

Actividad de butirilcolinesterasa y micronúcleos en trabajadores agrícolas expuestos a mezclas de plaguicidas.

Butyrylcholinesterase activity and micronuclei in agricultural workers exposed to pesticide mixtures.

Tibisay Matheus^{1,2}, Yalitz Aular^{2,3}, Alba Bolaños^{1,4}, Yolima Fernández^{2,3,5}, Emilia Barrios⁶ & Mai-Lyng Hung³

Resumen

Los plaguicidas son xenobióticos de gran utilidad para el control de las plagas y su uso es una realidad para obtener mayor rendimiento en los cultivos. Sin embargo, tienen el riesgo de producir toxicidad, por lo que es necesario el monitoreo biológico de los trabajadores expuestos a estas sustancias. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de la butirilcolinesterasa (BCh) y la presencia de micronúcleos (MN) en trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas en el municipio Urdaneta, estado Lara. Participaron 82 individuos de sexo masculino, 41 expuestos (GE) y 41 no expuestos (GNE), la determinación de la butirilcolinesterasa se realizó en muestras de sangre, y la de micronúcleos en muestras epiteliales de la mucosa bucal. Los resultados fueron presentados empleando estadísticos descriptivos, frecuencias absolutas y porcentajes, utilizando el paquete libre PAST v.2.04. Los valores de actividad de BCh en el GE (3528,75+/-1162,45U/L) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$) en relación al GNE (5764,41+/-1641,43U/L). La frecuencia de MN presentó mayor mediana en el GE respecto al GNE (3,09 vs 0,73) con una diferencia significativa ($P<0,001$). Al asociar el tiempo de exposición con la actividad de BCh y la frecuencia de MN, se presentó una correlación negativa con la actividad de BCh y una correlación positiva con los MN, estadísticamente significativas $P<0,001$ y $P<0,05$. Los hallazgos obtenidos reflejan que los plaguicidas fueron utilizados en forma de mezclas siendo los más usados: organofosforados, carbamatos y piretroides produciendo modificaciones en los valores de actividad de BCh y la frecuencia de MN en individuos expuestos a plaguicidas.

Palabras clave: plaguicidas, exposición, agricultores, genotoxicidad, butirilcolinesterasa.

Abstract

Pesticides are xenobiotics, useful in controlling pests and their use leads to greater crop yields. However, they carry a risk of toxicity so biological monitoring of exposed workers is necessary. The aim of this study was to evaluate the cholinesterase activity and the presence of micronuclei in workers exposed to pesticide mixtures in the town of Urdaneta, Lara. Eighty-two workers participated, 41 exposed (EG) and 41 non-exposed (NEG), all of whom were male. Blood samples were obtained for the determination of butyrylcholinesterase (BCh); buccal mucosal epithelial samples were obtained for micronuclei (MN) sampling. The results were presented as descriptive statistics, absolute frequencies and percentages, using the PAST v.2.04 a free online software package. The BCh activity values in the EG (3528.75+/-1162.45U/L) showed statistically significant differences ($P<0.001$) in relation to the NEG (5764.41 +/- 1641.43U/L). Median MN frequency was highest in the EG compared to NEG (3.09 vs 0.73), a significant difference ($P<0.001$). By associating exposure time with BCh activity and MN frequency, a negative correlation was found with BCh activity and a positive correlation with MN, both statistically significant ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively). The results suggested pesticide mixtures were the most often used: organophosphates, carbamates and pyrethroids produced changes in the activity values of BCh and the frequency of MN in individuals exposed to pesticides.

Keywords: Pesticides, exposure, agricultural workers, genotoxicity, butyrylcholinesterase.

¹Unidad de Investigación de Ciencias Morfopatológicas (UNIMPA). Departamento de Ciencias Morfopatológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo. Email: tibisay_matheus@hotmail.com

²Maestría en Toxicología Analítica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Email: yaularz@gmail.com

³Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo. CIMBUC. lyng05@hotmail.com

⁴Universidad Paris Diderot- Fisiopatología Oral Molecular UMR1138 Eq. Berdal-Francia. Email: abolanosvh@gmail.com.

⁵Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional. Escuela de Bioanálisis. Email: yfernandez06@gmail.com.

⁶Instituto de Biología Molecular de Parásitos. (Instituto BioMolP). Email: barrios.emilia@gmail.com.

Introducción

Los plaguicidas son xenobióticos o mezclas de ellos destinados a ser aplicados en el medio ambiente, personas, animales o plantas, con el objeto de prevenir, controlar o combatir organismos capaces de producir daños a personas, animales, plantas, semillas u objetos inanimados (Gutiérrez, Grau, Vallebuona & Winsler, 2012). Su uso es múltiple y variado; sin embargo, la agricultura es la actividad que más emplea este tipo de compuestos, consumiendo hasta 85 % de la producción mundial con el fin de mantener un control efectivo sobre las plagas que afectan los cultivos (del Puerto, Suarez, & Palacio, 2014).

Estas sustancias pueden clasificarse según el grupo o familia química en organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados biperidilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de las triazinas, compuestos orgánicos del estaño, compuestos inorgánicos y los compuestos de origen botánico (del Puerto *et al.*, 2014).

