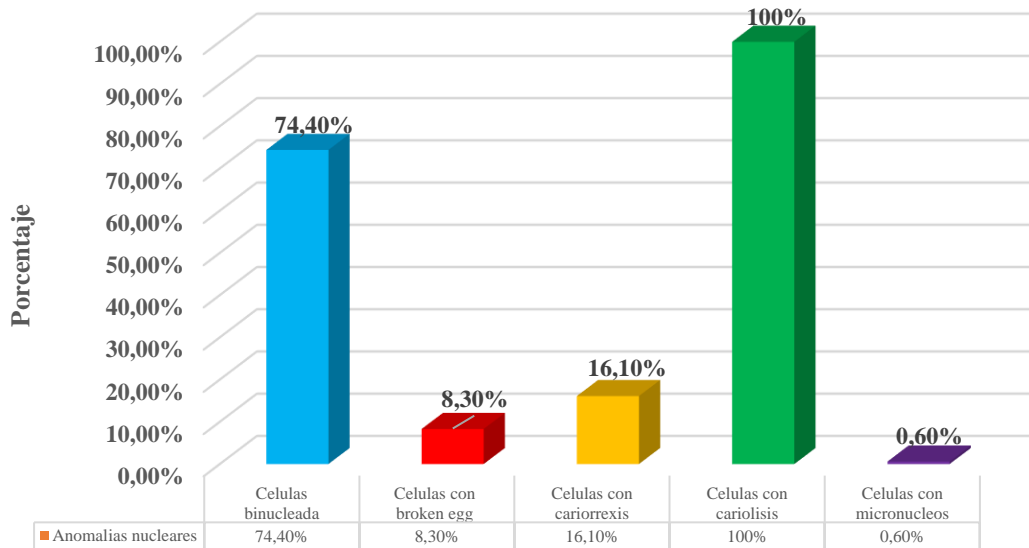


Figura 12: Anomalías nucleares observadas con la tinción de Feulgen Fast-green, A: dos células pegadas ambas con un núcleo en Broken egg; B: Célula con el núcleo fragmentado; C: Célula con el núcleo en cariolisis; D: Campo de microscopio donde se observa una célula con núcleo en cariolisis, una célula binucleada y varias células pegadas con núcleo normal. Fuente: Elaboración propia.

Gráfica 1

Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio.



Fuente: Elaboración propia (2022).

En la sección de anexos (anexos 14 y 15) se muestran dos gráficos adicionales que muestran los resultados por sub grupos según el tipo de exposición. Finalmente, todos los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

Anomalías nucleares en la población de estudio y sub grupos.

Tipo de Anomalia nuclear	Población total*	Población con exposición directa**	Población con exposición Indirecta***
Células binucleadas	134 (74.40%)	87 (73.10%)	47 (77.10 %)
Células con núcleo en Broken egg	15 (8.30%)	9 (7.50 %)	6 (9.80 %)
Células con núcleo en cariorrexis	29 (16.10 %)	17 (14.30)	12 (19.70 %)
Células con núcleo en cariolisis	180 (100 %)	119 (100 %)	61 (100%)
Células con presencia de Micronúcleos	1 (0.60%)	1 (0.8 %)	0

Nota: los números en negrillas indican la cantidad de placas que presentaron al menos una célula con la anomalía correspondiente a la columna. *180 placas en total; **119 placas en total con exposición directa; ***61 placas en total con exposición indirecta.

Fuente: Elaboración propia (2022).

8.3 Evaluación de la frecuencia del polimorfismo genético PON 1

8.3.1 Validación de las técnicas de PCR-RFLP y qPCR.

Se validó la técnica de PCR – RFLP (según protocolos de Serrato, M. et al. 1995 y de Blanco Muñoz, J. et al., 2013 aplicados dentro del laboratorio) y estandarizó la técnica de PCR en tiempo real o qPCR (según protocolo de la casa comercial) para el polimorfismo genético PON1192Q/R.

Se realizó la extracción de ADN de muestras de sangre utilizando el kit QIAamp DNA mini kit (técnica de extracción por columnas), después mediante espectrofotometría se midió la concentración y se evaluó la calidad de ADN extraído ya que las muestras trabajadas tenían más de 2 años de conservación, donde se repitió la extracción para las muestras que tenían concentraciones o calidad de material genético muy bajas.

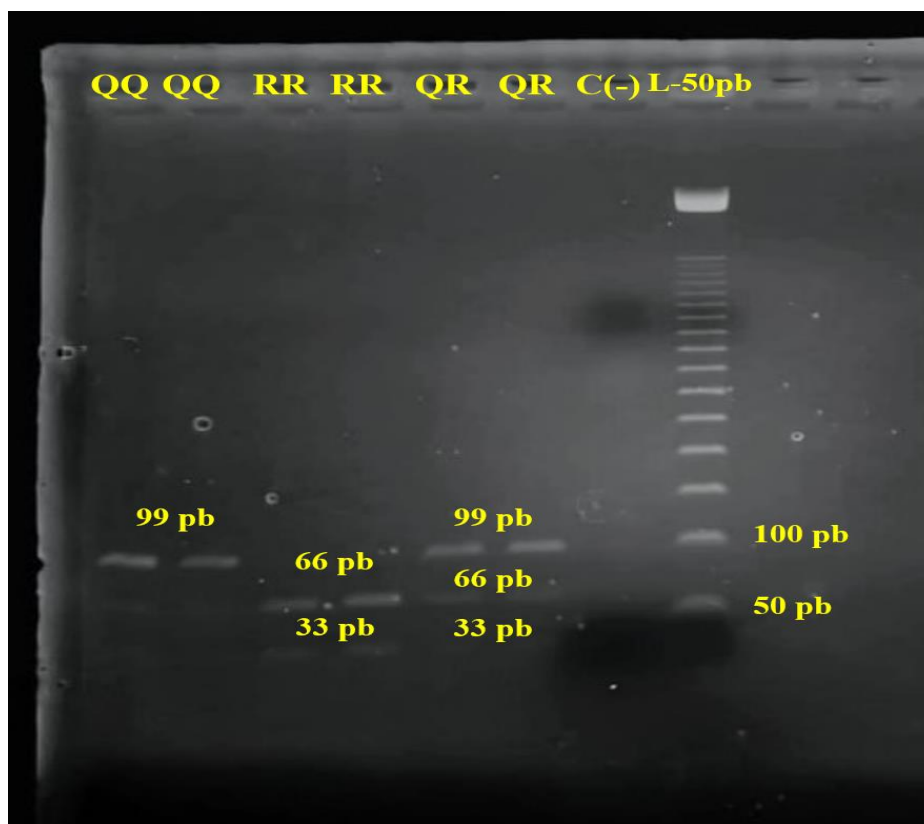


Figura 13: Validación de la técnica de PCR-RFLP para el polimorfismo genético PON1192Q/R en un gel de agarosa al 3%.

Fuente: Elaboración propia (2022).

La figura 13 es el resultado de la validación de la técnica de PCR-RFLP para la evaluación del polimorfismo genético PON1 (Q192R) dentro del laboratorio, donde se utilizaron muestras de sangre fresca de personas con el polimorfismo conocido.

En los carriles 1 y 2 se observa una sola banda y esta se refiere a un homocigoto "wild type" (WT) o salvaje, es decir al polimorfismo PON1 192/QQ; Asimismo, en los carriles 3 y 4 se observan dos bandas producto del corte del amplicón PON 1 por la enzima ALW1, estas dos bandas hacen referencia a un homocigoto mutado, es decir al polimorfismo PON 1 192/RR; Finalmente en los carriles 5 y 6 se observan 3 bandas haciendo referencia a un heterocigoto para el polimorfismo PON1192 Q/R. Carril 7 control negativo (master mix); Carril 8 Ladder de 50pb.

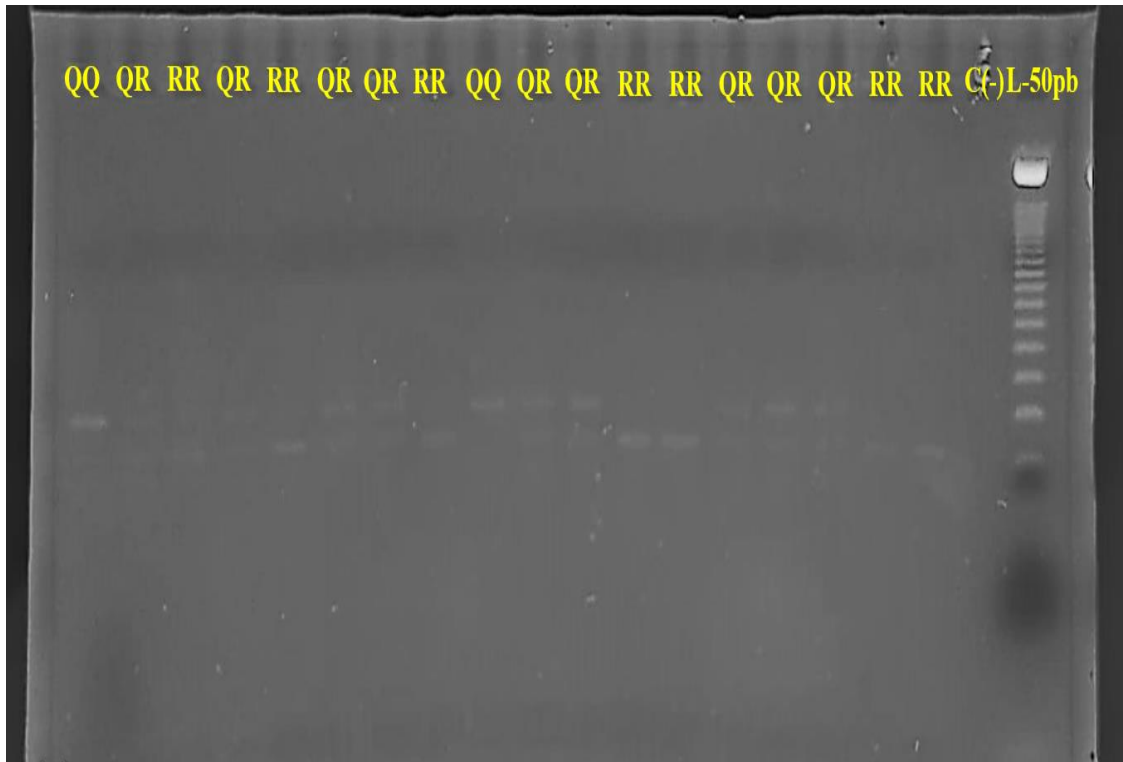


Figura 14: Corrida electroforética sobre muestras de la población en estudio para la evaluación del polimorfismo PON1192Q/R en un gel de agarosa al 3%.
Fuente: Elaboración propia (2022).

La figura 14 representa una de las corridas electroforéticas sobre las muestras pertenecientes a la población en estudio luego de los procesos de extracción, amplificación del gen PON1 y digestión con la enzima de restricción ALW1.

En los carriles 1 y 9 se observa el polimorfismo PON1 192/QQ, en los carriles 3, 5, 8, 12, 13, 17, y 18 el polimorfismo PON1 192/RR; y en los carriles 2, 4, 6, 7, 10, 11, 14, 15 y 16 se observa polimorfismo PON1 192/QR, carril 19 control negativo (master mix) y carril 20 Ladder de 50pb.

Para la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real, se partió del protocolo brindado por la casa comercial, sobre el cual se realizaron las modificaciones correspondientes, principalmente en lo que respecta a encontrar el "Tm" (melting temperatura) adecuada para una correcta hibridación de las sondas.

PON1Q192R

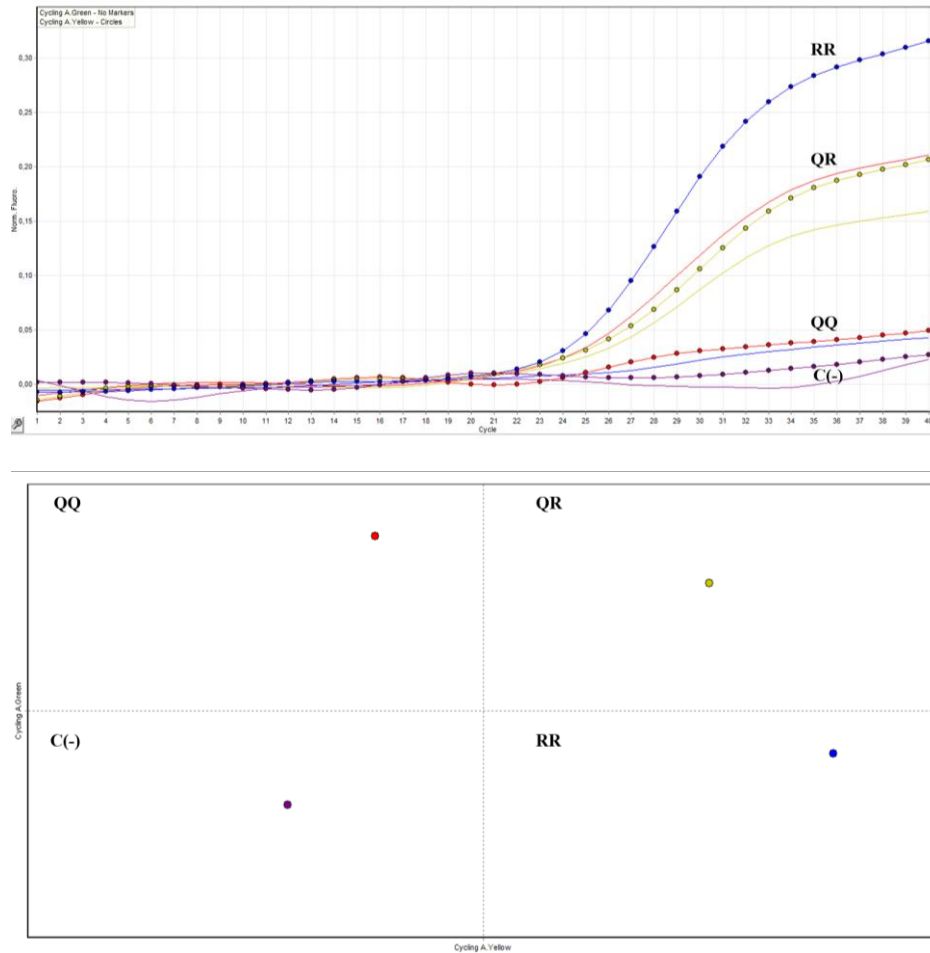


Figura 15: Amplificación del polimorfismo PON1Q192R por qPCR y análisis de scatter-plot para discriminación genotípica de ambos SNPs.
Fuente Elaboración propia (2022).

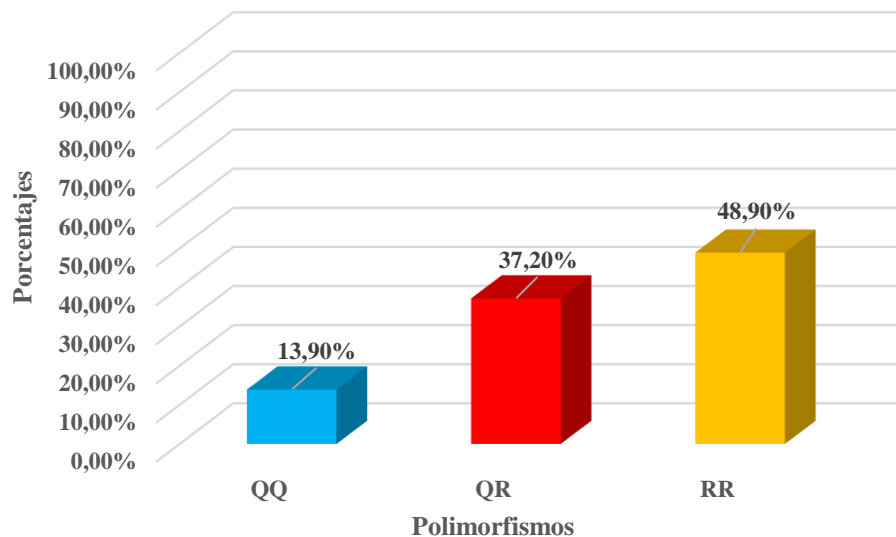
La figura 15 muestra el resultado final de la validación de la técnica de qPCR para la amplificación del polimorfismo genético PON1Q192R, por medio de uso de controles y gracias al análisis de scatter-plot se puede apreciar la discriminación genotípica de los SNPs: homocigoto wild type, homocigoto mutado y heterocigoto.

8.3.2 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y frecuencia alélica para el polimorfismo PON1 (Q192R).

Partiendo de los resultados obtenidos gracias a las corridas electroforéticas sobre las muestras trabajadas, en la gráfica 2 y anexos 16 y 17 se muestran las frecuencias de cada polimorfismo tanto para la población total de estudio, como para los sub grupos según el tipo de exposición a plaguicidas.

Gráfica 2

Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio.



Fuente: Elaboración propia (2022).

La gráfica 2 permite apreciar una mayor frecuencia de pobladores homocigotos para el gen mutado, es decir el polimorfismo PON1 192/RR, en segundo lugar, están los pobladores con heterocigosis para este polimorfismo, es decir los que presentan un alelo WT y otro mutado y finalmente mostrando la frecuencia más baja los pobladores homocigotos para el gen WT o polimorfismo PON1 192/QQ.

Asimismo, en los anexos 16 y 17 se muestran gráficas similares, pero de las poblaciones separadas por el tipo de exposición, donde no se observó ningún tipo de diferencia significativa entre estos sub grupos.

A partir de las frecuencias génicas observadas, se establecieron los valores esperados para el genotipo del polimorfismo evaluado. A partir de estas, fue posible calcular si existían o no diferencias significativas entre la frecuencia genotípica observada y la esperada. Se aplicó una prueba de Chi cuadrado con un 95% de nivel de confianza.

En la tabla 5 presentada previamente se muestran los valores de los genotipos observados y esperados para el polimorfismo PON1 (Q192R) y su respectiva prueba de homogeneidad, mediante el recurso estadístico de Chi cuadrado (χ^2). El valor de χ^2 y su respectivo p~valor son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), por lo que se concluye que la población no se encuentra en equilibrio genético de Hardy-Weinberg para el polimorfismo analizado.

Tabla 5
Prueba de Equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencia alélica para el Polimorfismo PON1 (Q192R).

	Polimorfismo PON1 (Q192R)		
	QQ	QR	RR
Población	25	67	88
Esperado	19	79	82
Chi cuadrado	$\chi^2 = 4.13851$		
p~valor	$p = 0.041918$		
Frecuencias alélicas	QQ = 0.68	RR = 0.32	

Si el p~valor es menor a 0,05 ($p < 0.05$), no se encuentra en equilibrio de genético de Hardy-Weinberg.

Fuente: Elaboración propia (2022).

8.4 Análisis estadístico de distribución y modelaje de datos

Debido a que la distribución de los datos en general no era normal, se utilizó la regresión de Poisson para modelar los mismos, esta prueba permitió observar que existieron variables que estadísticamente no fueron significativas en lo que respecta al daño genotóxico, por lo cual se buscó modelar los datos de manera más parsimoniosa mediante la selección por pasos.

Para esta selección por pasos se siguieron dos criterios: Criterio de información o inclusión de Akaike (AIC) y Criterio de inferencia o inclusión Bayesiano (BIC) y fueron desarrollados con ayuda del programa estadístico r-project.

Luego del análisis estadístico utilizando ambos criterios, se decidió únicamente considerar el modelo obtenido mediante AIC, ya que el modelo propuesto por el programa utilizando el BIC consideraba como no significativo a casi todas las variables excepto bebe.