Cabe destacar, que los organofosforados son los plaguicidas más utilizados en los cultivos tanto en Venezuela como a nivel internacional, y junto a los carbamatos, son los más involucrados en intoxicaciones en el mundo, ambos, son agentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. La inhibición de la acetilcolinesterasa trae como consecuencia la acumulación de acetilcolina, un neurotransmisor del sistema nervioso autónomo y en las terminaciones motoras. Esto ocasiona síntomas característicos de estimulación parasimpática, hasta una crisis colinérgica vegetativa, motora y nerviosa central (Gómez & Cáceres 2010).

En la actualidad, la determinación de la actividad de la colinesterasa constituye un biomarcador por excelencia de exposición ambiental a compuestos organofosforados, sulfatos y sulfonatos orgánicos y carbamatos. Sin embargo,

su determinación analítica reviste características particulares según el tipo de colinesterasa que se trate, en el caso de la colinesterasa plasmática es inhibida más rápidamente que la eritrocítica y sus niveles normales se restablecen dentro de los 60 días posteriores a la exposición, siendo un indicador de intoxicación aguda por organofosforados (Ibarra & Linares, 2012).

La evaluación de los riesgos para la salud en los seres humanos que están expuestos profesional o ambientalmente a estos agroquímicos es fundamental. No obstante, la identificación de los efectos de cada uno de ellos en forma individual es difícil, ya que frecuentemente los individuos utilizan diferentes mezclas, simultáneamente o en serie, ocasionando daños que se han asociado a la exposición crónica, los cuales incluyen neurotoxicidad, efectos inmunológicos, alteraciones en la reproducción y el desarrollo, además de efectos carcinogénicos (Simoniello, Kleinsorge & Carballo, 2010).

Adicionalmente, estos xenobióticos se han relacionado con daño a nivel del genoma humano como las mutaciones puntuales y cromosómicas, que pueden propiciar la transformación celular, por lo que resulta relevante la biomonitorización del material genético, el cual consiste en la identificación de biomarcadores de genotoxicidad que puedan detectar daño a nivel genómico antes que se desarrolle la patología y dar las pautas para la prevención de enfermedades producidas por estas transformaciones, entre estos marcadores se pueden mencionar: el ensayo cometa, intercambio de cromátidas hermanas, la determinación de aberraciones cromosómicas y la prueba de micronúcleos (MN) (Larrea, Tirado & Azcarruns, 2010).

Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan rezagados en anafase, por lo tanto no son incluidos en el núcleo de las células hijas durante la división nuclear (Ruíz *et al.*, 2013). Diversos estudios han demostrado que son indicadores de inestabilidad

cromosómica, por lo que pueden ser utilizados como una herramienta para la predicción del riesgo, detección, diagnóstico, pronóstico y como indicador de tratamientos y respuestas en procesos cancerígenos (Bhatia & Kumar, 2013).

Los autores, (Satyender, Ascarrunz, Tirado, Gonzáles, Cuti & Cervantes, 2011) en la India, evaluaron el daño al ADN a través del ensayo cometa, la actividad de la colinesterasaeritrocitaria (AChE), así como la toxicidad hepática y renal en 70 trabajadores agrícolas expuestos a mezclas de plaguicidas. Se observó que el ensayo cometa en linfocitos de los trabajadores expuestos mostró valores significativamente más alto en comparación con los no expuestos. La actividad de la AChE en eritrocitos se encontró disminuida (3,45 KAU/ L vs 9,55 KAU/ L) en relación a los controles, así como los niveles de enzimas hepáticas y renales, que se encontraron más elevados en el grupo expuesto mostrando diferencias estadísticamente significativas en comparación al grupo no expuesto, sugiriendo estos resultados que la exposición a la mezcla de organofosforados puede inducir daño en el ADN, disminución de la actividad de la AChE, hepatotoxicidad, así como nefrotoxicidad.

Además, Benedetti *et al* (2013), que evaluaron el daño genético a través del ensayo cometa y micronúcleos en células bucales de 81 agricultores expuestos y 46 no expuestos en cultivos de soya en Brasil, encontraron mayor frecuencia de MN estadísticamente significativa del grupo expuesto en relación al grupo no expuesto ($P < 0,001$), un mayor índice de daño y frecuencia a través del ensayo cometa del grupo expuesto en relación al grupo no expuesto, sugiriendo que la exposición a mezclas de plaguicidas induce daño genotóxico.

Sobre la base de los planteamientos anteriores y siendo Venezuela un país con importante actividad agrícola y el Municipio Urdaneta del Estado Lara uno de los principales productores de cebolla, melón, pimentón y tomates,

se plantea evaluar la actividad de butirilcolinesterasa y la presencia de micronúcleos en trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas en el municipio Urdaneta del Estado Lara.

Material y métodos

Se efectuó un estudio descriptivo y correlacional, diseño no experimental y corte transversal. La población estuvo constituida por 60 agricultores que laboran en fincas de comunidades del Municipio Urdaneta y la muestra fue recolectada entre Febrero y Marzo del 2015. Estuvo conformada por 41 trabajadores, y constituyó el grupo expuesto (GE). Para seleccionar los trabajadores participantes en el estudio, se empleó un muestreo no probabilístico, de conveniencia, no aleatorio. Todos los individuos del estudio pertenecían al sexo masculino y fueron seleccionados teniendo en consideración los siguientes criterios de inclusión: ser mayor de 18 años, trabajadores de fincas ubicadas en el Municipio Urdaneta del Estado Lara, realizar regularmente operaciones de preparación y/o aplicación de plaguicidas y tener una antigüedad laboral de 6 meses como mínimo. Así mismo, fueron excluidos trabajadores que realizaran actividades adicionales a las agrícolas, que estuvieran en contacto con sustancias que pudieran alterar las pruebas a realizar, como exposición a solventes orgánicos, o sometidos a tratamientos de radioterapia y/o quimioterapia.