En la tabla 6 que se muestra a continuación, se exponen los resultados del modelaje realizado bajo el modelo obtenido por AIC, utilizando como variable de respuesta del modelo daño citotóxico.

Tabla 6

Modelaje de datos según selección por pasos utilizando el Criterio de inclusión de Akaike (AIC) para la variable de respuesta Daño Genotóxico.

Variable	Criterio de inclusión de Akaike			
	Cariorexix		Broken egg	
	z-valor	Pr(> z)	z-valor	Pr(> z)
Fuma	-0.842	0.39981	0.146	0.8839
Bebe	3.006	0.00265*	1.238	0.0109*
Mastica coca	1.778	0.07538	-0.167	0.8674
Tipo de exposición	1.037	0.29982	-0.196	0.8445
Sexo	-5.090	3.58e-07*	-0.114	0.9092
PON1192/QQ	-2.841	0.00449*	-0.828	0.4075
PON1192/RR	-2.300	0.02143*	-0.155	0.8764

Nota: Pr(>|z|) representa el valor p asociado con el valor z, donde sí: $\text{Pr}(>|z|) < 0.05$ la variable es estadísticamente significativa con respecto a la variable de respuesta en el modelo (variable de respuesta es daño genotóxico = células con núcleo en cariorexix o Broken egg).

*Variables estadísticamente significativas para el modelo según el criterio de inclusión utilizado.

Fuente: Elaboración propia (2022).

La selección por pasos utilizando el criterio de inclusión de Akaike (AIC) sugiere que el modelo más parsimonioso es aquel que incluye a las variables de: bebe, sexo, PON1192/QQ y PON1192/RR, cuando como variable de respuesta se considera a las células con núcleo en cariorexix como medidor de daño genotóxico.

Por otra parte, cuando como variable de respuesta se considera a las células con núcleo en Broken egg como medidor de daño genotóxico el modelo más parsimonioso obtenido gracias a la selección por pasos utilizando el AIC incluye únicamente a la variable de bebe.

8.5 Análisis comparativo de los niveles de las enzimas hepáticas GOT y GPT con los factores higiénicos, biomarcadores de efecto y susceptibilidad.

Bajo el marco del proyecto previamente mencionado, se trabajó en conjunto a la Universidad Católica Bolivia de Santa Cruz de la Sierra, la cual realizó estudios complementarios sobre la misma población y que permitieron obtener los valores de las enzimas GOT y GPT, los mismos fueron útiles para realizar las siguientes comparaciones:

8.5.1 Análisis comparativo con los factores higiénicos.

En la tabla 7 se muestran datos comparativos de los factores higiénicos con relación a la enzima GPT, donde el 30.56% de la población presentó un valor elevado, es decir 55 participantes de 180. De estas 55 personas 38 fueron del sexo femenino y 17 del sexo masculino. Existió un mayor número de personas expuestas directamente a plaguicidas en comparación a los expuestos indirectamente, 34 y 21 personas respectivamente.

Tabla 7

Análisis general comparativo de factores higiénicos entre participantes con valores normales y elevados para la enzima GPT con relación a los factores higiénicos.

Variable	Población	Normal	Elevado
Población	180	125 (69.44%)	55 (30.56%)
Hábitos			
Si fuma	34	18 (52.94%)	16 (47.06%)
Si bebe	89	59 (66.30%)	30 (33.70%)
Si mastica coca	47	37 (78.72%)	10 (21.28%)
Sexo			
Masculino	88	71 (80.68%)	17 (19.32%)
Femenino	92	54 (58.69%)	38 (41.31%)
Exposición			
Directa	119	85 (71.43%)	34 (28.57%)
Indirecta	61	40 (65.57%)	21 (34.43%)
Edad			
18 – 29 años	48	36 (75.00%)	12 (25.00%)
30 – 39 años	31	19 (61.29%)	12 (38.71%)
40 – 49 años	31	20 (64.52%)	11 (35.48%)
50 – 59 años	27	19 (70.37%)	8 (29.63%)
> 60 años	43	31 (72.10%)	12 (27.90%)

Fuente: Elaboración propia (2022).

De este grupo de 55 personas con relación a los hábitos, 16 si fuman, 30 si beben y 10 si mastican la hoja de coca y finalmente, al respecto de la edad de los participantes, 12 están entre los 18 a 29 años, 12 entre los 30 a 39, 11 entre los 40 a 49 años, solamente 8 entre los 50 a 59 años y 12 están con una edad superior a los 60 años.

Asimismo, en la tabla 8 se realizó el mismo análisis comparativo, pero para la enzima GOT, donde el 36.64% de la población presentó un valor elevado para este enzima, es decir 66 participantes de 180, donde 43 fueron del sexo femenino y 23 del sexo masculino. Existió un mayor número de personas expuestas directamente a plaguicidas en comparación a los expuestos indirectamente, 44 y 22 personas respectivamente.

Tabla 8

Análisis general comparativo de factores higiénicos entre participantes con valores normales y elevados para la enzima GOT con relación a los factores higiénicos.

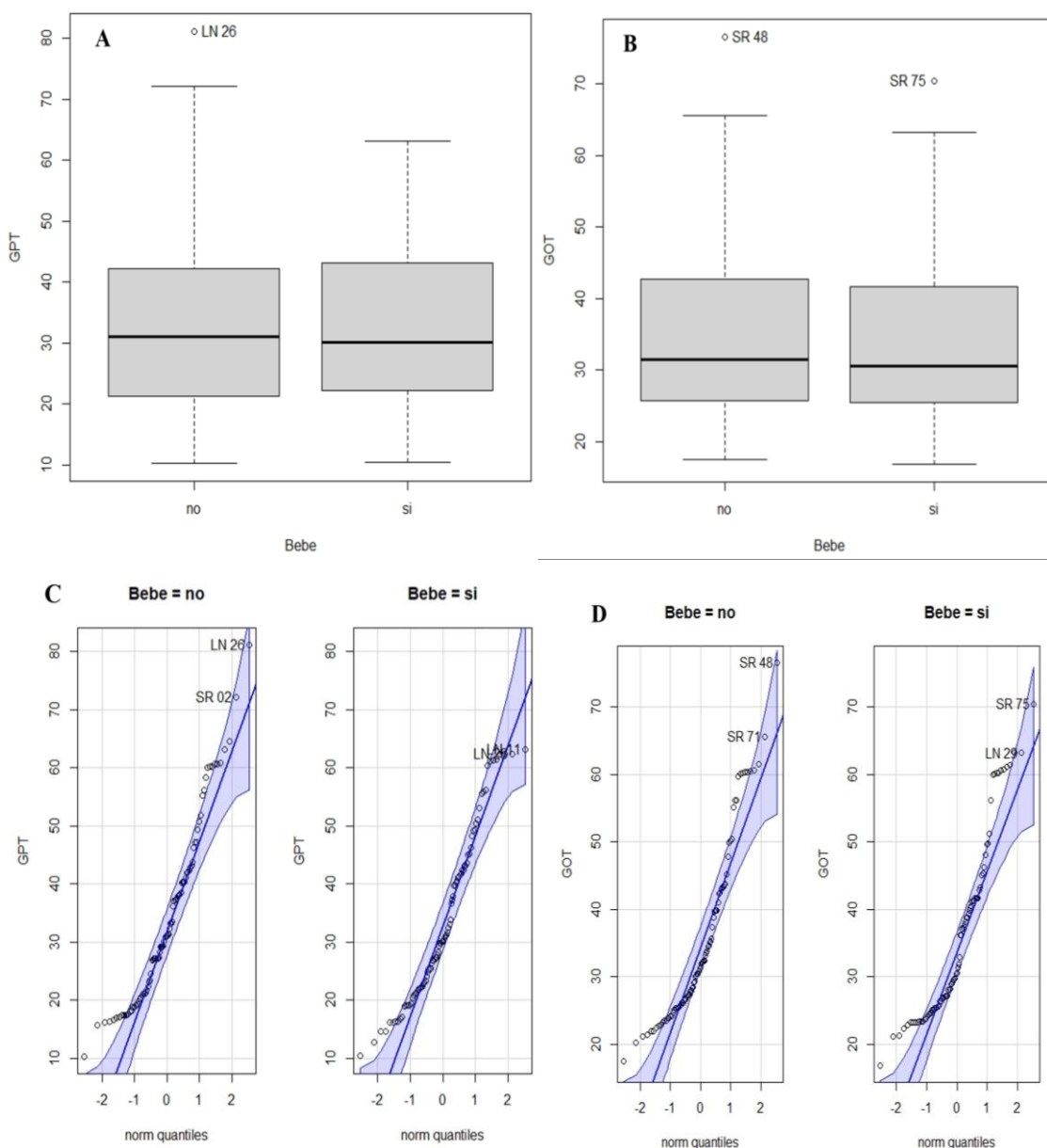
Variable	Población	Normal	Elevado
Población	180	114 (63.33%)	66 (36.64%)
Hábitos			
Fuma	34	17 (50.00%)	17 (50.00%)
Bebe	89	50 (56.18%)	39 (43.82%)
Mastica coca	47	32 (68.09%)	15 (31.91%)
Sexo			
Masculino	88	65 (73.86%)	23 (26.14%)
Femenino	92	49 (53.26%)	43 (46.74%)
Exposición			
Directa	119	75 (63.03%)	44 (36.97%)
Indirecta	61	39 (63.93%)	22 (36.06%)
Edad			
18 – 29 años	48	31 (64.58%)	17 (35.42%)
30 – 39 años	31	21 (67.74%)	10 (32.26%)
40 – 49 años	31	19 (61.29%)	12 (38.71%)
50 – 59 años	27	12 (44.44%)	15 (55.56%)
> 60 años	43	31 (72.09%)	12 (27.91%)

Fuente: Elaboración propia (2022).

De este grupo de 66 personas con relación a los hábitos, 17 si fuman, 39 si beben y 15 si mastican la hoja de coca. Finalmente, al respecto de la edad de los participantes, 17 participantes se encuentran entre los 18 a 29 años, 10 entre los 30 a 39 años, 12 entre los 40 a 49 años, solamente 15 entre los 50 a 59 años y 12 están con una edad superior a los 60 años de edad.

Según el modelaje de datos realizado, las variables de sexo y hábito de beber fueron estadísticamente significativas en lo que respecta a daño citotóxico. Asimismo, se evaluó la similitud y la normalidad en lo que respecta a la distribución de datos entre estas dos variables y su relación con las enzimas hepáticas GOT y GPT.

En la figura 16 los cuadros A, C y E representan el análisis de distribución de datos entre la enzima GPT y el hábito de beber y los cuadros B, D y F representan el mismo análisis, pero para la enzima GOT, en ambos casos se observa que la distribución de datos no es normal, mostrando ambos diagramas de caja una forma rectangular achatada y se presentan una cola pesada hacia la derecha, la misma que es bastante notoria tanto en los histogramas como gráficos cuantil-cuantil.



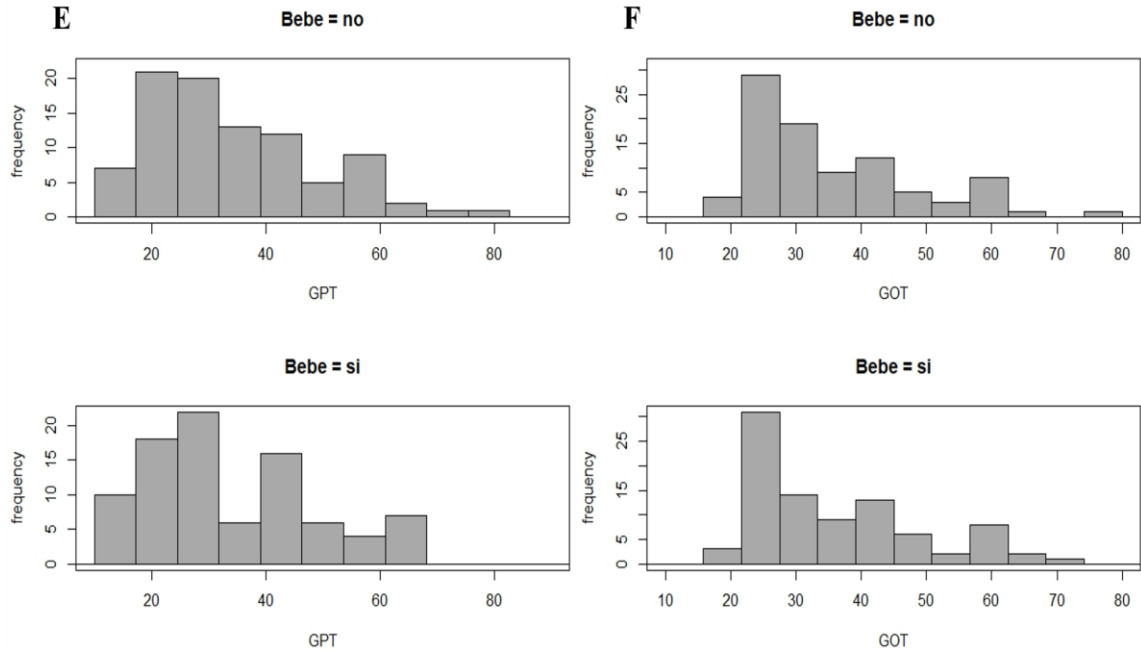
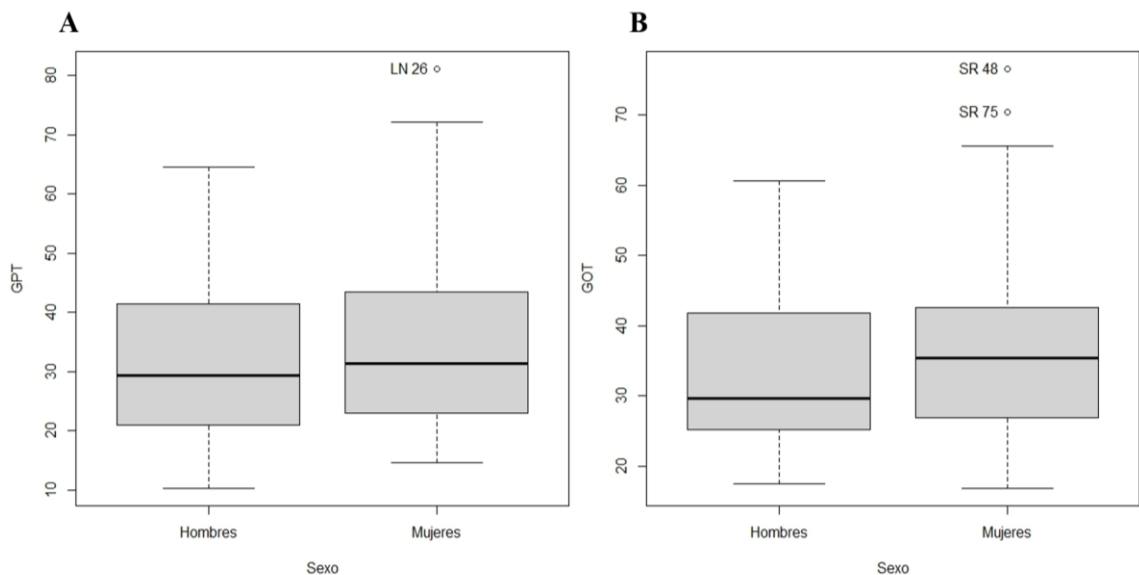


Figura 16: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histograma sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el hábito de beber. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis $\chi^2 = 0.0066492$ y el p~valor = 0.935 para Bebe vs GPT y $\chi^2 = 0.0091869$ y el p~valor = 0.9236 para Bebe vs GOT.

En la figura 17 los cuadros A, C y E representan el análisis de distribución de datos entre la enzima GPT y el sexo y los cuadros B, D y F representan el mismo análisis, pero para la enzima GOT, al igual que con el hábito de beber, se observa que la distribución de datos no es normal, mostrando ambos diagramas de caja una forma rectangular achatada y presentan una cola pesada hacia la derecha observable en las gráficas cuantil-cuantil e histogramas.



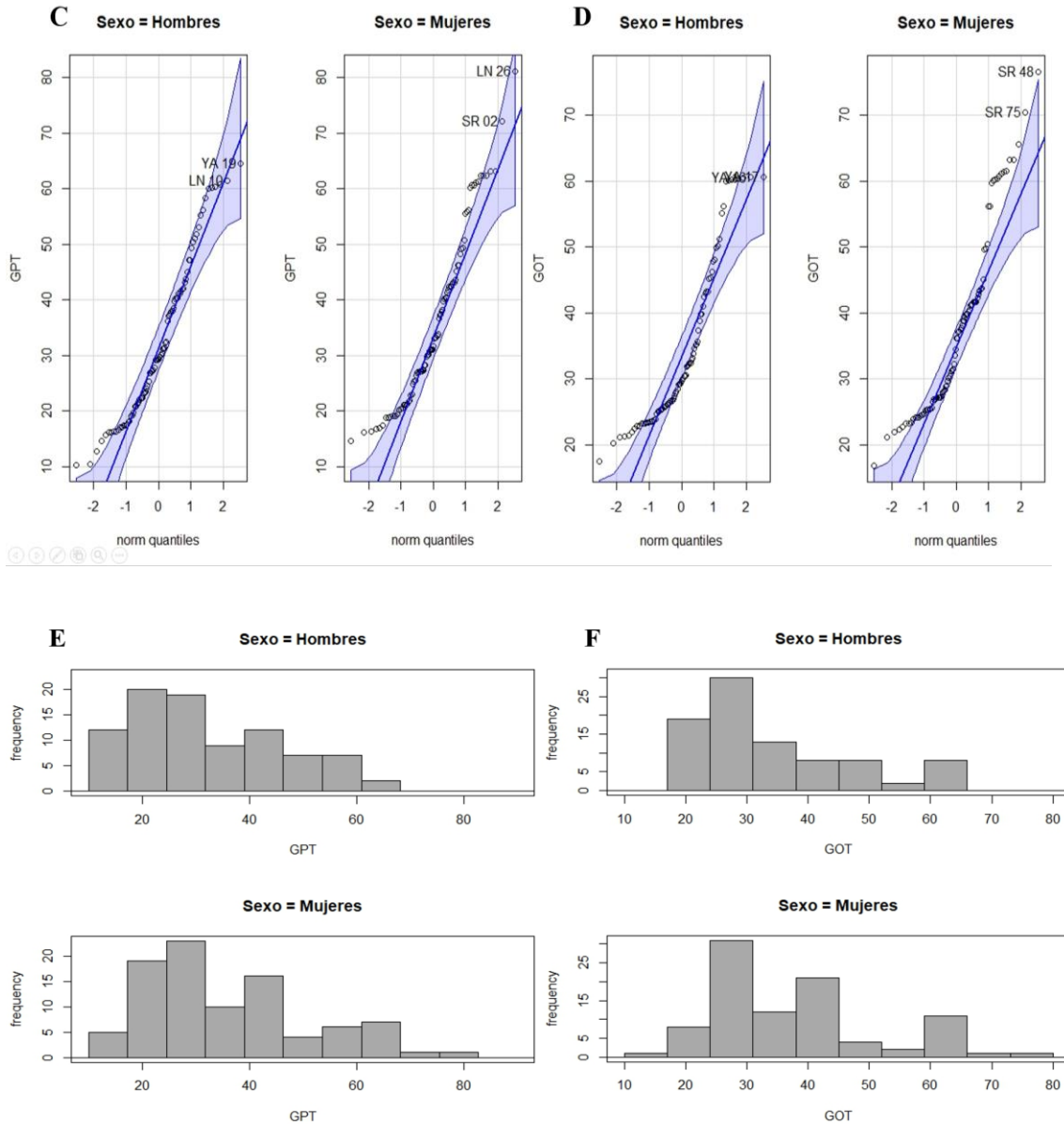


Figura 17: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histograma sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el Sexo. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis $\chi^2= 2.24$ y el p~valor = 0.1345 para Sexo vs GPT y $\chi^2=3.4706$ y el p~valor = 0.06247 para Sexo vs GOT.