Además, se conformó un grupo no expuesto (GNE) formado por 41 trabajadores del mismo municipio, con características sociodemográficas similares, cuya actividad laboral no estuviera asociada a la exposición a plaguicidas u otras sustancias que pudieran alterar las pruebas a realizar.

Los participantes fueron informados sobre el objetivo de la investigación y se solicitó su autorización para participar en el proyecto, para lo cual debieron firmar un consentimiento informado, a fin de cumplir con lo establecido en el código de

ética para la vida (Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e innovación, 2011). A todos los trabajadores seleccionados para el estudio se les aplicó una encuesta previamente validada a través del juicio de tres expertos y con una confiabilidad de 0,85 al aplicarle la prueba estadística Alfa de Cronbach para escala de respuestas. El cuestionario incluía datos sociodemográficos tales como edad, sexo, grado de instrucción, hábitos tabáquico y alcohólico, historial médico (patologías, síntomas, antecedentes familiares), actividad laboral (uso de medidas de protección, productos utilizados, frecuencia de la aplicación de los plaguicidas, almacenamiento y preparación de los productos, entre otros).

Previo a la toma de muestra se le informó a los participantes la restricción de ingesta alcohólica el día anterior, y que deberían presentarse en ayuno de 12-14 horas para la toma de la muestra de sangre y el raspado de la mucosa oral. La obtención de las muestras se realizó en horas de la mañana siguiendo las medidas de asepsia y antisepsia de la zona de punción del antebrazo; se tomaron 10 ml de sangre venosa en tubos heparinizados, rotulados con el nombre completo.

Seguidamente, se realizó la toma de muestra de las células epiteliales; cada participante se enjuagó la boca con agua potable y con un citocepillo se raspó suavemente la mucosa bucal, se tomó una muestra por cada mejilla para obtener mayor cantidad de células y se recolectó en un tubo cónico que contenía 5 ml de solución salina (0,9 % NaCl), inmediatamente fueron colocadas en una cava refrigerada hasta su procesamiento (Benedetti *et al*, 2013).

Determinación de Butirilcolinesterasa (BCh). La actividad de BCh se determinó por un método cinético de inhibición diferencial a través de la reacción de la tiocolina con el ferricianuro de potasio (III) del kit comercial WienerLab®, (2000). Para la determinación se tomaron 4 ul de muestra de suero y se le

adicionaron 150 ul del reactivo A (buffer pirofosfato 73mM, ferricianuro de potasio (III) 2,4 mM, pH 7,7 incubado durante 300 segundos a 37 °C) y 30 ul del reactivo B (buffer de Goofs 10mM, butiriltiocolina 92 mM, pH 4,0; incubado 120 segundos a 37 °C). La lectura de la absorbancia se realizó en un equipo Espectrofotómetro Omega IV a 405 nm y el resultado de la colinesterasa fue expresado en U/L. El valor de referencia de BCh en hombres para el kit utilizado fue de 5320-12920 U/L.

Micronúcleos (MN) en células epiteliales de la mucosa bucal. A las muestras epiteliales de descamación de la mucosa bucal se les realizó el protocolo de Benedetti *et al*, (2013), con modificación de los autores en cuanto al recuento de MN, el cual se realizó sobre 1000 células bucales por individuo (500 por cada duplicado), las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm, a 4° C, durante 8 minutos, el sedimento obtenido fue lavado 2 veces con 5 ml de solución salina y se procedió a un último lavado con una solución fijadora de Canno y bajo las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente se resuspendieron las células y se tomaron muestras de 100 microlitros en dos láminas portaobjeto, se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó la tinción con Giemsa al 2% durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Fueron visualizadas en un microscopio óptico (*Zeiss Axiostar plus*, con cámara *Canon PowerShot G9*).

Para la selección de los MN fueron utilizados los criterios siguientes: forma redonda o almendrada, medidas entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, intensidad, textura y plano focal igual que el núcleo, pueden tocar el núcleo principal pero no solaparse con él y estar localizados dentro del citoplasma de la célula (Kausar, Giri, Roy & Giri, 2014 y Torres & Ramos, 2013).

Análisis de datos. Se calcularon estadísticos descriptivos (medias, desviación estándar, medianas, mínimos y máximos),

frecuencias absolutas y porcentajes. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete libre *PAST* v.2.04 y un nivel de significancia $P < 0,005$; cuando los valores siguieron una distribución normal se empleó la prueba *t Student*; en los casos en los cuales las variables no siguieron una distribución normal se aplicaron estadísticos no paramétricos (prueba U de Mann Whitney) para diferencias entre 2 grupos y Kruskal-Wallis para comparar 3 grupos o más. Se utilizó el test de Spermann para establecer la correlación entre las variables en

estudio; finalmente, se empleó el test exacto de Fisher para asociar las variables cualitativas.

Resultados

La muestra estuvo conformada por 82 individuos, todos del género masculino, divididos en dos grupos: grupo expuesto (GE) y grupo no expuesto (GNE) con edades estadísticamente similares y con características sociodemográficas descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características sociodemográficas de los grupos en estudio.