8.5.2 Análisis comparativo con los biomarcadores de efecto.

Por medio de gráficas de dispersión se quiso ver si existía alguna relación entre las enzimas hepáticas y las distintas anomalías nucleares.

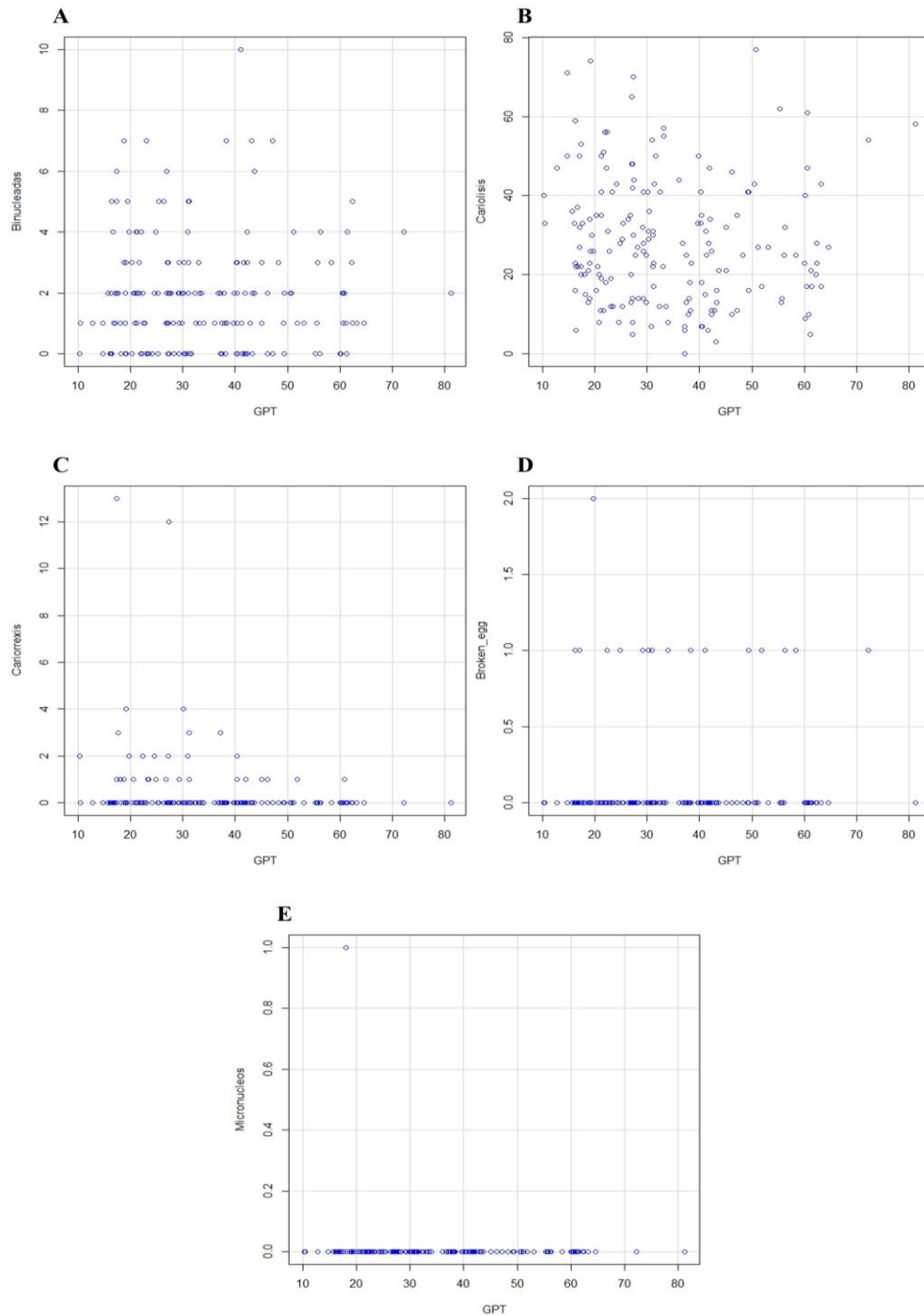


Figura 18: Diagramas de dispersión de valores de la enzima GPT en relación con las anomalías nucleares. A) GPT vs células binucleadas, B) GPT vs cariolisis, C) GPT vs Cariorrrexis, D) GPT vs Broken egg y E) GPT vs micronúcleos.

La enzima GOT muestra una correlación negativa débil con la anomalía nuclear cariorexis, en los demás casos se observan diagramas con una correlación nula.

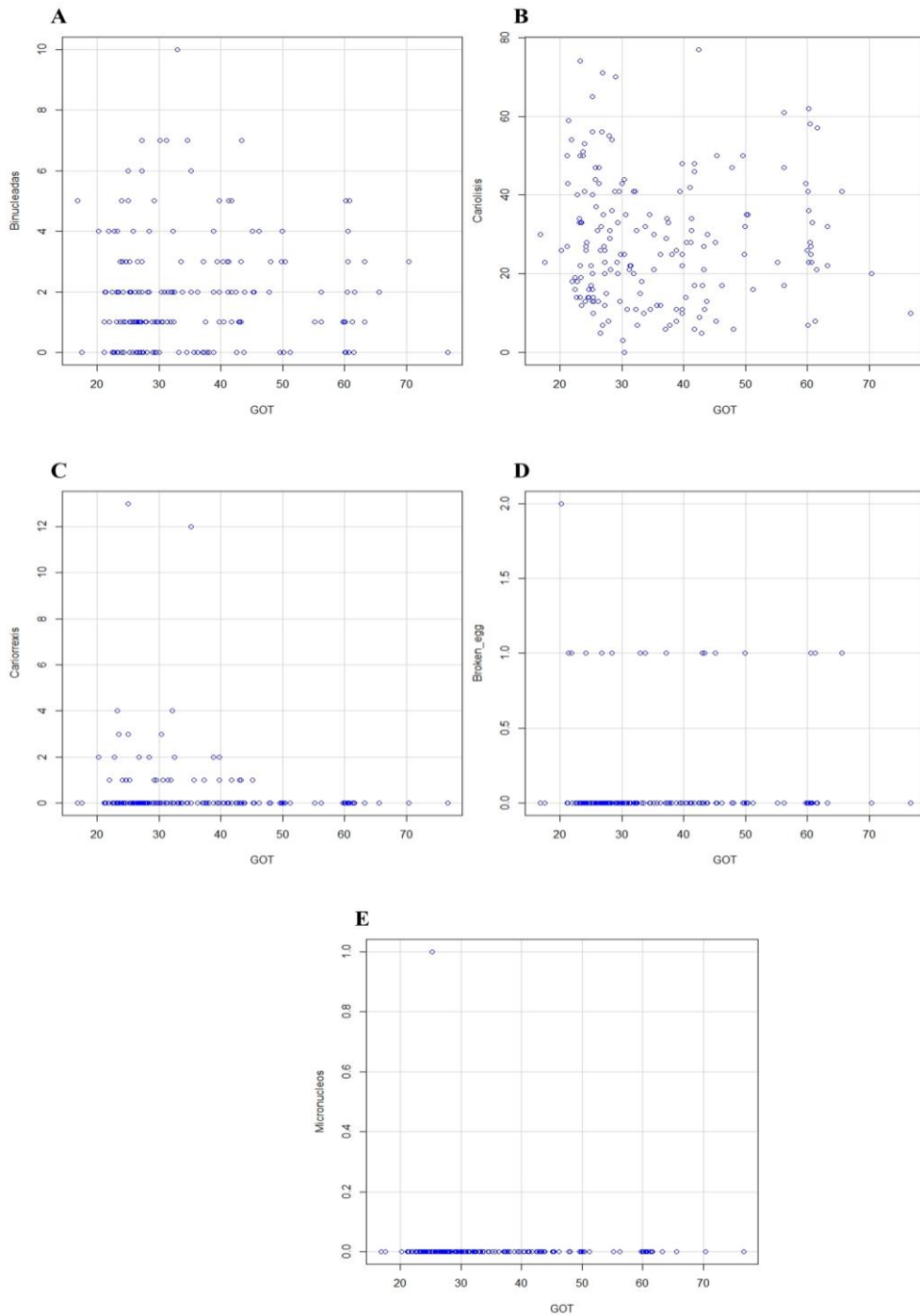


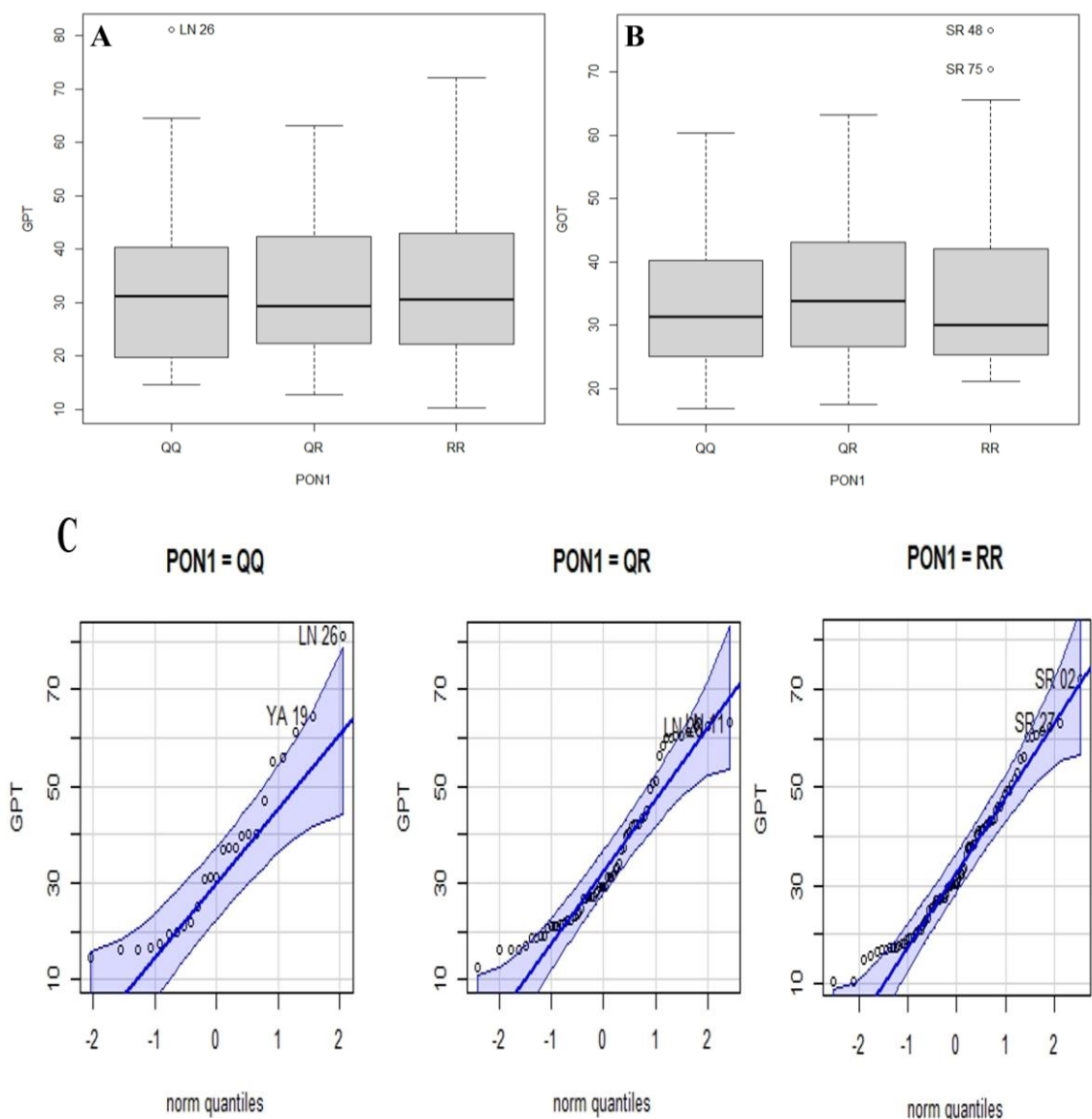
Figura 19: Diagramas de dispersión de valores de la enzima GOT en relación con las anomalías nucleares. A) GOT vs células binucleadas, B) GOT vs cariolisis, C) GOT vs Cariorexis, D) GOT vs Broken egg y E) GOT vs micronúcleos.

De igual manera la enzima GOT mostro una correlación negativa débil con la anomalía nuclear cariorrexis, en los demás casos se observan diagramas con una correlación nula.

8.5.3 Análisis comparativo con los biomarcadores de susceptibilidad.

Del mismo modo que con las variables de sexo y habito de beber, los polimorfismos del gen PON 1 fueron estadísticamente significativos según el modelaje de datos realizado, por lo mismo se evaluó si existe relación entre esta variable con las enzimas hepáticas GOT y GPT.

En la figura 20 los cuadros A, C y E representan el análisis de distribución de datos entre la enzima GPT y el polimorfismo PON1 y los cuadros B, D y F representan el mismo análisis, pero para la enzima GOT, en ambos casos se observa que la distribución de datos no es normal, mostrando diagramas de caja con forma rectangular alargada, también con colas pesadas hacia la derecha en la mayoría de las gráficas cuantil-cuantil e histogramas.



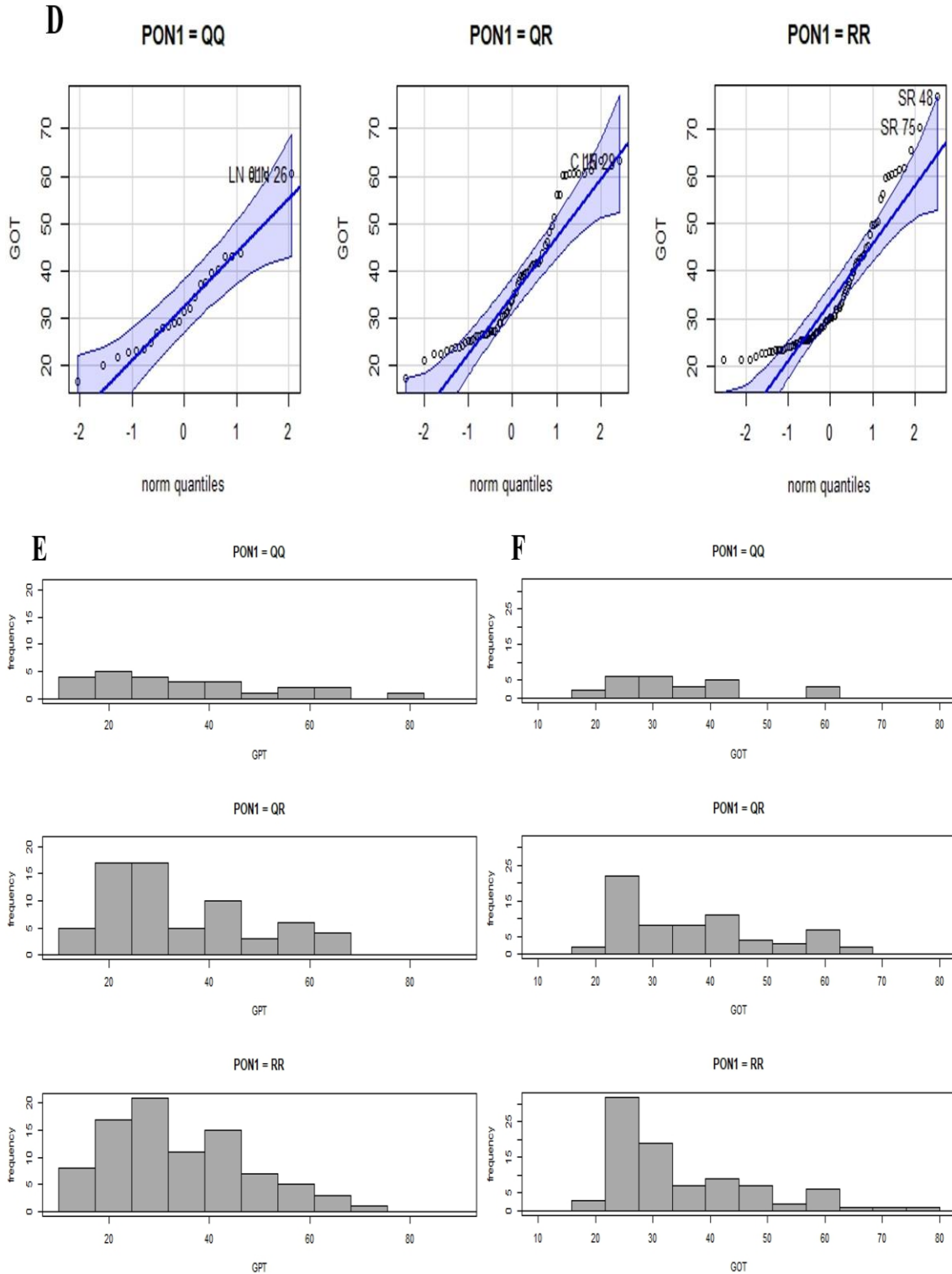


Figura 20: Diagrama de cajas, gráficos cuantil-cuantil e histogramas sobre la relación entre las enzimas hepáticas GPT y GOT con el polimorfismo PON1. Se representa la mediana con los intervalos de confianza del 95%. Prueba de Kruskal Wallis $\chi^2 = 0.024476$ y el p-valor = 0.9878 para PON1 vs GPT y $\chi^2 = 1.7821$ y el p-valor = 0.4102 para PON1 vs GOT.

9. DISCUSIÓN.

9.1 Análisis demográfico.

Las localidades que formaron parte del estudio de biomonitoreo fueron seleccionadas bajo ciertos criterios, de los cuales se destaca la elevada actividad agrícola que se realiza en las distintas zonas y la identificación de una alta variabilidad de plaguicidas utilizados por los agricultores.

La información recabada de las localidades de Yateirenda, Santa Rosa de Sara, El Carmen, Mataral y Los Negros permitió realizar un análisis descriptivo de ciertas variables tales como el hábito de fumar, beber alcohol y masticar la hoja de coca, además de información complementaria como la edad y el sexo de los participantes. Estas variables pueden considerarse como variables de confusión con respecto al daño genotóxico por exposición a plaguicidas.

Es por ese motivo que el análisis de los resultados obtenidos gracias a los marcadores de daño (análisis de anomalías nucleares), marcador de susceptibilidad (análisis del polimorfismo PON 1) y el análisis sobre las enzimas hepáticas GOT y GPT se realizaron tomando en cuenta la influencia que tienen las variables previamente mencionadas sobre la población.

El análisis descriptivo evidenció que existe un mayor porcentaje de participantes que consumen bebidas alcohólicas (49.40%) en comparación a la población que fuma (18.90%) o mastica coca (26.10%), estos datos son importantes ya que como lo menciona Ascarrunz, E., Tirado, N., Gonzales, A.R., Cuti, M., Cervantes, R., Huici, O. y Jors, E., 2005 el tabaquismo, el consumo de bebidas alcohólicas y el masticar la hoja de coca son factores confundentes para el análisis de daño genotóxico principalmente en la evaluación de anomalías nucleares, Taborga Manrique, X. et al., 2016 complementa esta información afirmando que ciertos hábitos como el de fumar tabaco y consumir alcohol presentan efectos genotóxicos en la salud que puede determinarse gracias a la observación de células exfoliadas de la mucosa oral al microscopio.