	GE n= 41	$\bar{X} \pm DS$	GNE n= 41	$\bar{X} \pm DS$
Edad (años)		40,34 +/- 10,59		37,07 +/- 13,63 $P=0,229$
Rango de edad (años)		f (%)		f (%)
18-28		4 (9,8)		11 (26,8)
29-38		14 (34,1)		18 (43,9)
39-48		14 (34,1)		3 (7,3)
49-58		7 (17,1)		3 (7,3)
≥ 59		2 (4,9)		6 (14,6)
Grado de Instrucción		f (%)		f (%)
Analfabeta		2 (4,9)		0 (0)
Primaria		29 (70,7)		14 (34,1)
Secundaria		6 (14,7)		19 (46,4)
Técnico		4 (9,8)		1 (2,4)
Universitario		0 (0)		7 (17,1)
Hábito tabáquico		f (%)		f (%)
No fuma		32 (78)		33 (80,5)
1-5 cigarrillos/día		3 (7,3)		4 (9,8)
6-10 cigarrillos/día		3 (7,3)		1 (2,4)
Más de 10 cigarrillos/día		3 (7,3)		3 (7,3)
Hábito alcohólico		f (%)		f (%)
No toma		9 (22)		17 (41,5)
Sólo fin de semana		12 (29,3)		6 (14,6)
Cada 15 días		8 (19,5)		6 (14,6)
Eventos sociales		12 (29,3)		12 (29,3)

GE: Grupo Expuesto; GNE: Grupo No Expuesto. Fuente: Datos de la investigación, 2015.

Se observó que el hábito alcohólico predominó en ambos grupos a diferencia del hábito tabáquico. Al aplicar la Prueba t de *Student* no se encontró diferencia estadísticamente significativa de estos hábitos con la BCh (Fumadores: 3693 vs No fumadores: 3482).

Adicionalmente al comparar la frecuencia de micronúcleos con los mismos parámetros no hubo diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,083$ para el hábito tabáquico y $P = 0,419$ para el hábito alcohólico).

En cuanto a las condiciones laborales del grupo expuesto fueron agrupadas en la Tabla 2. De acuerdo al tiempo de exposición a los plaguicidas, la distribución de los participantes presentó mayor frecuencia en el rango de 6-15 años y el de más de 26 años, con una jornada semanal de 5-6 días y un tiempo de trabajo de 7-8 horas diarias.

El GE realiza diversas actividades en el campo, destacándose una mayor frecuencia en actividades mixtas, que es cuando alternan cualquiera de las actividades (fumigador, preparador y/o regador) dependiendo de la necesidad del momento. Adicionalmente, los que realizaron este tipo de actividades mixtas presentaron una mayor inhibición de la BCh y una mediana mayor de MN, aunque no fue estadísticamente significativo.

El equipo más utilizado para realizar las actividades de fumigación fue la pistola, la mayor frecuencia de aplicación es de 2-3 días por semana y la forma de descartar los envases de plaguicida más utilizada fue la incineración.

Los equipos de protección personal (EPP) evaluados se describen en la Tabla 3. Al relacionar los valores de BCh y el uso de EPP, se encontró que quienes utilizaban 2 EPP presentaron valores de la enzima mayores estadísticamente significativos a los que usaban 3 EPP (4453 vs 3081) con una significancia de $P = 0,039$ según el estadístico Tukey.

Tabla 2. Distribución del grupo expuesto según el tiempo de exposición, actividad que realiza, equipo utilizado para la fumigación, frecuencia de aplicación y forma de descartar los envases de plaguicidas.

Antigüedad(años)	f	%
≤ 5	4	9,75
6-15	14	34,14
16-25	9	21,95
≥ 26	14	34,14
Días laborables/semana	f	%
1-4	5	12,2
5-6	27	65,9
7	9	22
Jornada laboral(horas/día)	f	%
3-4	8	19,5
5-6	9	22,0
7-8	24	58,5
Actividad laboral	f	%
Mixtas	21	51,2
Fumigador	13	31,7
Preparador	2	4,9
Regador	5	12,2
Equipo de fumigación	f	%
Asperjadora	3	7,3
Tanque	8	19,5
Pistola	23	56,1
No fumigan	7	17,1
Días por semana	f	%
1	3	7,3
2-3	29	70,7
Cada 15 días	2	4,9
No fumigan	7	17,1
Forma de descarte	f	%
Incinerados	21	51,2
Reutilizados	9	22,0
Incinerados o reutilizados	11	26,8

Fuente: Datos de la investigación, 2015.

Tabla 3. Uso de equipos de protección personal del grupo expuesto

EPP	Sí f (%)	No f (%)	Ocasionalmente f (%)
Gorra	31(75,6)	10 (24,4)	0 (0,0)
Pantalón largo	29 (70,7)	1 (2,4)	11 (26,8)
Lentes	8 (19,5)	33 (80,5)	0 (0,0)
Mascarilla	4 (9,8)	37 (90,2)	0 (0,0)
Botas	26 (63,4)	15 (36,6)	0 (0,0)
Camisa manga larga	10 (24,4)	10 (24,4)	21(51,2)

EPP: Equipos de protección personal. Fuente: Datos de la investigación, 2015.

En los antecedentes patológicos, la hipertensión arterial fue la patología de mayor prevalencia para ambos grupo (GE: 7,3%; GNE: 4,9 %). En cuanto a los síntomas, el enrojecimiento ocular y el dolor de cabeza fueron los de mayor prevalencia en el GE (48,8%; 36,6%) mientras que en el GNE fue el dolor de cabeza (4,9%), sin embargo, al aplicar el test exacto de Fisher para asociar la butirilcolinesterasa con los antecedentes patológicos y los síntomas no se observó asociación estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. En el GE se encontró la presencia de antecedentes familiares como el

aborto espontáneo en la pareja (12,2%) e hijos con malformaciones (4,9%) mostrando una diferencia estadísticamente significativa $P < 0,05$ de los valores de BCh en relación con el aborto espontáneo en la pareja y un aumento en la mediana de micronúcleos pero no fue significativo. Adicionalmente, la frecuencia de MN presentó una diferencia estadísticamente significativa $P < 0,001$ con el antecedente familiar hijos con malformaciones (Tabla 4). Cabe destacar que en el GNE no se presentaron antecedentes de aborto espontáneo en la pareja ni hijos con malformaciones.

Tabla 4. Valores de BCh y MN de acuerdo al antecedente familiar: aborto en la pareja e hijos con malformaciones.

Aborto en la pareja	BCh(U/L)				MN			
	Mediana	Mínimo	Máximo	P	Mediana	Mínimo	Máximo	P
No	3684	3184	6953	0,041	2,80	0	14	*0,407
Sí	3153	1963	6284		5,20	0	15	
Hijos con Malformaciones	BCh(U/L)				MN			
	Mediana	Mínimo	Máximo	P	Mediana	Mínimo	Máximo	P
No presentaron malformaciones	3537	1963	6953		2,53	0	14	
Tumor en testículo	3423	3423	3423	0,973	15	15	15	**0,000
Cardiopatía congénita	3275	3275	3275		13	13	13	

BCh: Butirilcolinesterasa; MN: Micronúcleos; * Prueba de U Mann-Witney y ** Prueba de Kruskal-Wallis . Fuente: Datos de la investigación, 2015.

En cuanto a los plaguicidas utilizados en los cultivos, los agricultores manifestaron usar mezclas de diferentes productos, fueron reportados 28 productos. Los más utilizados fueron organofosforados, carbamatos y piretroides.

En relación a la actividad de la BCh la media +/- desviación estándar fue un valor menor en el GE (3528,75+/- 1162,45 U/L) demostrando una mayor inhibición de la enzima en relación a el GNE (5764,41+/-1641,43U/L) y al aplicar el análisis estadístico t de *Student* mostró una diferencia estadísticamente significativa $P=0,000$ para la variable BCh del GE en relación al GNE. La frecuencia de micronúcleos (MN) presentó una mediana mayor en el GE (3,09) con un máximo de 15 MN respecto al GNE (0,73) con un máximo de

5 MN, así mismo, fueron observados células con un MN y células con más de un MN opolimicronucleadas (PMN) (Fig 1). El análisis estadístico utilizando la U de Mann-Whitney mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P=0,000$) entre los grupos. Además, el rango de edad que presentó una mediana mayor de MN fue el grupo ≥ 59 años, sin embargo, al aplicarle el estadístico Kruskal- Wallis no fue significativo.

Al relacionar la variable tiempo de exposición con la BCh, del grupo expuesto, utilizando el análisis estadístico coeficiente de Spearman se observó una correlación negativa estadísticamente significativa $P<0,001$ y una correlación positiva con los MN con $P<0,001$ (Tabla 5).

Figura1. Tipos de célula: a) Célula normal mononucleada; b) Célula mononucleada con un micronúcleo (flecha); Célula mononucleada con polimicronúcleos (flechas). Tinción con Giemsa. Barra en a,b,c: 7 μ m.



. Fuente: Datos de la investigación, 2015.

Tabla 5. Relación del tiempo de exposición, BCh, y MN del grupo expuesto.

Parámetro		Tiempo de exposición	BCh (U/L)	MN
Tiempo de exposición	r	1,000		
	P			
BCh (U/L)	r	-0,520	1,000	
	P	0,000(**)		
MN	r	0,463	-0,258	1,000
	P	0,000(**)	0,041(*)	

BCh: Butirilcolinesterasa; MN: Micronúcleos. ** La correlación es significativa al nivel 0,001 (bilateral); * La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral) con la prueba de coeficiente de Spearman. Fuente: Datos de la investigación, 2015.

Discusión

Las características sociodemográficas de los participantes de este estudio, son semejantes a las reportadas en otras investigaciones como las observadas por Botiã *et al.* (2014) al sur de Brasil en productores de frutas y hortalizas, con edades promedio de 40,00 +/- 11,2 años y predominio de trabajadores con estudios de primaria incompleta, mostrando que los agricultores en su mayoría son personas con un nivel educativo básico.

El hábito tabáquico presentó una baja prevalencia tanto en el GE como el GNE, mientras que el hábito alcohólico estuvo presente en los dos grupos, características similares a las observadas en un estudio realizado por Borges *et al.* (2013), en el cual los fumadores del GE y GNE mostraron prevalencia más baja (24,4% y 31,2 %) en relación al hábito alcohólico (GE 75,6% y GNE 78,1%). Al relacionar la BCh y los MN con los hábitos alcohólico y tabáquico no se encontró relación estadísticamente significativa, por lo que se pudiera suponer que estas variables no influyen con la BCh y en el daño genotóxico, por lo que los resultados encontrados pueden ser considerados efectos verdaderos de los plaguicidas, concordando con resultados similares obtenidos por Carbajal *et al.*, (2016); Larrea *et al.* (2010); Simoniello *et al.*, (2010). Otras variables estudiadas como el tipo de actividad realizada, duración de la jornada laboral (en días a la semana y horas diarias) tampoco presentaron diferencias significativas.