Además, se sabe que existe una relación de daño hepático por el consumo frecuente de bebidas alcohólicas, lo cual se demuestra gracias a la medición de ciertos marcadores hepáticos tales como las enzimas transaminasas, entre las más comúnmente analizadas se encuentran las enzimas GOT y GPT. Coila Añasco, P.U., 2010 así lo demuestra en su trabajo de tesis, realizando comparaciones entre personas sanas y alcohólicas frente a distintos marcadores hepáticos, entre los cuales se encontraron las enzimas ya mencionadas, y donde se observó concentraciones más elevadas de estas enzimas en personas consumidoras de alcohol en comparación a personas sanas que mostraron valores normales de las mismas.

Por otro lado, existió una participación mayor de mujeres respecto a hombres, siendo el 51.20% de la población participante del sexo femenino y el restante 48.80% de sexo

masculino. Asimismo, con respecto a la edad, se formaron 5 grupos separados por intervalos de años de la siguiente forma: 18 a 29 años (48 personas), 30 a 39 años (31 personas), 40 a 49 años (31 personas), 50 a 59 años (27 personas) y mayores de 60 años de edad (43 personas), estando el grupo de 18 a 29 años como la agrupación con mayor número de participantes (el 26,60% de la población estudiada) seguido del grupo mayores a 60 años (el 23.90% de la población estudiada).

En cuanto a la distribución según el sexo de los participantes, es importante resaltar que en el estudio realizado existe un número similar tanto de hombres como de mujeres, esto lo explican Arellano García, M.E., Camarena Ojinagam L., Von-Glascoe, C.A., Ruiz Ruiz, B., Zuñiga Violante, E. y Montaña Soto T., 2012, quienes hablan sobre un aumento considerable de mujeres que se incorporan a las labores agrícolas, pero también sugieren que esto trae consecuencias importantes para su salud, debido a factores inherentes al sexo femenino tales como la estatura, fragilidad física, delicadeza, compromiso reproductivo, y la facilidad del cromosoma X para sufrir rupturas en comparación al resto de los cromosomas que las hacen más susceptibles a sufrir daño genotóxico.

Debido a las características del proyecto del cual ha salido este trabajo de tesis, no se contó con una población control, pero gracias a información recabada mediante las encuestas realizadas se tuvo el dato de que participantes tienen una exposición directa a plaguicidas (es decir que tienen la ocupación de agricultores) que represento el 66.10% de la población total y quienes tienen una exposición indirecta (participantes con otro tipo de actividad ocupacional pero que están de manera indirecta en contacto con los plaguicidas) que fueron el 33.90%. Por consiguiente, se separó a la población en estos dos grupos para poder evaluar si existían diferencias entre ellos.

Curiosamente existe una distribución muy similar con respecto a los grupos con exposición directa e indirecta, siendo el hábito de beber alcohol el que presenta un porcentaje mayor de participantes que lo realizan, 48.73% y 50.82% respectivamente, en comparación a los hábitos de fumar y masticar coca (ver graficas 1 y 2), esto mismo ocurre con la distribución respecto al sexo y a la edad, teniendo un número similar de participantes entre hombres y mujeres y observando un mayor número de participantes entre los 18 a 29 años (tablas 2 y 3).

Existe un gran número de estudios de biomonitorio realizados en nuestro país, los cuales presentan también una variedad considerable de resultados, dependiendo de los marcadores que se hayan utilizado, Tirado Bustillos, N.S., 2008 menciona que los trabajadores expuestos directamente a productos tóxicos, tienen una probabilidad elevada de sufrir efectos problemáticos sobre su salud siendo ese el motivo por el cual son objeto de numerosos estudios, donde destacan los epidemiológicos y toxicológicos.

9.2 Evaluación de anomalías nucleares

Como se ha mencionado en repetidas ocasiones, el biomonitoreo de poblaciones expuestas a plaguicidas es la herramienta más aplicada y útil para realizar un control sobre poblaciones que tiene un alto grado de exposición a sustancias genotóxicas como ser los plaguicidas, donde el empleo de distintos biomarcadores permite al estudio recabar indicios del potencial riesgo. Dentro de los biomarcadores, el ensayo de micronúcleos y evaluación de anomalías nucleares como medidor de efecto es genuinamente importante y muy aplicado en estas circunstancias (Walker, CH., 1998).

En la realización del presente trabajo, se ha empleado la evaluación de anomalías nucleares sobre células exfoliadas del citoma bucal, esto ha permitido tener un panorama más amplio en lo que respecta a daño genotóxico como citotóxico tanto para la población estudiada total como también para realizar la comparación entre sub grupos según el tipo de exposición a plaguicidas.

Las células con núcleo en cariólisis y cariorrexis son sinónimo de muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis (Majno G. et al., 1995), si bien algunos autores como Castro, R., Ramírez, V. y Cuenca, P., 2004, en su trabajo relacionan el aumento de la frecuencia de células con núcleos en cariólisis y en cariorrexis con daño genotóxico, encontrar este tipo de anomalías no es un indicador definitivo, ya que su origen puede deberse a otros factores, más aún cuando se los evalúa en células epiteliales, de igual forma pueden considerarse como indicios de un estado de salud en riesgo para el individuo, ya que como lo mencionan Squier, C.A. y Kremer, M.J., 2001, evaluar la cavidad oral, que contempla a las células epiteliales, permite ver un reflejo de la salud de la persona, permitiendo obtener vestigios que permiten identificar los efectos por el contacto o exposición a ciertos agentes y también ciertas enfermedades.

Las células binucleadas se forman gracias a una falla en la citocinesis, esto debido a defectos en la formación del anillo de microfilamentos, la detección del ciclo celular o a la disfunción de los telómeros (Bolognesi, C. et al., 2013), el trabajo realizado por Pampalona J., Frías C, Genescà A., Tusell L., 2012 expone que las células epiteliales tienen una alta probabilidad de presentar disfunción telomérica por lo cual es más común poder encontrar células binucleadas hasta tetraploides después de una citocinesis fallida, además de que según la bibliografía esta es una de las anomalías más comunes encontradas en personas que sufren de aneuploidías, tal es el caso de los pacientes con síndrome de Down, por lo que se puede considerar la relación célula binucleada – célula mononucleada como un biomarcador eficiente indicador de susceptibilidad a las aneuploidías en personas sanas (Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T. y Fenech, M., 2008).

Las células con núcleo en Broken egg se encuentran dentro del grupo denominado como células con brotes nucleares (NBUD por sus siglas en inglés), los cuales se originan por gemación nuclear, también se caracterizan por poseer similitudes morfológicas a los

micronúcleos con la excepción de que están conectadas al núcleo por un estrecho hilo de material genético (Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., y Thomas, P., 2011), su significancia biológica ha sido relacionada como un indicador de daño genotóxico, al igual que los micronúcleos, en linfocitos, pero en células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral su presencia puede deberse a muchos otros factores como procesos degenerativos (Torres Bugarín, O., et al., 2013), aunque también otros autores la han asociado junto a los micronúcleos con el cáncer siendo un fenotipo característico de células cromosómicas inestables (Fenech, M. et al., 2011).

De igual manera, al realizar el análisis por sub grupos, se puede observar que no existe aparentemente una diferencia significativa entre las poblaciones que tienen exposición directa e indirecta a plaguicidas (ver anexos 8 y 9), esto podría explicarse desde el razonamiento de que gracias a la contaminación ambiental producida por estos agentes, las poblaciones que viven en estas zonas se ven afectadas, así no realicen actividades que implique un contacto directo con estos agentes, ya que se ha verificado una afectación tanto a suelos como fuentes de agua natural cercanos, lo cual conlleva un efecto negativo en el ciclo de ciertos micronutrientes (Barrón Cuenca, J. et al., 2015), lo cual expone indirectamente y pone en riesgo la salud de los pobladores de la zona, que comúnmente consumen esos alimentos y agua cercanos.

9.3 Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencia alélica para el polimorfismo PON1 (Q192R).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la frecuencia de los polimorfismos genéticos PON 1 por medio de técnicas de PCR, esto representó un reto debido a la antigüedad de las muestras de sangre, las mismas que fueron recolectadas a lo largo del año 2019 y fueron conservadas por más de dos años hasta su extracción, como lo menciona Luna, A. 2019 en su trabajo de tesis, obtener material genético de muestras de sangre de data antigua es una tarea compleja y que debe realizarse con mucho cuidado, más aún si la muestra no es sangre seca, ya que existe una mayor probabilidad de acción de nucleasas, además de que de manera natural, el material genético puede ir degradándose por el paso del tiempo, disminuyendo la calidad de la misma.

No obstante, se logró validar la técnica de PCR-RFLP y estandarizar la qPCR para el análisis del polimorfismo PON1Q192R (ver figuras 13, 14 y 15), como resultado se ha determinado las frecuencias genómicas de estos polimorfismos dentro de la población en estudio, donde un 13,90% presentaron el polimorfismo QQ (wild type), un 37,20% el polimorfismo QR (heterocigoto) y un 48,90% de la población presentó el polimorfismo RR (gen mutado) (ver gráfica 8), estos resultados son similares a los obtenidos en el trabajo de Carranza Alva, E. et al., 2017, quien realizó una investigación similar en una población del distrito de Junín en Perú, donde también encontró una frecuencia baja para

el genotipo QQ igual a 13,9%, un 45,6% para el genotipo heterocigoto y un 40,5% para el genotipo mutado RR.

Por el contrario, Garcés, C., López-Simón, L., Rubio, R., Benavente, M., Cano, B., Viturro, E. y De Oya, M., 2007, reportaron resultados distintos, mostrando una frecuencia superior para el polimorfismo QQ, la misma que fue del 70%, esto sobre cuatro poblaciones prepuberales caucásicas de España.

También se realizó el análisis comparativo de frecuencias por sub grupos según el tipo de exposición a plaguicidas, donde no se encontraron diferencias significativas entre ambos, tendiendo frecuencias de 10,90% y 19,70% para el genotipo wild type, 39,50% y 32,80% para el genotipo heterocigoto y finalmente 49,60% y 47,50% para el genotipo mutado (ver anexos 16 y 17), esta similitud se observó también en otros trabajos como el de Singh, S., et al., 2011, en el cual se evaluaron los polimorfismos genéticos de la enzima Paraoxonasa-1 y la susceptibilidad genética a daños sobre el ADN en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados en una población perteneciente al país de la India, donde encontraron similitud genotípica tanto en la población de estudio como en sus grupos control, observando frecuencias de 35,65% y 32,17% para el homocigoto salvaje (genotipo QQ), 51.30 y 53.04 para los heterocigotos y 13.04% y 14.78% para los genotipos mutados (genotipo RR).

Del mismo modo, se analizó las frecuencias alélicas con ayuda del principio de equilibrio de Hardy-Weinberg, el mismo que consiste en observar si la frecuencia alélica de una población permanece igual o no con el paso de las generaciones. Este principio se basa en las siguientes hipótesis: a) Una población panmíctica, b) el tamaño poblacional suficientemente grande (representativo), c) la población no está sometida a migración, mutación o selección y d) Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación (Kalmes, R., y Huret, J.L. (2021).

La tabla 5 expone los resultados de este análisis, mostrando una frecuencia alélica para el genotipo QQ de 0,68 y 0,32 para el genotipo RR, donde gracias a los cálculos de Chi cuadrado y su respectivo p~valor se observa que la población estudiada no se encuentra en equilibrio genético de Hardy-Weinberg, lo cual significa que está sufriendo cambios en lo que respecta a sus frecuencias alélicas, este resultado difiere a estudios como el de Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M.J., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., Alvarado-Mejía, J., Borja-Aburto, V.H. & Quintanilla-Vega, B., 2008, o Singh, S., et al., 2011, en los cuales se analizó este mismo polimorfismo y donde las poblaciones estudiadas independientemente de las frecuencias alélicas halladas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El polimorfismo PON1Q192R modifica la actividad de la enzima Paraoxonasa-1, la cual es una enzima implicada en la hidrólisis de diversos compuestos organofosforados (Márquez Llanos, D.C., 2015), en la cual existe un cambio de aminoácido entre una

glutamina (genotipo QQ o silvestre) por una arginina (genotipo RR o mutado), siendo el genotipo mutado el que presenta mayor actividad enzimática (Serrato, M., et al., 1995), observando los resultados obtenidos, se puede afirmar que la población en estudio está empezando a sufrir cambios o adaptaciones genéticas debido a la exposición a plaguicidas ya sea de manera directa o indirecta, esto principalmente por las frecuencias alélicas halladas, las mismas que no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, este desequilibrio puede deberse al tamaño de la población, el cual no es lo suficientemente grande para ser representativo o a que parte de la población está sometida a migración por temas laborales.

9.4 Análisis comparativo de los niveles de las enzimas hepáticas GOT y GPT con los factores higiénicos, biomarcadores de efecto y susceptibilidad.

9.4.1 Factores higiénicos

No todos los trabajos relacionados a evaluar la exposición de poblaciones a agentes genotóxicos como los plaguicidas se resumen solamente en evaluación de marcadores de daño o susceptibilidad, existen trabajos como los de Avilés Granda, K.L., 2016 y Navarrete Vera, JL, 2019, que relacionan valores elevados de marcadores de daño hepático, entre las cuales se encuentran las enzimas transaminasas, con la exposición aguda o crónica a este tipo de compuestos.

La exposición aguda o crónica a plaguicidas puede generar daño hepático, esto debido a un aumento forzado en sus actividades fisiológicas, ya que este órgano es el encargado de llevar adelante la detoxificación del organismo, entre otras funciones, por lo cual estar constantemente expuesto a este tipo de sustancias compromete la integridad y buen funcionamiento del mismo (Adán Merino, L., Gómez Senent, S., Gea Rodríguez, F., Alonso Gamarra, E., Martín Arranz, E., y Segura Cabral, JM., 2010).

Las enzimas alanina aminotransferasa (ALT o GPT) y aspartato aminotransferasa (AST o GOT) son transaminasas que presentan una importancia clínica cuando se encuentran fuera de sus valores normales, por consiguiente, cuando existe daño hepático sus valores en sangre se encuentran elevados por su liberación a torrente sanguíneo, esto es debido a la inflamación del hígado (hepatitis) y/o la muerte de células hepáticas (Acevedo, L., Charris, A., Fuenmayor, K. y Lobatón, F., 2018).

Entonces, en las tablas 7 y 8 se muestran datos comparativos de los factores higiénicos con relación a la enzima GPT y GOT respectivamente, donde se observa que el 30.56% de la población presentó un valor elevado para la enzima GPT, es decir 55 de 180 participantes y el 36.64% de la población se encontró con valores elevados para la enzima GOT, es decir 66 de 180 participantes, esto puede explicarse gracias a las características de estas dos enzimas, primeramente la GPT es específica del hígado al encontrarse elevado en el citosol de los hepatocitos y elevando su concentración en sangre de manera considerable al existir daño a nivel de este órgano, en cambio GOT no es tan específica

para el hígado, según E. Kuntz, y H.D. Kuntz., 2006, la significancia clínica de esta enzima con respecto a enfermedades hepáticas es significativamente menor a GPT debido a que en comparación existe una menor concentración de la enzima en citosol, alrededor de un 20%, que se libera a torrente sanguíneo cuando existe daño a nivel de células hepáticas, además de que GOT se encuentra presente en mayor concentración en otro tipo de células, tales como células del corazón, riñón y en células del músculo esquelético, por lo mismo, cuando este se encuentra con valores elevados en sangre normalmente se lo puede relacionar además del posible daño hepático con enfermedades cardíacas o en otros casos con actividad física vigorosa (estrés muscular).

Con respecto al sexo, para GPT, de los 55 casos con valor elevado 38 fueron del sexo femenino (41.31% de la población femenina total) y 17 del sexo masculino (19.32% de la población masculina total), algo similar se vio para GOT donde de 66 participantes con valor elevado para esta enzima, 38 fueron del sexo femenino (46.74% de la población femenina total) y 23 del sexo masculino (26.14% de población masculina total).

En ambos casos se observa que existe un mayor número de mujeres con valores enzimáticos elevados, tanto para GPT como para GOT, Arellano García, M.E., et al., 2012 hace mención de la existencia de factores inherentes con respecto al sexo femenino que las hacen más susceptibles a sufrir o presentar enfermedades debido a la exposición a plaguicidas.

En cuanto a los hábitos tomados como variables confundentes y su relación con las enzimas hepáticas, el más relevante es el consumo de bebidas alcohólicas, ya que existen bastantes estudios que demuestran la relación entre su consumo y el aumento significativo de ciertas enzimas como GOT, GPT, GGT (gama glutamil transpeptidasa), ALP (Fosfatasa alcalina) entre otras que, son marcadores de daño y función hepática (Coila Añasco, P.U., et al., 2010). Gracias a la información recabada en las encuestas realizadas, se sabe que de 180 participantes 89 si consumen bebidas alcohólicas, de los cuales 30 presentan valores elevados para GPT y 39 tienen valores elevados para GOT, esto representa el 54,55% y 59,10% respectivamente tomando en cuenta solamente total de personas que mostraron valores elevados para estas enzimas (55 personas para GPT y 66 personas para GOT).

Respecto a la edad y su relación con GPT y GOT, en las tablas 7 y 8 se puede observar una distribución similar entre los intervalos y también las enzimas, esto se puede deberse a que las enfermedades hepáticas y su manifestación no está íntimamente relacionadas con la edad, como es el caso de otros órganos que si se ven más afectados a medida que van pasando los años, sino que las patologías hepáticas dependen principalmente de otros factores y pueden presentarse a cualquier edad (De Martí, J., 2020).

Gracias al modelaje de datos realizado con el programa *r-project*, utilizando la regresión de Poisson y luego aplicando una selección de pasos bajo los criterios de inclusión de

Akaike (AIC), se observó que tanto el hábito de beber, como el sexo son variables estadísticamente significativas en lo que respecta a daño genotóxico (ver tabla 6), por lo cual se determinó si existía una relación entre estas variables con las enzimas GOT y GPT.

Para esto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para determinar si existía diferencias estadísticas significativas entre estos grupos, donde para el caso del hábito de beber frente a las enzimas GOT y GPT, se obtuvieron valores de significancia superiores a 0,05 por lo cual se concluye que no existe diferencias entre los grupos analizados.

Asimismo, los diagramas de cajas obtenidos permiten corroborar que efectivamente los datos no presentan una distribución normal, esto gracias a la forma rectangular de la caja y a la localización de la línea que determina la mediana, que muestra una asimetría positiva, la misma que se comprueba al observar las gráficas cuantil-cuantil e histogramas que muestran una cola pesada hacia la derecha por lo cual se concluye también que los datos se encuentran concentrados entre el primer cuartil y la media (ver figura 16).

Referente a la variable de sexo frente a las enzimas, para el caso de GOT el valor de significancia fue también superior a 0,05 por lo cual se concluye que no existen diferencias entre ambos grupos de datos analizados, en cambio para GPT al igual que con el hábito de beber no presenta diferencias estadísticamente significativas entre grupos: De la misma manera, los diagramas de cajas muestran una distribución anormal de datos, repitiendo la forma rectangular de la caja con una asimetría positiva y colas pesadas también hacia la derecha, permitiendo concluir una concentración de datos entre el primer cuartil y la media (ver figura 17).