En cuanto al uso de equipos de protección personal, se encontró diferencias estadísticamente significativa entre el uso de estos y los niveles BCh, los individuos que utilizaron más equipos de protección presentaron valores más bajos de la enzima, resultado similar fue obtenido por Simoniello *et al.*, (2010) los cuales observaron valores más bajos de las enzimas colinesterásicas en aquellos agricultores que utilizaron los equipos de protección en comparación con aquellos que manifestaron no usarlos. En este punto, debe destacarse la importancia de la calidad y cantidad

de los EPP, puesto que en el presente estudio ninguno de los agricultores manifestó haber utilizado todos los equipos que fueron evaluados, también se observó que equipos como la mascarilla que brinda una alta protección a plaguicidas que se absorben por vía inhalatoria fue el equipo menos utilizado, otro detalle manifestado por los agricultores es que debido a la alta temperatura en la región no siempre permanecen con sus equipos de protección durante toda la jornada.

En relación a los antecedentes patológicos, la hipertensión arterial fue la patología de mayor prevalencia para ambos grupos. Además, el enrojecimiento ocular y el dolor de cabeza fueron los síntomas de mayor prevalencia en el GE, mientras que en el GNE fue el dolor de cabeza, coincidiendo con un trabajo realizado por Palacios & Paz, (2011) en agricultores de México, en el cual, el dolor de cabeza fue el síntoma de mayor prevalencia (23,6%).

Por otra parte, en la presente investigación se reportó el aborto espontáneo en la pareja (12,2%) en concordancia con otras investigaciones (Carbajal *et al.*, 2016) donde estudiaron tres comunidades rurales expuestas a plaguicidas, encontraron que las parejas de los trabajadores tenían una alta incidencia de abortos espontáneos (Arcelia 40,3%, Ajuchitlan 76,92% y Tlapehuala 8,33%), los autores citados atribuyen este hecho a que los agricultores llegan con la ropa impregnada de los diferentes plaguicidas exponiendo a sus parejas embarazadas a este tipo de xenobióticos y en muchos casos almacenan estas sustancias en el hogar.

Asimismo, al relacionar la butirilcolinesterasa con el aborto espontáneo en la pareja se obtuvo una relación estadísticamente significativa y la frecuencia de MN fue mayor en los agricultores cuyas parejas presentaron aborto espontáneo aunque no fue estadísticamente significativo. Cabe destacar que en regiones de Argentina donde utilizan gran cantidad de plaguicidas se han registrado altas tasas de aborto

espontáneo (hasta 23 % de las mujeres en edad reproductiva sufrió al menos un aborto en los últimos cinco años, cuando la tasa normal es de 5 %) y aumentaron notablemente las consultas por infertilidad en varones y mujeres (Ávila, 2014).

En este sentido, esta observación es importante por cuanto un aborto espontáneo puede relacionarse con una mutación, lo cual ha sido evidenciado por diversos autores (Moghbeli, Mozdarani & Aleyasin, 2012; Trkova, Kapras, Bobkova, Stankova & Mejsnarova, 2000) y se ha relacionado con un incremento de MN en parejas infértiles o con alta tasa de aborto espontáneo, sugiriendo que un incremento en el nivel de MN puede ser de utilidad en la determinación del daño cromosómico.

En relación a las malformaciones congénitas en los hijos de los agricultores, se mostró una relación estadísticamente significativa con la presencia de MN. De acuerdo a las observaciones de Ávila (2014), cada vez nacen más niños con malformaciones en zonas agrícolas especialmente si los primeros meses del embarazo coinciden con la época de fumigaciones. Entre las que se diagnostican con mayor frecuencia se encuentra el síndrome de Down, mielomeningoceles y cardiopatías congénitas, entre otras. En algunos pueblos y años llegan a triplicar las tasas normales y se vinculan directamente al aumento de las aplicaciones de agrotóxicos en los alrededores. En cuanto a los plaguicidas utilizados en los cultivos, los agricultores reportaron gran variedad de productos siendo los más referidos: compuestos organofosforados, carbamatos y piretroides, coincidiendo con un estudio realizado por López, Piñero & Zambrano, (2015) en cultivos de arroz en Colombia donde predominaron estos mismos grupos, sin embargo, se dificultó clasificar exactamente la cantidad de cada uno de los productos utilizados ya que los plaguicidas son usados en forma de mezclas dependiendo de las necesidades que presente el cultivo. Para ahorrar tiempo y recursos, en un tanque de aplicación se mezclan diversos

plaguicidas, con diferentes principios activos, aditivos y para distintos organismos blanco, cuando estas formulaciones están diseñadas para ser utilizadas en forma individual disueltas en agua (Coalova, Mencacci & Fassiano, 2013), lo que impide determinar efectos de cada uno de los plaguicidas o los efectos sinérgicos o antagónicos como consecuencia de las mezclas utilizadas. Así mismo, se clasificaron de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), Sistema Global Armonizado (SGA) y por la Agencia Internacional de investigación de cáncer (IARC). En base a su toxicidad según la OMS la mayoría son considerados moderadamente tóxicos (grupo II), sin embargo, dos de ellos: metamidofos (organofosforado) y metomilo (carbamato) pertenecen al grupo Ib “altamente peligrosos”.