9.4.2 Biomarcadores de efecto

Dentro del análisis de regresión, los diagramas de dispersión permiten definir si existe correlación y concordancia entre los valores de dos variables, una en función a la otra y donde ambas pueden ser independientes (García Garmendia, J.L y Maroto Monserrat, F., 2018), es decir que por medio de esta herramienta se puede observar si existe alguna asociación entre ambas variables, descartando la existencia de causalidad entre las mismas.

Asimismo, se quiso comprobar si existía alguna correlación y concordancia entre los valores de las enzimas hepáticas y los biomarcadores de efecto para daño genotóxico y citotóxico, es decir, la evaluación de anomalías nucleares en el citoma bucal, por lo cual en las figuras 18 y 19 se observan diagramas de dispersión entre ambas enzimas, GOT y GPT, con las cinco anomalías evaluadas dentro del trabajo.

Los diagramas A y B de las figuras 18 y 19, representan la comparación de las células binucleadas y con núcleo en cariólisis frente a ambas enzimas, donde se observa en todos los casos una correlación nula, ya que los puntos generados en las coordenadas X y Y dentro de los diagramas están dispersos y dispuestos al azar, por lo cual no se aprecia

ningún tipo de recta lo que lleva también a concluir que no existe concordancia entre los valores analizados.

Del mismo modo, en los diagramas D y E de las figuras 18 y 19 se compara a las células con núcleo en Broken egg y micronúcleos frente a ambas enzimas, al igual que en los dos anteriores casos, existe una correlación nula entre los grupos analizados, con la diferencia de que los puntos no se encuentran dispersos, por el contrario, se encuentran agrupados formando una o dos rectas horizontales entre las coordenadas X y Y, esto podría sugerir que existe cierta concordancia entre los datos, pero también podría explicarse por los mismos resultados obtenidos en el análisis de anomalías, ya que tanto las células con núcleo en Broken egg como células con micronúcleos fueron muy escasas, siendo encontradas en menos del 20 y 1% de placas leídas, lo cual explicaría la forma de estos diagramas.

Finalmente, los diagramas C de las figuras 18 y 19, muestran la comparación entre las células con núcleo en cariorrexis frente a las enzimas GOT y GPT, donde a diferencia de todos los anteriores resultados, estos presentan una correlación negativa débil, ya que por la disposición de los puntos puede notarse una recta diagonal descendente que indica que ambas variables son indirectamente proporcionales, ya que mientras una sube la otra baja, a su vez que los puntos no se encuentran muy pegados a la recta por lo cual la concordancia se la considera baja o débil.

9.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad

Además de las variables de beber y sexo, los polimorfismos del gen PON1 fueron estadísticamente significativos en lo que respecta a daño genotóxico según el modelaje de datos realizado (ver tabla 6), por lo mismo se determinó también si existe una relación entre esta variable y las enzimas de GOT y GPT.

Al igual que el caso anterior se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, donde se obtuvieron valores de significancia superiores a 0.05 por lo mismo, se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, al mismo tiempo, por medio de los diagramas de cajas se observa nuevamente que la distribución de los datos no es normal por la forma rectangular de las mismas, además de que a diferencia de los diagramas obtenidos al realizar este mismo análisis con las variables de beber y sexo, estas presentan una forma rectangular expandida, lo cual sugiere que los datos se encuentran más dispersos.

Con respecto a la distribución, únicamente el diagrama que representa el polimorfismo QQ vs GPT presenta una asimetría aparentemente negativa, esto debido al sitio donde se encuentra la línea que indica la media, pero al observar tanto su gráfica cuantil-cuantil e histograma se observa una cola pesada hacia la derecha y no hacia la izquierda, esto podría deberse a que la población que presenta el polimorfismo homocigoto QQ mostró valores cuantitativos más bajos en lo que respecta a esta enzima específicamente. El resto de

diagramas de caja mostraron una asimetría positiva que se verifica al compararlo con las gráficas cuantil-cuantil e histogramas.

Existe poca información que relacione directamente marcadores de daño hepático tales como las enzimas transaminasas GOT y GPT con biomarcadores de efecto, como ser las anomalías nucleares en células exfoliadas del citoma bucal, o biomarcadores de susceptibilidad, como ser diversos polimorfismos genéticos, para la evaluación de daño genotóxico provocado por plaguicidas. A pesar de esto, existen trabajos similares como el realizado por Hernández, A.F., Amparo Gómez, M., Pérez, V., García-Lario, J.V., Pena, G., Gil, F., López, O., Rodrigo, L., Pino, G. & Plá, A., 2006, donde estudian la influencia que tiene la exposición a plaguicidas sobre la actividad de ciertas enzimas, entre ellas GOT, concluyendo que su actividad se vio afectada, o la investigación llevada adelante por Saad-Hussein, A., Beshir, S., Taha, M. M., Shahy, E. M., Shaheen, W., Abdel-Shafy, E. A., & Thabet, E., 2019, en el cual se analizó y comparó marcadores tumorales relacionados con daño hepático en agricultores expuestos a plaguicidas y grupos control, donde observaron que las poblaciones expuestas a plaguicidas presentaron un mayor número de marcadores tumorales en comparación a los grupos control. Gracias a estos trabajos se puede ver que efectivamente existe una relación entre la exposición a plaguicidas y los valores en sangre de estas transaminasas, pero no se debe olvidar que existen muchos otros factores que influyen de igual manera en las concentraciones séricas de estas enzimas, como es el caso de hábitos como el alcoholismo, cierto tipo de enfermedades o incluso la misma edad y sexo de la persona (Muñoz-Arteaga, K.V., Pesamtez-Guzman, J.D., Valero-Cedeño, N.J. y Lino-Villacreses, W., 2021).

10. CONCLUSIONES.

Gracias a la información recabada la cual permitió el análisis de los factores higiénicos y de salud, se observó una población que consume o bebe alcohol en un porcentaje elevado, por lo mismo, se lo tomó como un factor confundente y además en virtud al modelaje de datos realizado, se determinó que esta variable fue estadísticamente significativa, a pesar de eso no se puede dejar de lado otros factores tales como fumar y masticar coca, ya que si bien los mismos por medio del análisis estadístico no mostraron una significancia, la bibliografía los considera como factores confundentes principalmente para cierto tipo de biomarcadores (análisis del citoma oral).

Con respecto a variables como la edad y el sexo el modelaje de datos realizado consideró al sexo como un factor significativamente relevante con respecto al daño genotóxico o citotóxico, esto podría deberse a que en el presente trabajo existió un número similar entre participantes hombres y mujeres, evidenciando que en la actualidad existe un número mayor de mujeres que realizan esta actividad laboral y que ellas podrían ser biológicamente más susceptibles a sufrir el riesgo de contraer algún tipo de patología ligada a la exposición crónica a plaguicidas.

No se observaron diferencias significativas al momento de separar y analizar la población por sub grupos según el tipo de exposición, esto podría deberse a la contaminación ambiental que genera el uso de estos agroquímicos, ya que su uso constante deja residuos tanto en suelo como en aguas, siendo este el mecanismo por el cual de manera indirecta dejan expuestos a pobladores que viven en una región agrícola pero que no realizan ninguna actividad o manipulación directa con los plaguicidas.

Se determinó daño citotóxico dentro de la población estudiada, esto gracias al porcentaje de placas contadas al microscopio que presentaron células con núcleo en cariólisis y células binucleadas, no se pudo determinar daño genotóxico como tal, ya que no se encontraron células con micronúcleos, por lo cual se recomienda en futuros estudios no realizar únicamente el análisis del citoma en células exfoliadas de la mucosa oral, sino también realizar el análisis de micronúcleos en linfocitos binucleados y comparar los resultados de ambas pruebas.

Luego de la validación y estandarización de las técnicas de PCR-RFLP y qPCR se evaluaron las frecuencias del polimorfismo genético PON 1, donde se observó una mayor frecuencia de participantes con el gen mutado, realizando el análisis de equilibrio de Hardy-Weingberg el cual presentó un p-valor menor a 0.05 ($p = 0.041918$), se determinó que la población en estudio no se encuentra en equilibrio lo cual significa la posibilidad de cambios en las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente, y en este caso particular podría considerándose como evolución, debido a que el gen mutado es relacionado con una mayor actividad enzimática para la proteína Paraoxonasa 1, pero según lo mencionado en la discusión este desequilibrio pudo deberse a que la población no fue lo suficientemente representativa o está sometida a migración constante.

Finalmente, si bien en el presente trabajo no se ha podido establecer de manera estadística una significancia entre los biomarcadores de efecto y susceptibilidad con las enzimas GOT y GPT, si se ha comprobado la existencia de daño genotóxico gracias a todas las pruebas realizadas, de manera que se puede concluir que los biomarcadores de daño hepático, efecto y susceptibilidad pueden ser complementarios entre sí y brindar un panorama más completo acerca del estado de salud de las poblaciones sometidas a biomonitoreo por exposición aguda o crónica a plaguicidas.

11. REFERENCIAS.

Adán Merino, L., Gómez Senent, S., Gea Rodríguez, F., Alonso Gamarra, E., Martín Arranz, E., y Segura Cabral, JM. (2010). Necrosis hepática secundaria a intoxicación por organofosforados. *Revista Española de Patología Digestiva*, 102 (4), 285-286. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082010000400013&lng=es&tlng=es.

Acevedo, L., Charris, A., Fuenmayor, K. y Lobatón, F. (2018). Determinación de Got y Gtp en suero. *Laboratorio Bioquímica, Universidad del Atlántico*. Recuperado de: https://www.academia.edu/36492124/determinacion_de_GOT_Y_GTP.

Agroterra (2021). Herbicidas, clasificación y uso. Recuperado en: <https://blog.agroterra.com/descubrir/herbicidas-uso/77614/>.

Alemañ, M (2015). Polimorfismos genéticos: definición y ejemplos. [Blog spot]. *Blog de pruebas genéticas y fertilidad CeFeGen*. Disponible en: <https://cefegen.es/blog/polimorfismos-geneticos-definicion-ejemplos>.

Anchatipán Escobar, J., Vailati, J., Viteri-Robayo, C. (2020). Concentraciones Séricas de la Enzima Acetilcolinesterasa en Agricultores Expuestos a Organofosforados. *Enfermería Investiga, Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión*, 5(3), 39 - 45. Recuperado de: <file:///C:/Users/59177/Downloads/910-110-2148-1-10-20200706.pdf>.

Arango V, S.S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75 – 82. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30n1/v30n1a09.pdf>.

Arellano García, M.E., Camarena Ojinagam L., Von-Glascoe, C.A., Ruiz Ruiz, B., Zuñiga Violante, E. y Montaña Soto T. (2012). Daño Genotóxico en Mujeres y Hombres Expuestos a Plaguicidas en Cuatro Localidades de Baja California. En Cedillo, L.A., Cano, F.K., Sanín L.H. y Sánchez, A.M. (Eds), *Genero, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas* (pp. 95-113). <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/CD001525.pdf>

Ascarrunz, E., Tirado, N., Gonzales, A.R., Cuti, M., Cervantes, R., Huici, O. y Jors, E. (2005). Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Revista Cuadernos Hospital de Clínicas*, 50(2). Recuperado en: http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762005000200005&lng=en&nrm=iso.

Astiz M., de Alaniz J.T. y Marra C.A. (2009). The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94 (2-3), 93-99. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.03.005.

Avilés Granda, K.L. (2016). Medir los niveles de Haptoglobina en trabajadores de una Florícola en el Cantón Cayambe. [Tesis de licenciatura, Universidad Central del Ecuador] Repositorio. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9711/1/T-UCE-0006-053.pdf>.

Ballesteros, D., Soto Oviedo, A., Murillo Palacios, J y García, C. (2021). Intoxicación por Paraquat y uso de terapias de remoción extracorpórea: reporte de 7 casos y revisión de literatura. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*, 21(1), 94-104. Recuperado en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0122726220300306>.

Barbosa, M.C., Aiassa, D. y Mañas, F. (2017). Evaluación de Daño al ADN en Leucocitos de Sangre Periférica Humana Expuestos al Herbicida Glifosato. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, (3)33. 403 – 410. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v33n3/0188-4999-rica-33-03-403.pdf>.

Barrón Cuenca, J., Aguilar Mercado, X., y Navia Bueno, P., (2015). Exposición a Plaguicidas, Desnutrición Crónica y Daño Genotóxico en Menores de Tres Años. Luribay. *Cuadernos Hospital de Clínicas*. 56(2). 9–17. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762015000200002&lng=es&tlng=es.

Barron Cuenca, J., Tirado, N., Vikström, M., Lindh, C., Steinus, U., Leander, K., Berglund, M., & Dreij, k. (2019). Pesticide exposure among Bolivian farmers: associations between worker protection and exposure biomarkers. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. doi: <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0128-3>.

Bascopé Zanabria, R., Bickel, U., Jacobi, J., Delgado, F. y Neumeister, L. (s.f.). *Plaguicidas altamente tóxicos en Bolivia* [Proyecto de investigación: “Hacia la sustentabilidad alimentaria: reformando la coexistencia de diferentes sistemas alimentarios en América del Sur y África”]. Universidad de Berna Centro para el Desarrollo y el Medio Ambiente Oficina regional Sudamerica. https://www.sudamericarural.org/images/2018/Policy_brief_pesticides_annex-HHPs.pdf.

Bascopé Zanabria, R., Bickel, U., y Jacobi, J. (2019). Plaguicidas químicos usados en el cultivo de soya en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia: riesgos para la salud humana y toxicidad ambiental. *Acta Nova*, 9(3), 386-416. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892019000300005&lng=es&tlng=es.

Benítez-Leite, S., Macchi, M.L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E., Mojoli, A., Cuevas, F., Alfonso, J. y Sales, L. (2012). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 83(4), 291 – 300. Recuperado de: https://www.sup.org.uy/archivos-de-pediatria/adp83-4/pdf/adp83-4_paraguay-celular.pdf.

Bickel, U. (2018). *Uso de plaguicidas por pequeños productores en Bolivia. Impactos en la salud, los ecosistemas y la economía campesina. Alternativas agroecológicas y conclusiones para lograr una orientación hacia una mayor sostenibilidad* [tesis de maestría, Universidad de Rostock, Alemania]. https://www.welt-ernaehrung.de/wp-content/uploads/2018/11/Plaguicidas-en-Bolivia_tesis-UBickel.pdf.

Biodiversidad Mexicana. (s.f.). *¿Qué es un ecosistema?* Recuperado en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/quees>.

Blanco Muñoz, J., Aguilar Garduño, C., Gamboa Avila, R., Rodríguez Barranco, M., Pérez Méndez, O., Huesca Gómez, C., González Alzaga, B & Lacasaña, M. (2013). Association between PON1 genetic polymorphisms and miscarriage in Mexican women exposed to pesticides. *Science of The Total Environment*, 449, 302–308. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.034.

Boletín Agrario (2019). Insecticida. Recuperado de: <https://boletinagrario.com/ap-6,insecticida,480.html>.

Boletín Agrario (2019). Fungicida. Recuperado de: <https://boletinagrario.com/ap-6,fungicida,415.html>.

Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), 100–113. Doi: 10.1016/j.mrrev.2013.07.002.

Boogaard, P.J. y Money, C.D. (2008). A proposed framework for the interpretation of biomonitoring data. *Salud Ambiental: una fuente científica de acceso global*, 7(suppl1). Doi: 10.1186/1476-069X-7-S1-S12.

Brusco, H. A., López Costa, J.J., Loidl, C. F. (2014). Técnica histológica, *Histología médico-práctica* (53). España: ELSEVIER. Recuperado de: http://www.heortiz.net/uvm-estructurayfuncion/Clase_6-18_de_Septiembre-Tecnica_histologica.pdf.

Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., & Betterhill, J.M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2), 93 – 103. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/7212634_Evidence_for_Genotoxicity_of_Pesticides_in_Pesticide_Applicators_A_Review.

Carbamatos (s.f.). Recuperado en: <https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal/enciclopedia/terminos/Carbamat.htm>.

Caro-Gamboa, L.J., Forero Castro, M. y Dallos Báez, A.E. (2020). Inhibición de la colinesterasa como biomarcador para la vigilancia de población ocupacionalmente expuesta a plaguicidas organofosforados. *Revista Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3). DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1562.

Carranza Alva, E., Peña Suasnábar, C. y Florentini Carranza, A. (2017). Distribución del polimorfismo Q192R del gen de la paraoxonasa 1 en una población del distrito de Junín (Región Junín, Perú). *Horizonte Médico (Lima)*, 17 (2), 30-37. Disponible en: <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.24265/horizmed.2017.v17n2.04>.

Castro, R., Ramírez, V. y Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anomalías nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 611 – 621. Recuperado de: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300023.

Carvajal, D., Manquillo, J.C., Rosero Caldon, A.B., Perafán Collazos, J., Álvarez Rosero, R., Montero, J., y Cajas Salazar, N. (2017). Evaluación de daño genético en pacientes con síndrome metabólico en una población del Cauca, Colombia. Un estudio caso-control. *Salutem Scientia Spiritus*, 3(2), 12-21. Recuperado de: <https://revistas.javerianacali.edu.co/index.php/salutemscientiaspiritus/article/view/1772/pdf>.

Cedano Díaz, A., Martínez González, S., Escalera Valente, F., Salgado Moreno, S., Carrillo Díaz, F., Macías Coronel H. y Peña Parra B. (2012). La Prueba de Micronúcleos en Sangre como Bioindicador de Genotóxicos, *Revista abanico veterinario*, 2(2), 43 – 54. Recuperado de: <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/890/1/La%20prueba%20de%20micron%C3%BAcleos%20en%20sangre%20como%20biomarcador%20de%20genot%C3%B3xicos.pdf>.

Charroo Portilla, O., Cantalapiedra Luque, A., Torres Quiala, M., Fernández Ortega, M., Fuentes Prats R.A., García Pérez, A. y Cantalapiedra Luque, A., (2006). Neurotransmisores. *Revista Informacion Cientifica*, 52(4). Recuperado en: <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/1512/2895>.

Checa Caratachea, M.A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213 – 221. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2007/in073h.pdf>.

Coila Añasco, P.U. (2010). Efecto del Alcoholismo Crónico sobre la Función Hepática en Altura. [Tesis para optar el grado de maestría, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. Repositorio. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/8345/MDMcoanpu.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Cosquillo-Rafael, M.F., Placencia-Medina, M.D., Miranda-Tomasevich, T.Y., Moreno-Hinojosa, M. y Retuerto-Figueroa, M.G. (2020). Efecto citotóxico y genotóxico in vitro del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37 (3), 454-461. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342020000300454.

Dhananjayan, V., & Ravichandran, B. (2018). Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities. *ScienceDirect – Current Opinion in Environmental Science & Health*. 4. 31-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.07.005>.

De Martí, J. (2020). Enfermedades hepáticas en personas mayores. *Info residencias* <https://www.inforesidencias.com/blog/index.php/2020/01/20/enfermedades-hepaticas-en-personas-mayores/>.

Del Puerto, A., Suárez, S. & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*; 52(3), 372-387. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>.

Diccionario del Instituto Nacional del Cáncer (s.f.). *Neuropatia*. Recuperado en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neuropatia>.

Docea, A.O., Vassilopoulou, L., Fragou, D., Arsene, A.L., Fenga, C., Kovatsi, L., Petrakis, D., Rakitskii, V.N., Nosyrev, A.E., Izotov, B.N., Golokhvast, K.S., Zakharenko, A.M., Vakis, A., Tsitsimpikou, C., y Drakoulis, N. (2017). CYP polymorphisms and pathological conditions related to chronic exposure to organochlorine pesticides. *ScienceDirect – Toxicology Reports*. 4. 335-341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.007>.

Dorado Martínez, C., Rugerio Vargas, C. y Rivas Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 46(6), 229 – 235. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-6/RFM46606.pdf>.

Elena Real, C.A., Pasión Galván, R., Pérez Artes M.R., Puerto, M. y Moreno, I. (2012). Posible contribución del paraquat al desarrollo de la enfermedad de Parkinson. *Revista de Toxicología*, 29(2), 117- 122. ISSN: 0212-7113. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/919/91931401007.pdf>.

E. Kuntz, y H.D. Kuntz. (2006). Digestive and Liver Disease. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg*. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2006.07.001>. Recuperado de: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.dld.2006.07.001>.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., y Thomas, P., (2011). Mecanismos moleculares de formación de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares en células de mamíferos y humanas. *Mutagénesis* 26(1), 125–132 Doi: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>.

Fernandez, D.G., Mancipe, L.C. y Fernandez, D.C. (2010). INTOXICACION POR ORGANOFOSFORADOS. *Revista Med*, 18(1). 84 – 92. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v18n1/v18n1a09.pdf>.

Ferré, D. M., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., Carracedo, R., y Gorla, N.B. (2018). Ensayo de Micronúcleos de Citoma Bucal en Trabajadores de Fincas Frutícolas que han Aplicado Plaguicidas Alrededor de Quince

Años. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1), 23-33.
doi: <https://dx.doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.02>.

Fridman, Osvaldo, Fuchs, Alicia Graciela, Porcile, Rafael, Morales, Analía Verónica, & Gariglio, Luis Osvaldo. (2011). Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Archivos de cardiología de México*, 81(3), 251-260. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402011000300014&lng=es&tlng=es.

Fuentes Delgado, V.H., Quezada Aguilera, C.L., Martínez Saldaña, M.C., Jaramillo Juárez, F., Rodríguez Vázquez, M.L., Jaramillo Gonzales, F. y Reyes Sánchez, J.L., (2011). Hepatotoxicidad subaguda y crónica producida por el plaguicida paratión-metílico en la rata. *Revista mexicana de ciencias Farmacéuticas*, 42(3), 50 – 56. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000300007.

Garcés, C., López-Simón, L., Rubio, R., Benavente, M., Cano, B., Viturro, E. y De Oya, M. (2007). Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 19(6), 287 – 292. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-analisis-actividad-paraoxonasa-pon1-polimorfismos-13114028>.

García Garmendia, J.L y Maroto Monserrat, F. (2018). Interpretación de resultados estadísticos. *Revista medicina intensiva*, 42(6), 370 – 379. Doi: 10.1016/j.medin.2017.12.013.

Gentile, N., Bernardi, N., Bosch, B., Mañas, F., y Aiassa, D. (2016). Estudios de genotoxicidad en trabajadores rurales y familias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 35(3). 228-239. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000300004.

Gonzales Ulibarry, P. (2019). *Efecto de los plaguicidas sobre la salud humana*. (Asesoría Técnica Parlamentaria, Boletín N° 6.969-01). Biblioteca del Congreso Nacional de Chile/BCN. https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/26823/2/Efecto_de_1_os_plaguicidas_en_la_Salud.pdf.

Guerrero, R. (Ed.) (1980). *Bioquímica de los ácidos nucleicos de Davidson*. Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.

Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberd H, Mikoczy Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *ScienceDirect – International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 204(1). 43-47. doi: <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00071>.

Hernández, A.F., Amparo Gómez, M., Pérez, V., García-Lario, J.V., Pena, G., Gil, F., López, O., Rodrigo, L., Pino, G. & Plá, A. (2006). Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environmental Research*, 102(1), 70 – 76. Doi: 10.1016/j.envres.2006.03.002.

Hernández, I. Boluma, F. y Gil, A. (2005). *Concepto y funciones de la salud pública*, Manual de Epidemiología y Salud Pública. Ed. Panamericana 2005. <https://sintesis.med.uchile.cl/index.php/profesionales/informacion-para-profesionales/medicina/condiciones-clinicas2/otorrinolaringologia/745-7-01-3-001>.

Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. y Furlong, C.E. (1993). La base molecular del polimorfismo de la actividad de la paraoxonasa sérica humana. *Genética de la naturaleza*, 3(1), 73–76. doi:10.1038/ng0193-73.

Hurtado Clavijo, C.M. y Gutiérrez de Salazar, M. (2005). Enfoque del Paciente con Intoxicación Aguda por Plaguicidas Organofosforados. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional Colombia*, 53(4). 244 – 258. <https://www.redalyc.org/pdf/5763/576363931006.pdf>.

Iknurov Mollov, A., Martínez Ponce, D. C., Serrano Puebla, J., y Elías Salcedo, S. (2017). Exposición a pesticidas en el ámbito laboral, expresión genética y enfermedad de Parkinson. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 63(246), 68-84. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0465-546X2017000100068&lng=es&tlng=es.

Iniesta, R., Guinó, E. y Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Revista Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333 – 341. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112005000400011&lng=es&tlng=es.

Juste, I. (1 de marzo de 2022). Que es el medio ambiente: definición y resumen. *Ecología Verde*. Recuperado de: <https://www.ecologiaverde.com/que-es-el-medio-ambiente-definicion-y-resumen-1674.html>.

Kalmes, R., y Huret, J.L. (2021). *Modelo de Hardy-Weinberg*. Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología, recuperado de: <http://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30100/modelo-de-hardy-weinberg>.

Kim, K. H., Kabir, E., y Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525 - 535. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.

Larrea Poma, M., Tirado Bustillos, N., y Ascarrunz, M. E., (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *BIOFARBO*. 18(2). 31-43. Recuperado de: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632010000200004&script=sci_arttext.

Lazalde-Ramos, B.P., Zamora-Pérez, A.L., Sosa-Macías, M., Galaviz-Hernández, C. y Zúñiga-González, G.M. (2017). Micronúcleos y anomalías nucleares en la población indígena de México. *Salud Pública de México*, 59 (5), 532-539. Doi: <https://doi.org/10.21149/8318>.

Luna, A. (2019). *Implementación de técnicas Bioquímicas y Moleculares con fines forenses para la detección de manchas de sangre humana sometidas a factores ambientales, contaminantes y de tiempo*. [Tesis de licenciatura, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional Universidad Mayor de San Andrés: <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/25269>.

Majno, G. y Joris, I. (1995). Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, 146(1), 3 – 14. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1870771/pdf/amjpathol00049-0010.pdf>.

Marcela Delgado, L., Uribe Lastra, M., Marulanda Ángel, M.L. (2010). Estandarización de la Técnica Citogenética “SQUASH” para conteo de Cromosomas Mitóticos en *Rubus glaucus* Benth, *Scientia et Technica*, (46), 74-79. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84920977013.pdf>.

Márquez Llanos, D.C. (2015). *Caracterización de la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 (PON-1), en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados en el municipio de Soacha 2014*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional Universidad Nacional de Colombia: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53907/2015-05-19%20Informe%20final%20PON-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Matheus, T., Aular, Y., Bolaños, A., Fernández, Y., Barrios, E. y Hung, M-L. (2017). Actividad de butirilcolinesterasa y micronúcleos en trabajadores agrícolas expuestos a mezclas de plaguicidas. *Salud de los trabajadores*, 25(1), 23 – 36. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3758/375853771003.pdf>.

Martínez Fernández, R., Gasca Salas C., Sánchez Ferro, A. y Obeso, J.A. (2016). Actualización en la Enfermedad de Parkinson. *Revista Médica Clínica las Condes*, 27(3), 363 – 379. Doi: 10.1016/j.rmclc.2016.06.010.

Martínez Valenzuela, C., y Gómez Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000400004&lng=es&tlng=es.

Mejía García, D.D. (2019). Elevación de las transaminasas por causas extrahepáticas en pacientes del Hospital Central de las Fuerzas Armadas, agosto 2018 – Marzo 2019. [tesis de especialidad en gastroenterología, Universidad Nacional Pedro Enríquez Ureña]. Repositorio: <https://repositorio.unphu.edu.do/handle/123456789/2271>

Miranda Adad. L.M., Rodrigues de Andrade. H.H., Kvitko, K., Lehmann, M., Carvalho Melo Cavalcante, A.A. y Rodrigues Dihl, R. (2015). Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Biology*. 38(3). 308-315. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738320140336>.

Mohammed, C.J., Lamichhane, S., Connolly, J.A., Soehlen, S.M., Khalaf, F.K., Malhotra, D., Haller, S.T., Isailovic, & Kennedy D.J. (2022). A PON for All Seasons: Comparing Paraoxonase Enzyme Substrates, Activity and Action including the Role of PON3 in Health and Disease. *Antioxidants* 2022, 11(3), 590

Morales, C.A., Rodríguez, N., (2004). El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(3). 255 – 266. Recuperado de: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/Dialnet-ElClorpirifosPosibleDisruptorEndocrinoEnBovinosDeL-3241308.pdf>.

Muñoz-Arteaga, K.V., Pesamtez-Guzman, J.D., Valero-Cedeño, N.J. y Lino-Villacreses, W. (2021). Valoración de las transaminasas en Adultos Mayores. *Revista Científica Ciencias de la salud*, 7(3), 642 – 655. Recuperado de: <file:///C:/Users/59177/Downloads/Dialnet-ValoracionDeLasTransaminasasEnAdultosMayores-8229706.pdf>.

Navarrete Vera, J.L. (2019). Biomarcadores de afección hepática en trabajadores expuestos a plaguicidas. [Tesis de especialidad, Universidad Internacional del Ecuador] Repositorio UIDE. <https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/4078/1/T-UIDE-2290.pdf>.

National Pesticide Information Center, (2015). *Ingredientes activos en plaguicidas*. Recuperado en: <http://npic.orst.edu/ingred/active.es.html>.

Nelson, D.L. y Cox, M.M., (2009). Principios de Bioquímica (quinta edición). Ediciones Omega.

Núñez Figueroa L.J., Ramos Ibarra M. L., Zalapa Hernández S. S., Guerrero Vázquez S., Zavala Cerna M. G. y Torres Bugarín O. (s.f.). Los Murciélagos como Posibles Bioindicadores de Genotóxicos Medioambientales Mediante la Prueba de Micronúcleos. Recuperado de: http://congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion4/S4-MCS34.pdf.

Orias Vásquez, M. (2020). Intoxicación por organofosforados. *Revista Médica Sinergia*, 5(8), DOI: <https://doi.org/10.31434/rms.v5i8.558>.

Pampalona J., Frías C, Genescà A., Tusell L. (2012). Progressive Telomere Dysfunction Causes Cytokinesis Failure and Leads to the Accumulation of Polyploid Cells. *PLOS Genetics* 8(4): e1002679. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002679>.

Pastor Benito, S. (2002). *Biomonitorización Citogenética de Cuatro Poblaciones Agrícolas Europeas, Expuestas a Plaguicidas, Mediante el Ensayo de Micronúcleos*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/3858/spb1de5.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M.J., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., Alvarado-Mejía, J., Borja-Aburto, V.H. & Quintanilla-Vega, B. (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*, 230(2), 261 – 268. Doi: 10.1016/j.taap.2008.02.021.

Sánchez Chávez, G., Salcedo, R., (2008). Enzimas Polifuncionales: El Caso de la Acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44 – 51. Recuperado en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb082b.pdf>.

Responsabilidad Social Empresarial y Sustentabilidad (2022). *Cambio Climático: que es, definición, causas, efectos, consecuencias y combate*. Recuperado en: https://www.responsabilidadsocial.net/cambio-climatico-que-es-definicion-causas-efectos-consecuencias-y-combate/?amp#Definicion_del_Cambio_Climatico.

Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. y Marques, E.K. (Ed.) (2003). *Mutagênese Ambiental*. Rio grande do Sul, Brasil. Editora da Ulbra.

Ríos B, J.C. y Solari G, S. (2010). Biomonitorización de plaguicidas: ¿Una necesidad del país? *Revista médica de Chile*, 138(4), 515-518. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010000400019>.

Rodríguez Esparragón, F., Hernández Trujillo, Y., Macías Reyes, A., Hernández Ortega, E., Medina, A. y Rodríguez Pérez, J.C. (2006). Sobre los genes paraoxonasa-1 y SR-B1, y su importancia en la aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología*, 59(2), 154 – 164. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-pdf-13084643>.

Saad-Hussein, A., Beshir, S., Taha, M. M., Shahy, E. M., Shaheen, W., Abdel-Shafy, E. A., & Thabet, E. (2019). Early prediction of liver carcinogenicity due to occupational exposure to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.004>.

Saad-Hussein, A., Noshay, M., Taha, M., El-Shorbagy., H. Shahy, E., y Abdel-Shafy, E. (2017). GSTP1 and XRCC1 polymorphisms and DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides. *ScienceDirect – Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmentl Mutagenesis*. 819. 20-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.005>.

Sal&Roca (2022, 14 de abril). *Así afectan los plaguicidas al medio ambiente y sus consecuencias sobre el agua*. Disponible en: <https://www.salyroca.es/articulo/lyfestyle/asi-afectan-plaguicidas-medio-ambiente-consecuencias-agua/20180322140257004599.html>.

Salas Arias, J.R. (2018). *Comparación de Cuatro Tinciones para el Recuento de Micronúcleos en Células Bucales de Estudiantes de la EPTM-UAP, Diciembre, 2017*. [Tesis de licenciatura. Universidad Alas Peruanas, Ica, Perú].

Salazar Montes, A.M., Sandoval Rodríguez, A.S. y Armendáriz Borunda, J.S. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (primera edición). McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A. de C. V. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1473#102741605>.

Sánchez Arias, A. G., Bobadilla Serrano, M. E., Bárbara Dimas Altamirano, B., Gómez-Ortega, M. y González González, G. (2016). Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel. *Revista Mexicana de Cardiología*, 27(3), 98 – 102. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cardio/h-2016/hs163a.pdf>.

Sánchez Valle, V. y Méndez Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica sur México*, 20(3), 161 – 168. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>

Sarabia Nuñez, C., Negrón Ballarte, L., Meléndez Serrano, M., Pérez González, R. (1998). Estudio Bioquímico- Clínico en Personas Ocupacionalmente Expuestas a la Acción de Agroquímicos y Efectos de su Uso Frecuente Sobre la Salud. *Ciencia e Investigación* 1(1). Recuperado de: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/4742/3815>.

Serrato, M. y Marian, A.J. (1995). A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 3005 – 3008. Disponible en: <https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/118000/118373/cache/118373.1-20201218131531-covered-e0fd13ba177f913fd3156f593ead4cfd.pdf>.

Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B.D., Singh Rautela, R., Sunder Grover, S., Singh Rawat, D., Tazeen Pasha, S., Kumar Jain, S., y Rai, A. (2011). Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *ScienceDirect – Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 725(1-2). 36-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.06.006>.

Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Singh Rautela, R., Sunder Grover, S., Singh Rawat, D., Tazeen Pasha, S., Kumar Jain, S., Lal Ichhpujani, R., y Rai, A. (2011). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *ScienceDirect – Toxicology and Applied Pharmacology*. 252(2). 130 – 137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.014>.

Squier, C.A. y Kremer, M.J. (2001). Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, (29), 7–15. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443.

Taborga Manrique, X., Quispe Aruhuito, R., Larrea Poma, M.M., Farfán Ochoa, P., y Revollo Zepita, S. (2016). Presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral en personas expuestas a agentes genotóxicos. *Revista CON-CIENCIA*. 4(2). 35-44. Recuperado de: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652016000200004&lng=es&nrm=iso.

Trenk, D., Hochholzer, W., Fromm, M.F., Zolk, O., Valina, C.M., Stratz, C. y Neumann, F.J. (2011). Polimorfismo de paraoxonasa-1 Q192R y efectos antiplaquetarios de clopidogrel en pacientes sometidos a colocación electiva de stent coronario. *Circulación: Genética cardiovascular*, 4(4), 429–436. Doi: 10.1161/circgenetics.111.960112.

Tirado Bustillos, N.S. (2008). Polimorfismos Genéticos de la GSTM1 y la GSTT1 Como Modificadores de Riesgo Mutagénico en Agricultores Expuestos a Plaguicidas. [Tesis de maestría. Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional Universidad Mayor de San Andrés. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/18163>.

Tirado Bustillos, N.S. (2010). *Evaluación de Riesgo Genotóxico y Susceptibilidad Genética en Agricultores Expuestos a Plaguicidas de Sapahaqui y Luribay* (Concurso Proyecto IDH 2007). Universidad Mayor de San Andrés – Facultad de medicina – Instituto de Genética – Unidad de Genética Toxicológica, Bolivia.

Tirado Bustillos, N., Ascarrunz G., M E., Aguilar M., X., y Rada T., A. (2012). Polimorfismos genéticos de la GSTM1 y GSTT1 como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas. *BIOFARBO* 20(1). 30-40. Recuperado de: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632012000100004&lng=es&nrm=iso.

Tinción, (2 de abril 2022). En *Wikipedia*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n>.

Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T. y Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 638(1-2), 37–47. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.08.012.

Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Siegfried Knasmueller, S., y Fenech, M. (2009). Ensayo del citoma del micronúcleo bucal. *Protocolos de la Naturaleza*, 4(6), 825–837. doi:10.1038/nprot.2009.53.

Tonina, E., Garcete, T., Samaniego, M.J., Aveiro, R., Aranda, A., Ortiz, J., Thielmann, B., Segovia, J., Castiglioni, D. y Franco de Diana, D. (2017). Anomalías Nucleares en Células Exfoliadas de la Mucosa Bucal de Estudiantes Fumadores, *Revista CIMEL: Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericano*, 22(1), 46 – 49. Recuperado de: file:///C:/Users/59177/Downloads/742-1690-3-10-20170405.pdf.

Torres Bugarín, O., y Ramos Ibarra, M.L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650-657. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>.

Torrico Arzadi, B.N. (2006). *Manual Teórico Práctico para la Implementación y Utilización en un Laboratorio de Genética Forense. Identificación Genética y Pruebas de Paternidad* [Tesis de especialidad. Universidad Mayor de San Andrés] La Paz, Bolivia.

Veas-Pérez de Tudela Rodríguez, M. (2015). Función del complejo Cdk1 – ciclina B1 en la excitotoxicidad. [Tesis de Doctorado, Universidad de Salamanca]. Recuperado de: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/157521/1/ciclinab1.pdf>.

Viales López, G. (2014). Intoxicación por Paraquat. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 88-94. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200009&lng=en&tlng=es.

Walker, CH. (1998). The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 40(1-2), 65–70. doi:10.1006/eesa.1998.1643.

Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., y Patiño, A. (2005). La prueba de micronúcleos como medida de la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema de Salud de Navarra*, 28 (2), 227-236. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300007&lng=es&tlng=es.

Zamorano Vásquez, C. (2014). Método de Feulgen y Rossenberg [Blog spot]. Tecnología médica. Recuperado de: <http://morfoudec.blogspot.com/2008/10/mtodo-de-feulgen-y-rossenberg-1921.html>.