Asimismo, según la SGA, estos compuestos están ubicados en la categoría II, clasificados como mortales en contacto con la piel y si son inhalados (gas, vapor, polvo/niebla). No obstante, en base a la clasificación del SGA la mayoría de los plaguicidas referidos en este estudio pertenecen al grupo III que son considerados tóxicos en contacto con la piel y si son inhalados (World Health Organization, 2009).

Además, los agricultores manifestaron utilizar plaguicidas que han sido declarados recientemente por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer como “probablemente cancerígenos para los humanos” grupo 2A, como el diazinón, del cual existe “evidencia limitada” que produce cáncer de pulmón y “fuerte evidencia” que induce daños en el ADN o sobre los cromosomas. Malatión con “evidencia limitada” que produce Linfoma no Hodgkin y cáncer de próstata en humanos. Y el glifosato con evidencia de cáncer en animales de experimentación y Linfoma no Hodgkin (IARC, 2015), lo que manifiesta el riesgo ocupacional al que están expuestos los agricultores.

En el presente estudio, se evaluó la BCh como indicador de exposición a los plaguicidas

encontrándose una disminución en el valor de la enzima con una diferencia estadísticamente significativa entre el GE en relación al GNE ($P < 0,001$), coincidiendo con Satyender *et al*, (2011) en un estudio donde se evaluaron niveles de colinesterasa, en el cual atribuye la disminución de los niveles de colinesterasa al posible papel neuroinmunoregulador de la enzima.

En contraste, Benedetti *et al*, (2013) en un estudio para determinar el daño genético en trabajadores de cultivos de soya, en el que evaluaron la butirilcolinesterasa, no encontraron relación estadísticamente significativa, atribuyendo este efecto a que todos los compuestos utilizados en las diferentes mezclas no eran inhibidores de la colinesterasa y que pudieran actuar por otros mecanismos, además que existe la limitación de la determinación de BCh para exposición a largo plazo. Adicionalmente, García, Parrón, Requena, Alarcón, Tsatsakis & Hernández, (2015) encontraron valores estadísticamente significativos más elevados de la BCh del grupo expuesto en relación a los no expuestos; estos autores lo atribuyen a un mecanismo de protección natural de la enzima frente a estos xenobióticos.

En lo que respecta a los micronúcleos, a pesar de que no existen valores de referencia para la frecuencia de ellos, los resultados del proyecto micronúcleos humanos en células bucales exfoliadas (XUMN_{XL}), mostraron un rango entre 0,30-1,70/1000 células como frecuencia de micronúcleos espontánea, el cual ha servido de referencia en diferentes estudios (Bolognesi, Kanasmueller, Nersesyan, Thomas & Fenech, 2013; Bonassi *et al*, 2011).

En este sentido, en la presente investigación se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) de la frecuencia de MN del GE (3,09/1000 células) en relación al GNE (0,73/1000 células), encontrándose el segundo dentro del rango de frecuencia espontánea en células bucales, mientras que para el GE la frecuencia de MN fue superior al rango de

frecuencia espontánea, lo que sugiere que este incremento puede deberse a la exposición a los diferentes plaguicidas. Estos resultados coinciden con Benedetti, *et al*, (2013); Borges *et al*, (2013); Carbajal, Gómez, Villalobos, Calderón & Martínez, (2016); Larrea *et al*, (2010); Simoniello *et al*, (2010). En contraste, Lamadrid, Romero, González, Mandina, (2011) al evaluar la frecuencia de MN como indicador de daño genético no encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Adicionalmente, en esta investigación se observó mayor frecuencia de micronúcleos en relación con la edad, predominando en el grupo etario ≥ 59 años, no obstante estas diferencias no fueron estadísticamente significativa, coincidiendo con Carbajal *et al*, (2016), quienes en un estudio similar tampoco encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de MN con la edad. Estos autores han señalado que los aumentos de MN pudieran atribuirse al incremento en la acumulación de daño en el ADN, deterioro progresivo en la capacidad de reparación y al aumento de radicales libres en las células, lo que sugiere que con la edad el riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas puede aumentar.

Por otra parte, al asociar los valores de MN con el tiempo de exposición se encontró una correlación positiva, indicando que a mayor tiempo de exposición aumenta la frecuencia de MN, adicionalmente, se observó una correlación negativa del tiempo de exposición con la BCh lo que sugiere que a mayor exposición, disminuye la actividad de la enzima lo que coincide con Satyender *et al*, (2011) que encontraron relación estadísticamente significativa con la actividad de la enzima.

Conclusiones

El presente estudio demostró que los plaguicidas son utilizados en forma de mezclas y los de mayor frecuencia fueron los organofosforados, carbamatos y piretroides. Los

valores de actividad de BCh fueron significativamente menores en el GE respecto al GNE, con una correlación negativa estadísticamente significativa, entre los valores actividad de BCh del GE con el tiempo de exposición.

La frecuencia de MN observada fue significativamente mayor en el GE respecto al GNE; con una correlación positiva entre la frecuencia de MN del GE y el tiempo de exposición. Los valores de BCh y MN no evidenciaron asociación estadística con los hábitos alcohólico y tabáquico en los grupos de estudio.