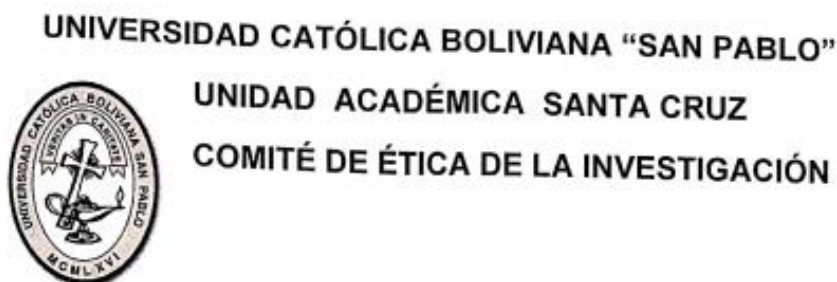
Zamzami, N., y Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death. *Nature*, 401(6749), 127–128. doi:10.1038/43591.

Zepeda Jazo, I. (2018). Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 15(1), 99-108. Recuperado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722018000100099&lng=es&tlng=es.

Zúñiga Gonzales, G.M. y Gómez Meda, B.C. (2006). La prueba de micronúcleos. *Revista de divulgación científica y tecnología de la universidad veracruzana*, 19(1). Recuperado de: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num1/articulos/micronucleos/index.htm>.

12. ANEXOS

Anexo 1: Aval ético otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad Católica Boliviana “San Pablo” Unidad académica Santa Cruz con el código de protocolo # 025 del 9 de diciembre del 2019.



**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN, CEI,
CON REFERENCIA A PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.**

Corresponden al **COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA BOLIVIANA SAN PABLO, UNIDAD ACADÉMICA SANTA CRUZ, (CEI)** dentro de su ámbito de competencias:

Emitir los informes solicitados por instituciones e investigadores sobre proyectos o trabajos de investigación que impliquen estudios en seres humanos, utilización de sus datos personales o de muestras biológicas de origen humano.

Valorar cualquier otro proyecto de investigación que pueda afectar de modo directo a los derechos fundamentales de las personas, y a los intereses vinculados a la defensa y protección del medio ambiente.

Velar por el cumplimiento de las buenas prácticas de investigación y experimentación, en relación con los derechos e intereses a los que se refiere el apartado anterior.

En virtud a las mencionadas funciones, luego que los miembros del CEI realizaron el análisis y valoración pertinentes al protocolo de investigación presentado y habiéndose hecho las correcciones a las observaciones realizadas, el suscrito Coordinador del Comité de Ética de la Investigación y el Secretario:

CERTIFICAN:

Que este Comité, actuando en calidad de CEI, ha evaluado el siguiente **PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:**

Código de protocolo: 025

Fecha del protocolo: 24 de abril del 2019

Fecha de presentación: 20 de agosto del 2019

Fecha de presentación con correcciones: 4 de diciembre del 2019

Título de la investigación:

"BIOMONITORIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS DE CUATRO ZONAS AGROECOLÓGICAS DE SANTA CRUZ"

Equipo de investigación:

Universidad Católica Boliviana San Pablo: Rosa Bautista, Luis Adolfo Mercado.
GTCC-J Regional Santa Cruz: Adriana Montero, Sheyla Martínez, Ana Rosa Angulo.

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Instituto de Investigación de la Facultad de Humanidades: Mercedes Nostas.

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Laboratorio académico e investigación de Ingeniería Ambiental: Isabel Magne Salazar, José María Garrido, Erika Almanza Zambrana, Alejandra N. Bazán Mercado, Jaime García, Milton Benedicto Severiche.

Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Genética: Noemí Tirado

Universidad de Lund, Suecia: Christian Lindh, Karin Wahlberg

Se toma en consideración las siguientes cuestiones:

La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta las normas del Comité de Ética de la Investigación.

Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, respeto a la dignidad de las personas a ser investigadas, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos, el plan de reclutamiento de sujetos y las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Este Comité, habiendo tenido en cuenta los informes recibidos de los miembros

del CEI implicados y luego de haberse constatado las correcciones a las observaciones presentadas en el protocolo y el consentimiento informado, emite un **DICTAMEN FAVORABLE**, para la realización de dicho estudio de investigación en las comunidades rurales referidas y en el Hospital y laboratorio que ha sido mencionado en el estudio y que hayan sido aceptados con el informe pertinente.

El tiempo de validez de esta autorización es de duración de un año calendario, a partir de la fecha de la presente aprobación, pudiendo ser renovado de acuerdo a estatuto. Los investigadores deben presentar un informe sobre el avance de la investigación. En caso de cambios estructurales o de procedimientos en el estudio, el CEI deberá ser informado inmediatamente, bajo pena de invalidación de la presente aprobación.

Es dado en Santa Cruz de la Sierra, el 9 de diciembre del 2019


Fernando Cabrero PhD

SECRETARIO


Jorge Ybarregaray Urquidi PhD

COORDINADOR

Anexo 2: Hoja de consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

BIOMONITORIZACIÓN DE LA EXPOSICION A PLAGUICIDAS EN TRABAJADORES AGRICOLAS DE CUATRO ZONAS AGROECOLOGICAS DE SANTA CRUZ

Código

Yo.....Con CI.....

Dirección.....

Municipio.....

Después de haber leído y haberme informado del estudio que están realizando la Universidad Católica Boliviana San Pablo, GTCC-J Regional Santa Cruz, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno (Instituto de investigación facultad de humanidades, , laboratorio académico de investigación de Ingeniería Ambiental y el Instituto de Genética (IG) de la Universidad Mayor de San Andrés, para evaluar mis estados de salud y de nutrición, acepto participar y seguir los pasos del estudio. Entiendo que mi participación es voluntaria y tengo el derecho de retirarme en cualquier momento del estudio.

Firma del participante

Firma de uno de los investigadores

Firma del encargado de la encuesta y del muestreo

Anexo 3: Encuesta realizada a los participantes.

CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO TRABAJADORES AGRÍCOLAS

Código:	
Entrevistador/a:	

Cuestionario General

(toda la información se refiere a las últimas 2-3 semanas salvo que se especifique lo contrario)

A. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS	
1. ¿Cuándo nació?	
Día, mes, año: ___/___/___	Edad:
2. ¿Dónde vive?	
Localidad:	Teléfono:
3. ¿Cuánto tiempo lleva viviendo en ese lugar?	
años	
4. ¿Está su residencia próxima a una zona con actividad agrícola? (propia o ajena)	
1. Sí	
2. No (Ir a la pregunta 6)	
999. NS/NC (Ir a la pregunta 6)	
5. ¿A qué distancia aproximadamente (en m)?	

B. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

(es muy importante recoger el peso y la altura)

6. ¿Cuánto mide?

Cm

7. ¿Cuánto pesa?

Kg

8A ¿Cree que ha perdido peso en el último mes?

1. Sí

2. No

999. NS/NC

8B ¿Cree que ha ganado peso en el último mes?

1. Sí

2. No

999. NS/NC

9. ¿Cuánto?

999. NS/NC

10. ¿Cuál cree que ha sido la causa de la pérdida o aumento de peso?

C. CONDICIONES DE SALUD		
11. ¿Ha tenido alguna de las enfermedades siguientes a lo largo de su vida?		
1. Hipertensión	1. Sí	0. No
2. Artritis	1. Sí	0. No
3. Alergias	1. Sí	0. No
4. Diabetes	1. Sí	0. No
5. Úlcera gastrointestinal	1. Sí	0. No
6. Cataratas	1. Sí	0. No
7. Afección cutánea	1. Sí	0. No
8. Embolia	1. Sí	0. No
9. Afección cardíaca	1. Sí	0. No
10. Asma	1. Sí	0. No
11. Afección tracto urinario	1. Sí	0. No
12. Estreñimiento	1. Sí	0. No
13. Varices	1. Sí	0. No
14. Bronquitis crónica	1. Sí	0. No
15. Hipercolesterolemia	1. Sí	0. No
16. Depresión, Ansiedad	1. Sí	0. No
17. Enfermedad tiroidea	1. Sí	0. No
18. Cáncer	1. Sí	0. No
19. ¿Cáncer en la familia?	1. Sí	0. No
20. Si la respuesta es Sí, especificar	O Padre O Madre O hermanos O hijos O abuelo O abuela	
21. Otras: (especificar cuál)	1. Sí	0. No
D. HISTORIA REPRODUCTIVA		

12. ¿Cuántos hijos tiene?	
13. ¿Han tenido sus hijos algún problema de salud al nacer?	
1. Sí	
2. No	
999. NS/NC	
14. En caso afirmativo, ¿podría especificar de qué tipo?	
D. ESTILOS DE VIDA	
15. ¿Fuma usted actualmente?	
1. Sí	
2. No	
999. NS/NC	
16. En caso afirmativo, ¿cuántos cigarrillos al día o a la semana?	
17. ¿Podría decirme qué cantidad de las bebidas siguientes suele consumir a la semana?	
18. Cerveza (botellas)	
nº _____ bebidas a la semana	999. NS/NC

19. Vino (botellas)	nº _____ bebidas a la semana	999. NS/NC
20. otros licores	nº _____ bebidas a la semana	999. NS/NC
E. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA DIETA (últimas 2-3 semanas)		
21. ¿Qué tipo de agua bebe?	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agua del grifo 2. Agua de pozo 3. Agua de vertiente o río 4. Agua mineral 5. Todas 	
	999. NS/NC	
22. ¿En la comunidad cuál es la fuente de agua que se distribuye?	<ol style="list-style-type: none"> 1. vertiente o río 2. De un pozo 3. llega en cisternas 	
23. ¿Cuánta agua bebe?	vasos/día	
24. ¿Cuántas raciones de pescado consume al día o a la semana?		
	999. NS/NC	

<p>25. ¿Qué tipo de pescado consume mas frecuentemente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pescado de criadero 2. Pescado de ríos de la zona en la que vive 3. Pescado enlatado 4. Indistintamente 5. NS/NC
<p>26. ¿Cuántas raciones de productos lácteos consume al día o a la semana? (sin incluir queso ni leche) (1 ración=1 unidad, yogur, flan...)</p> <p>999. NS/NC</p>
<p>27. ¿Qué tipo de leche consume habitualmente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Leche de proveedor local obtenida por ordeño tradicional 2. Entera (PIL, Del Campo, etc...) 2. Semidesnatada (PIL, Del Campo, etc...) 3. Desnatada (PIL, Del Campo, etc...) 4. Deslactosada <p>999. NS/NC</p>
<p>28. ¿Cuánta leche toma al día?</p> <p style="text-align: right;">vasos/día</p>
<p>29. ¿Cuánto de queso consume en g/día o en g/semana?</p> <p>999. NS/NC</p>

<p>30. ¿Qué tipo de queso consume mas frecuentemente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Queso criollo 2. Queso fresco industrial (PIL u otra marca) 3. Quesillo 4. Cuajadilla 4. Indistintamente <p>999. NS/NC</p>		
<p>31. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal consume (chorizos, mortadelas, jamón, morcillas, etc,)</p> <p>999. NS/NC</p>		
<p>32. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal come carne?</p> <p>999. NS/NC</p>		
<p>33. ¿En promedio cuánto de carne consume?</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center; width: 50%;">g/día</td> <td style="text-align: center; width: 50%;">g/semana</td> </tr> </table> <p>999. NS/NC</p>	g/día	g/semana
g/día	g/semana	
<p>34. ¿Qué tipo de carne consume más frecuentemente? (marque con xxx la de mayor frecuencia, con xx la que le sigue y con x la poco frecuente)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pollo 2. Cerdo 3. Vacuno 4. Ovino 5. Caprino 6. Del monte 7. Indistintamente 8. Otros <p>999. NS/NC</p>		

<p>35. ¿Consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Mantequilla2. Margarina3. Indistintamente4. Nunca <p>999. NS/NC</p>
<p>36. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal consume mantequilla y/o margarina?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Diaria2. Dos veces por semana3. Tres veces por semana <p>999. NS/NC</p>
<p>37. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal come legumbres? (lentejas, frejol, garbanzos)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Diaria2. Dos veces por semana3. Tres veces por semana <p>999. NS/NC</p>
<p>38. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal come verduras o vegetales?</p> <ol style="list-style-type: none">1. Diaria2. Dos veces por semana3. Tres veces por semana <p>999. NS/NC</p>
<p>39. ¿Cuántas unidades de fruta come al día o a la semana?</p> <p>999. NS/NC</p>
<p>40. ¿Cuántos huevos come al día o a la semana? (fritos, en tortila, cocidos...)</p> <p>999. NS/NC</p>

41. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal come pan?

1. Diaria
2. Dos veces por semana
3. Tres veces por semana

999. NS/NC

42. ¿Con qué frecuencia diaria o semanal consume tallarines o fideos? (macarrones, espaguetis)

1. Diaria
2. Dos veces por semana
3. Tres veces por semana

999. NS/NC

F. HIGIENE Y SEGURIDAD LABORAL

43. ¿Ingiere alimentos antes de empezar la jornada de trabajo?

1. Sí
2. No

999. NS/NC

44. ¿A qué hora empieza la jornada de trabajo?

45. ¿Usa equipo de protección (mascarilla, overol o impermeable, botas, guantes, etc.) para trabajar?

1. Si
2. No (ir a la pregunta 46)

999. NS/NC

Si la respuesta es Si, indique que equipos de protección utiliza:

Overol

Botas

Mascarilla

Gafas

46. ¿Por qué no usa el equipo de protección?

1. No tiene
2. Es incómodo
3. Otras razones

999. NS/NC

47. ¿Durante cuanto tiempo realiza la aplicación?

48. ¿Mastica coca mientras realiza la aplicación de plaguicidas?

1. Si
2. No

999. NS/NC

<p>49. ¿Fuma mientras realiza la aplicación de plaguicidas?</p> <p>1. Si</p> <p>2. No</p> <p>999. NS/NC</p>
<p>50. ¿Al terminar la jornada de trabajo realiza su aseo personal?</p> <p>1. Si</p> <p>2. No</p> <p>999. NS/NC</p>
<p>51. Al concluir su trabajo ¿Lava su equipo de protección personal a indumentaria utilizada?</p> <p>1. Si</p> <p>2. No</p> <p>999. NS/NC</p>
<p>51. ¿Dónde dispone los residuos de los plaguicidas?</p>
<p>53. ¿Dónde lava el equipo de fumigación?</p>
<p>54. ¿Cuándo fue la última vez que trabajó en la manipulación o rociado de plaguicida?</p> <p>Hace..... días</p> <p>Que operación hizo?</p> <p>O preparación O Rociado O lavado del equipo O outro (especificar)</p>

<p>55. ¿Alguna vez se há sentido enfermo después de fumigar?</p> <p>1. Si 0. No</p>
<p>56. ¿presentó alguno de los siguientes sintomas despues de fumigar?</p> <p>Neurológico/Muscular:</p> <p><input type="checkbox"/> Dolor de cabeza <input type="checkbox"/> Mareos <input type="checkbox"/> Escalofríos <input type="checkbox"/> Temblores <input type="checkbox"/> Nerviosismo <input type="checkbox"/> Insomnio <input type="checkbox"/> Disminución de la conciencia <input type="checkbox"/> Desmayo</p> <p><input type="checkbox"/> Fasciculaciones <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> Debilidad muscular <input type="checkbox"/> Adormecimientos</p> <p><input type="checkbox"/> Parálisis <input type="checkbox"/> Contracciones</p> <p>Digestivo:</p> <p><input type="checkbox"/> Nauseas <input type="checkbox"/> Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Vómitos <input type="checkbox"/> Diarrea <input type="checkbox"/> Estreñimiento <input type="checkbox"/> Exceso de saliva</p> <p>Piel y mucosas:</p> <p><input type="checkbox"/> Lagrimeo <input type="checkbox"/> Escozor <input type="checkbox"/> Exceso de sudor <input type="checkbox"/> Erupciones <input type="checkbox"/> Ulceras <input type="checkbox"/> Rinorrea <input type="checkbox"/> Ardor y enrojecimiento de la piel/mucosa</p> <p>Cardiorrespiratorio:</p> <p><input type="checkbox"/> Dificultad para respirar <input type="checkbox"/> Tos <input type="checkbox"/> Dolor en el pecho <input type="checkbox"/> Palpitaciones</p> <p>Ocular:</p> <p><input type="checkbox"/> Ojos rojos <input type="checkbox"/> Visión borrosa <input type="checkbox"/> Ardor en ojos <input type="checkbox"/> Tics en los párpados</p>
<p>57. ¿Fue a consultar al médico?0</p> <p>1. Si 0. No</p>
<p>58. ¿Necesitó hospitalización?</p> <p>1. Si 0. No</p>
<p>59. ¿Cómo evita que los plaguicidas afecten a su salud?</p>

HA LLEGADO AL FINAL

¡ GRACIAS POR SU COLABORACIÓN !

INFORMACIÓN PERSONAL

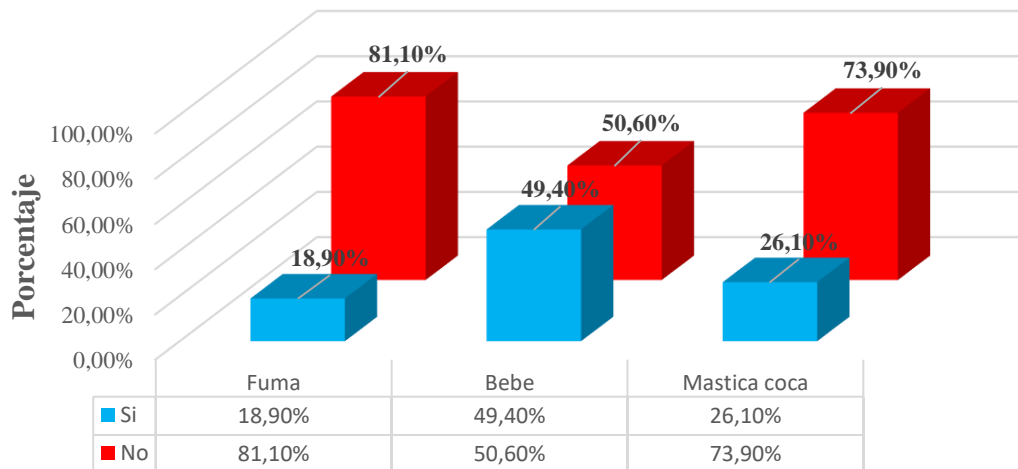
Código: _____

1er Apellido: _____

2º Apellido: _____

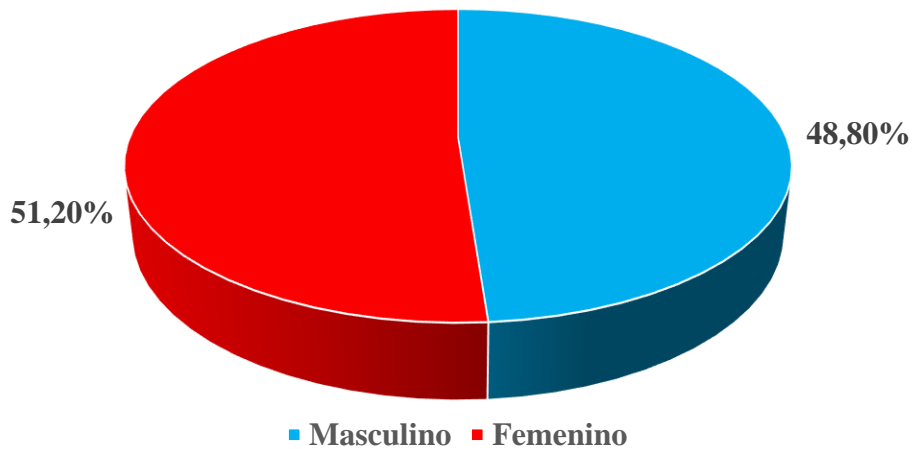
Nombre: _____

Anexo 4: Distribución de la población en estudio que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.



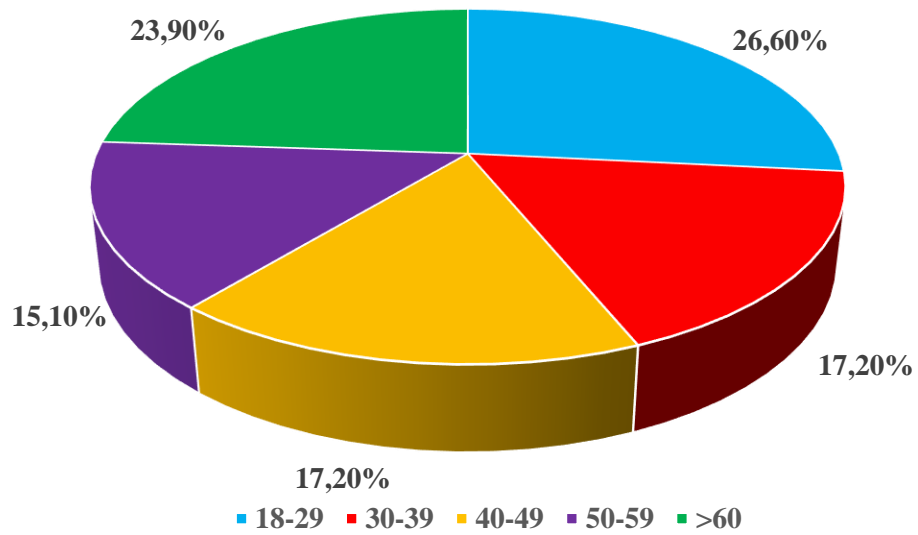
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 5: Distribución según el sexo.



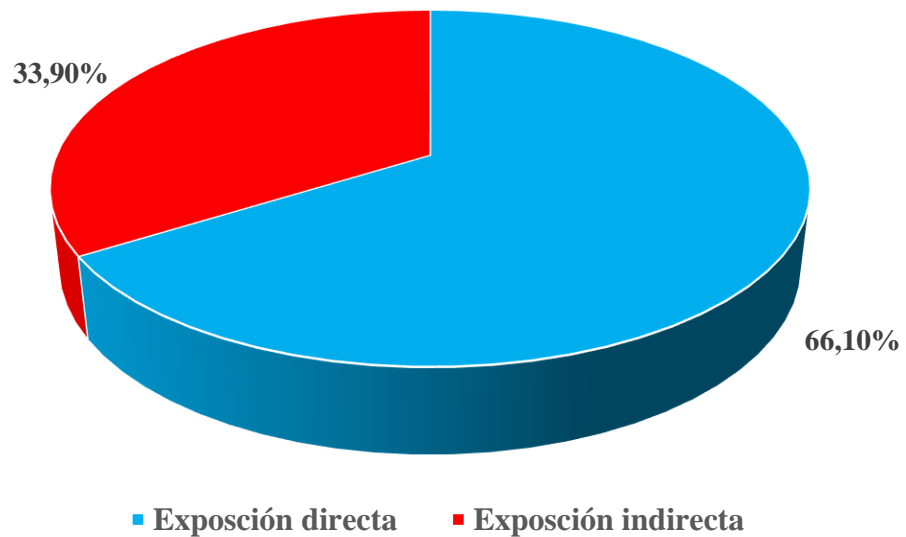
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 6: Distribución según intervalos de edad.



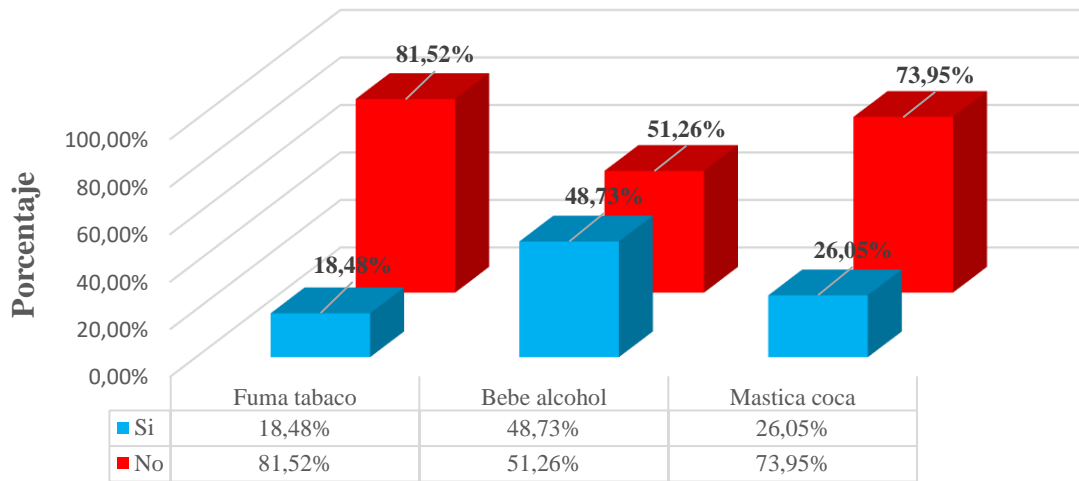
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 7: Porcentaje de exposición directa o indirecta a plaguicidas.



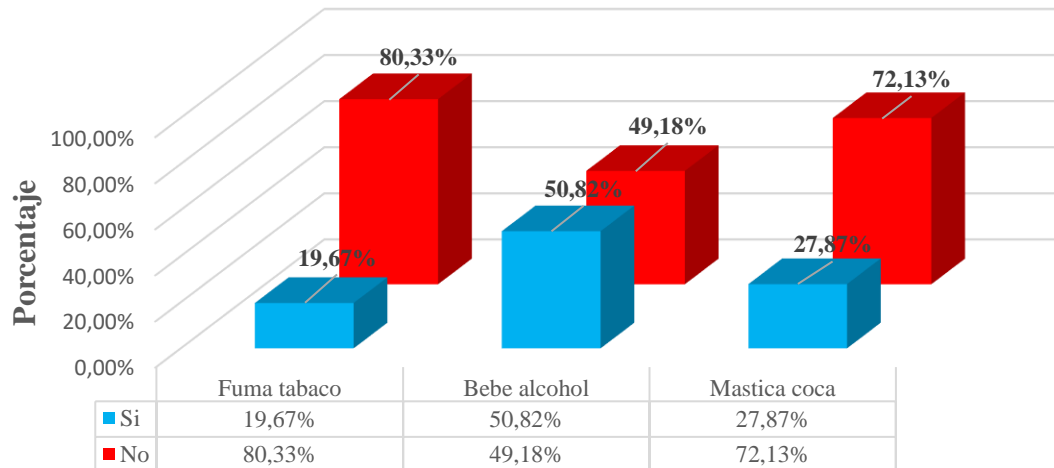
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 8: Distribución de la población en estudio con exposición directa a plaguicidas que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.



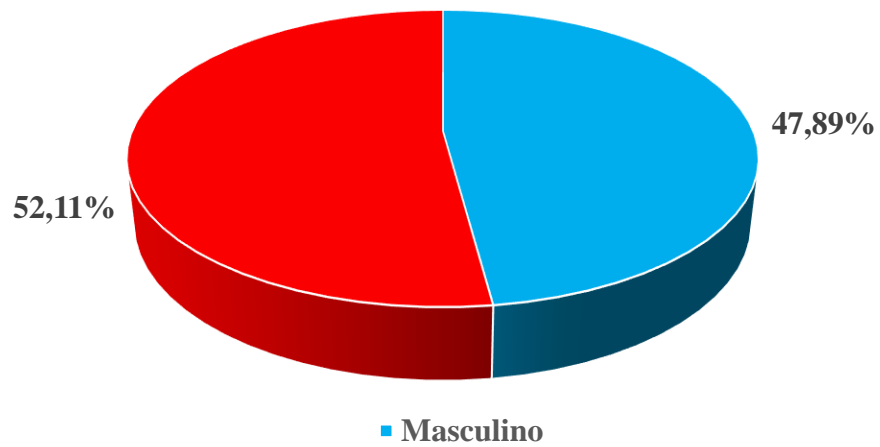
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 9: Distribución de la población en estudio con exposición indirecta a plaguicidas que tienen o no el hábito de fumar tabaco, beber alcohol o masticar la hoja de coca.



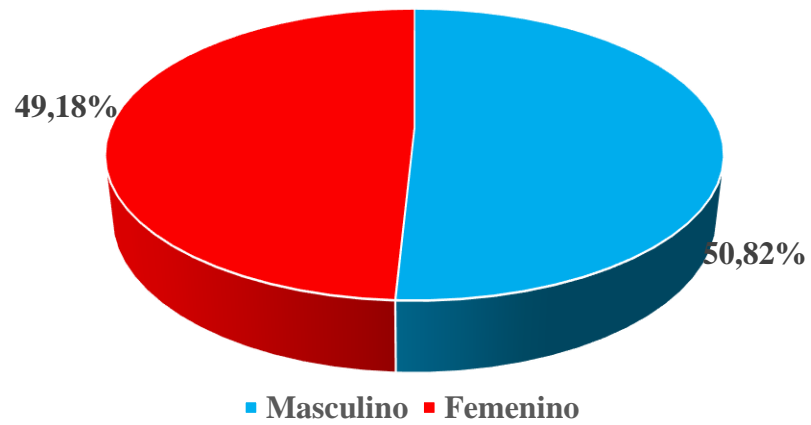
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 10: Distribución según el sexo con exposición directa a plaguicidas.



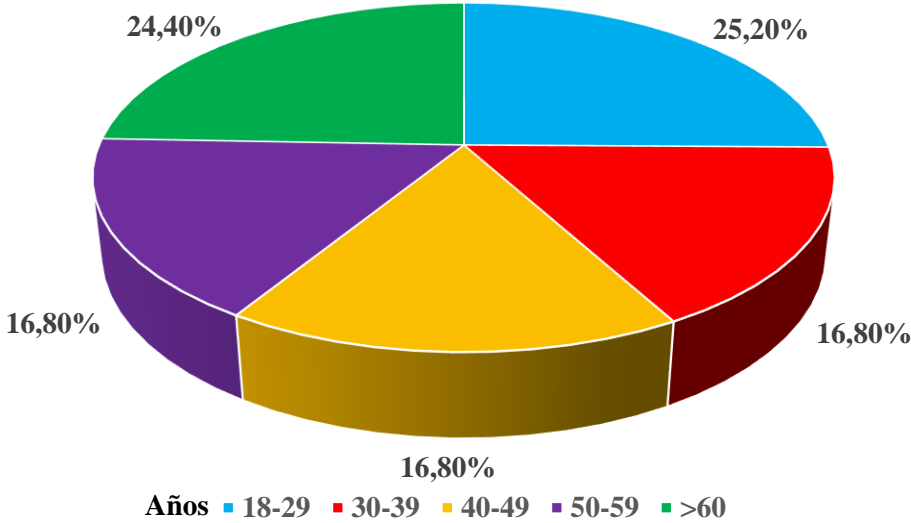
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 11: Distribución según el sexo con exposición indirecta a plaguicidas.



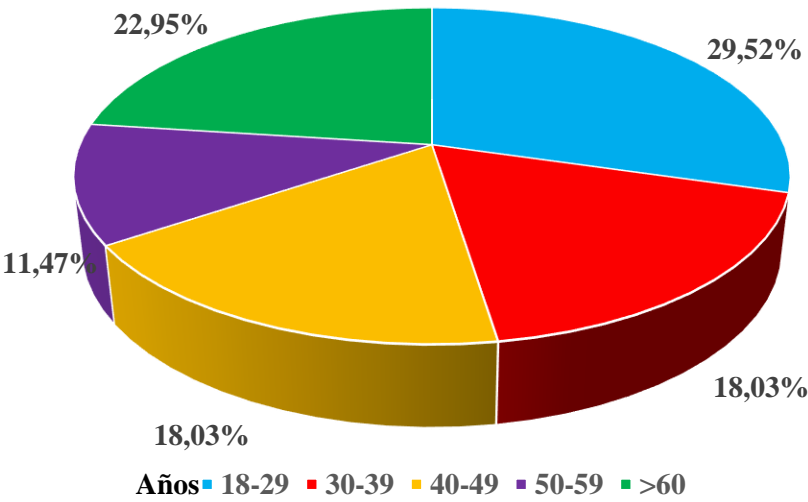
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 12: Distribución según intervalos de edad con exposición directa a plaguicidas.



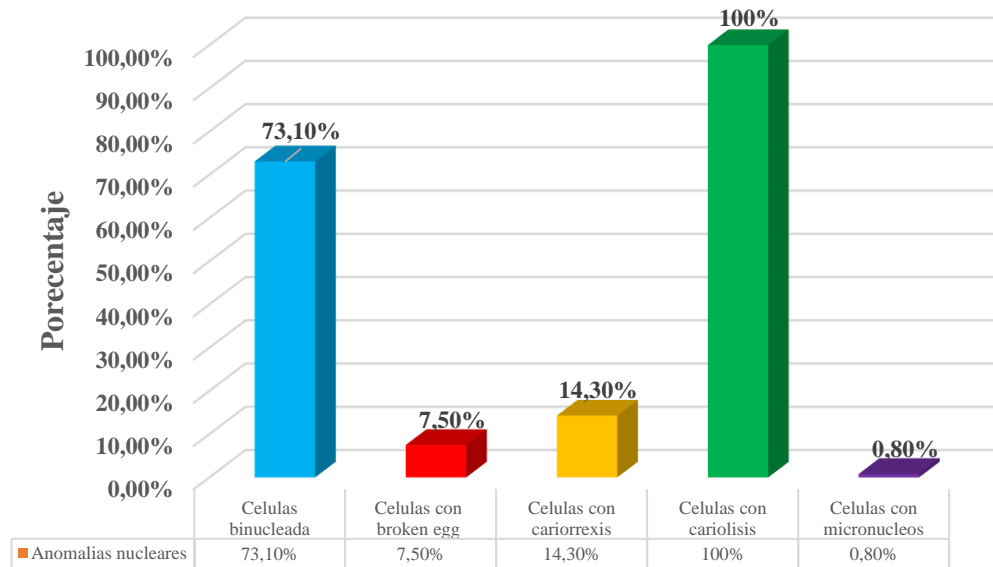
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 13: Distribución según intervalos de edad con exposición indirecta a plaguicidas.



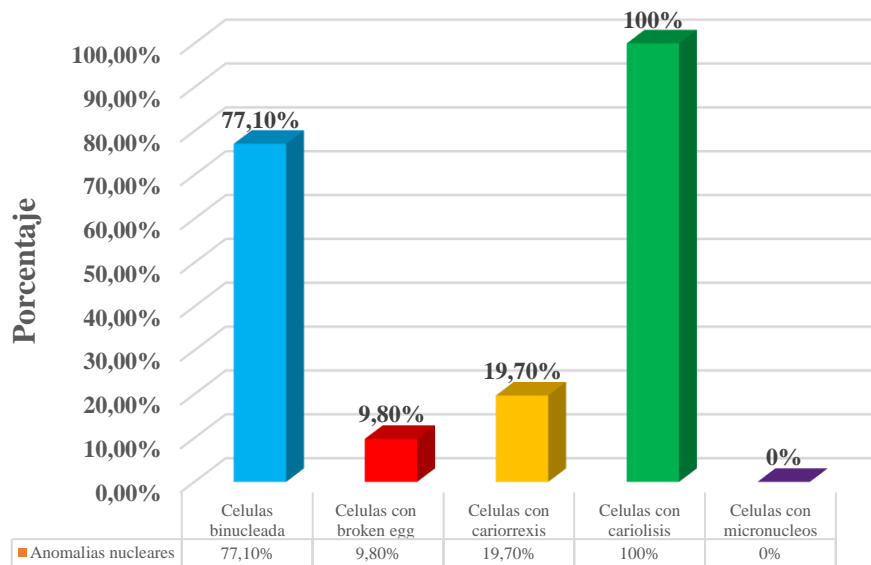
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 14: Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio con exposición directa.



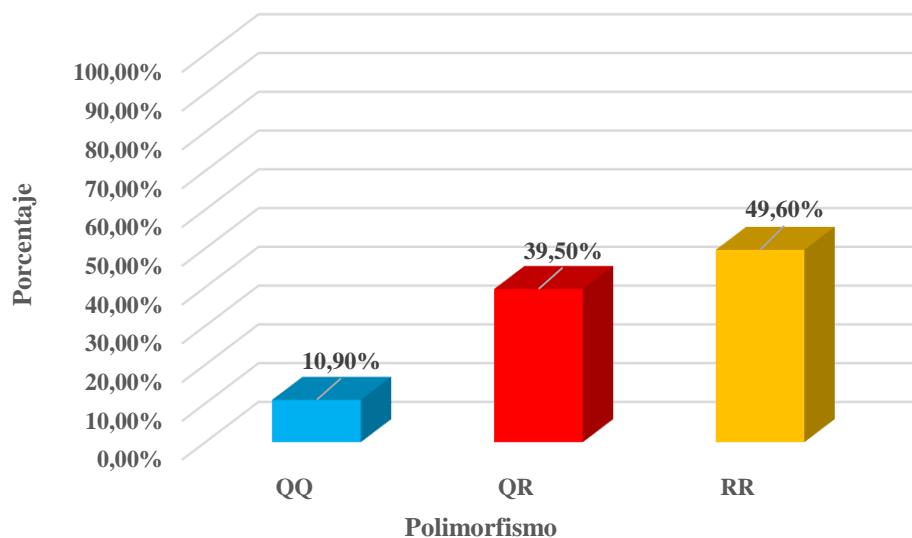
Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 15: Frecuencia de células con anomalías nucleares contadas en la población de estudio con exposición indirecta.



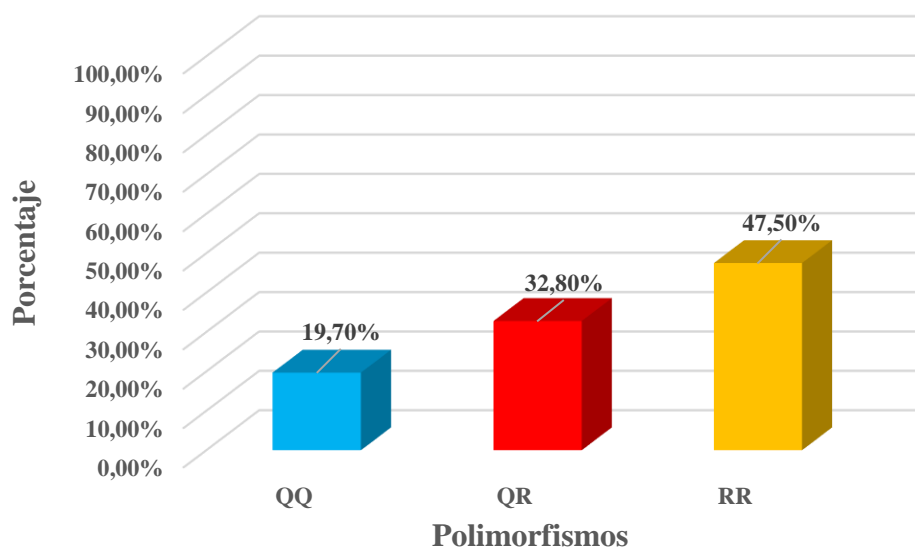
Fuente: Elaboración propia (2022)

Anexo 16: Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio con exposición directa a plaguicidas.



Fuente: Elaboración propia (2022).

Anexo 17: Frecuencia del polimorfismo genético PON1 (Q192R) en la población de estudio con exposición indirecta a plaguicidas.



Fuente: Elaboración propia (2022).