No se observaron relaciones estadísticamente significativas entre la BCh, los antecedentes patológicos y los síntomas en los grupos de estudio. Sin embargo, se encontraron

relaciones estadísticamente significativas de la BCh con el aborto en la pareja y de la frecuencia de MN con el antecedente familiar hijos con malformaciones.

Los trabajadores agrícolas que participaron en este estudio muestran deficiencias en almacenamiento, desecho, uso de elementos de protección personal y uso de plaguicidas restringidos, todo esto dentro de un contexto social y económico que hace difícil la implementación de programas de vigilancia y control del uso seguro de plaguicidas, por lo que se ratifica la importancia de la evaluación periódica de los trabajadores agrícolas expuestos a estas sustancias, además de favorecer estrategias educativas que conduzcan a un uso adecuado de EPP y el manejo seguro de los plaguicidas a los que están expuestos, a fin de garantizar su adecuado estado de salud y de su familia.

Referencias Bibliográficas

- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer- IARC, (2015). Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Recuperado de <https://www.iarc.fr/en/mediacentre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>.
- Ávila, M., (2014). Agricultura tóxica y pueblos fumigados en Argentina. Recuperado de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/Extension/article/viewFile/4586/6977>.
- Benedetti, D., Nunes, E., Sarmiento M., Porto, C., Dos Santos, CE., Dias, JF. & da Silva, J. (2013). Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assay. *Mutation Research*, (752), 28-33.
- Bhatia, A. & Kumar, Y. (2013). Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *Actapathologica, microbiologica, etimmunologica Scandinavica*, (121), 569-81.

- 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*, 753 (2), 100-13.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S. & Fenech, M., (2011). The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNxl): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, (728), 88-97.
- Borges, C., Oliveira, E., Wendhell, M., da Silva, A., Oliveira, C., Pereira, R. & de Melo, D., (2013). Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. *Environmental science and pollution research international*, (10), 7334-40.
- Botião, S., Andrade, F., Botião, L., Cocco, V., Yoshio, R., Oliveira, G. & Machinski, M., (2014). Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale agricultural workers in southern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 783-791.
- Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. & Martínez-Arroyo, A., (2016). Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental science and pollution research international*, 23(3), 2513-2520.
- Coalova, I., Mencacci, S. & Fassiano, A. (2013). Genotoxicidad de mezclas de plaguicidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta Toxicológica Argentina*, (21), 5-14.
- 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.
- García-García, R., Parrón, T., Requena, M., Alarcón, R., Tsatsakis, A., & Hernández, A., (2015). Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences*, (145), 274-83.
- Gómez, M. & Cáceres, J. (2010). Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50 (1), 119-125.
- Gutiérrez, M., Grau, P., Vallebuona, C. & Winsler, M. (2012). Protocolo de vigilancia de salud de los trabajadores expuestos a plaguicidas. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. División de Políticas Públicas. Departamento de Salud Ocupacional.
- Ibarra, EJ., & Linares, TM. (2012). La inhibición de la actividad colinesterásica sanguínea como biomarcador de exposición a compuestos organofosforados y carbamatos. Una revisión crítica. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 13(3), 59-65.
- Kausar, A., Giri, S., Roy, P. & Giri, A., (2014). Changes in buccal micronucleus cytome parameters associated with smokeless tobacco and pesticide exposure among female tea garden workers of Assam, India. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (217), 169- 175.
- Lamadrid, A., Romero, I., González, J. & Mandina, T. (2011). Biomonitoring de trabajadores expuestos a plaguicidas. *Rev Cubana Investigación Biomédica*, 30(2), 235-244.

- Larrea, M., Tirado, N. & Azcarruns, M., (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. *Biofarbo*, 18 (2), 31-43.
- López, K., Pinedo, C. & Zambrano, M. (2015). Prácticas de Salud Ocupacional y niveles de biomarcadores séricos en aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz en Natagaima-Tolima, Colombia. *Revista de Toxicología*, (32), 102-106.
- Moghbeli-Nejad, S., Mozdarani, H. & Aleyasin, A. (2012). Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, (29), 89-94.
- Palacios M. & Paz M. (2011). Sintomatología persistente en trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas órgano-fosforados. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 29(2), 153-162.
- Ruiz-Bernés, S., Flores-García, A., Ramos-Ibarra, M., Moya-García, M., Aguiar-García, P., Sánchez-Gutiérrez, R. & Torres, O. (2013). Micronúcleos en células de mucosa bucal como biomarcador de riesgo para cáncer. *Fuente nueva época*, (13), 34-39.
- Satyender, S., Ascarrunz E, Tirado N, Gonzáles A, Cuti M. & Cervantes. (2011). DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (31), 278-285.
- Simoniello, M., Kleinsorge, E., & Carballo, M. (2010). Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina*, (70), 489-498.
- Torres, O., & Ramos, M. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International journal of morphology*, (31), 650-657.
- Trkova, M., Kapras, J, Bobkova, K., Stankova, J. & Mejsnarova, B. (2000). Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reproductive toxicology*, (14), 331-335.
- Venezuela. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias (2011). *Código de ética para la vida*. Caracas: Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación.
- Wiener Lab®. (2000). Cholinesterase. Argentina. Recuperado de <http://www.wienerlab.com.ar/Vademecum%20espanol/cholinesterasesp.pdf>.
- World Health Organization. (2009). The WHO Recommended Classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. International programme on chemical safety. Retrieved from http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf.

<p>Fecha de recepción: 13 de diciembre de 2016 Fecha de aceptación: 28 de febrero de 2017</p>
--