

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EXPOSICIÓN  
LABORAL A PESTICIDAS EN AGRICULTORES DEL MUNICIPIO DE ÁBREGO,  
NORTE DE SANTANDER**

**Mercedes Verjel Álvarez**

**Programa de Biología**

**Departamento de Biología**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Universidad de Pamplona**

**Pamplona, Colombia**

**2019**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EXPOSICIÓN  
LABORAL A PESTICIDAS EN AGRICULTORES DEL MUNICIPIO DE ÁBREGO,  
NORTE DE SANTANDER**

**Mercedes Verjel Álvarez**

**Director:**

**Iván Meléndez Gélvez**

**Programa de Biología**

**Departamento de Biología**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Universidad de Pamplona**

**Pamplona, Colombia**

**2019**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR  
TÍTULO DE BIÓLOGA DE LA UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, NORTE DE  
SANTANDER- COLOMBIA**

## DEDICATORIA

*A mis papás, Nancy y Henry, por ser mi motor de vida y mi mayor motivación para salir adelante, por apoyarme en todo momento y darme la maravillosa oportunidad de estudiar esta hermosa carrera.*

*A tía Carmenza y tío Hermes, por dejar una huella imborrable en mi corazón y dejarme un gran ejemplo de amor por la vida a pesar de las adversidades.*

*A mi hermana Melisa y mi prima Karla, por ser mi alegría, mi compañía y mi apoyo incondicional.*

*A mi sobrina/o que vienen en camino, por llegar en la etapa final de este proceso y convertirse en un nuevo motivo e inspiración para lograr mis sueños.*

*A todos mis tíos, tías, primos y primas, por ser parte de mi vida y acompañarme en todo el proceso de mi formación personal y profesional.*

*A mi novio Julián, por ser parte de mi felicidad y motivarme a ser mejor persona.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor, Iván Meléndez, por compartir conmigo sus conocimientos para la culminación de esta etapa y ser mi guía en todo el proceso.

Al semillero de investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN)

Al Laboratorio de Mutagénesis y al Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Pamplona.

A mis amigos, Yeferson, Lizeth, Camila, Duván y Silvia por ser mi compañía en todo momento, darme palabras de aliento cuando más lo necesité y sacarme una sonrisa en mis peores días.

A los agricultores de las diferentes veredas del municipio de Ábrego, quienes muy amablemente donaron las muestras de sangre para la realización de esta investigación.

A todas las personas que me acompañaron y fueron parte importante en la ejecución de este trabajo.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>2. MARCO DE REFERENCIA .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Pesticidas y su clasificación .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Genotoxicidad por exposición a pesticidas .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Ensayo Cometa (EC): Electroforesis alcalina en gel de células individuales.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. General.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Área de estudio .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Obtención y transporte de las muestras.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Detección de daño Genotóxico por Ensayo cometa.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3.1. EC con sangre total de Agricultores expuestos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3.2. Determinación <i>in vitro</i> del daño genotóxico inducido por pesticidas de uso común por los agricultores de la región.....</b>	<b>21</b>
<b>4.4. Análisis Estadístico .....</b>	<b>23</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Determinación de las dosis subtóxicas de los pesticidas .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Daño genotóxico en Agricultores del municipio de Ábrego .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Genotoxicidad inducida por pesticidas de uso común en el municipio .....</b>	<b>37</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Pesticidas expendidos en el municipio de Ábrego a partir del año 2014 al 2016.....	4
Figura 2. Área de estudio. Veredas municipio de Ábrego, Norte de Santander. ....	18
Figura 3. Obtención y transporte de muestras de sangre. ....	19
Figura 4. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos antes del tratamiento con los pesticidas. ....	26
Figura 5. Porcentaje de viabilidad después de someter la incubación con los tratamientos. ....	27
Figura 6. Daño genotóxico presentado en células sanguíneas de Agricultores del Municipio de Ábrego, expresado en longitud total del cometa ( $\mu\text{m}$ ).....	29
Figura 7. Daño genotóxico evidenciado en células de los Agricultores .....	29
Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes. Longitud de cometa de las 30 muestras de los Agricultores.....	32
Figura 9. Tipo de daño genotóxico evidenciado en las células de los Agricultores. ....	37
Figura 10. Tipo de pesticidas utilizados por los Agricultores. Por blanco de acción y grupo químico. ....	38
Figura 11. Daño genotóxico en linfocitos inducido por pesticidas de uso común en Ábrego. ....	39
Figura 12. Migración de DNA evidenciado en linfocitos expuestos a la concentración mayor con cada pesticidas.....	39
Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes. Longitud de cometa en linfocitos expuestos a pesticidas. ....	41
Figura 14. Diagrama de cajas y bigotes. Longitudes de cometa obtenidas con las 3 dosis de Glifosol y Monocrotofos.....	46

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación toxicológica de los pesticidas a los que fueron expuestos los linfocitos.....	25
Tabla 2. Comparaciones múltiples de las 30 muestras analizadas y el control negativo según la prueba LSD de Fisher. ....	30
Tabla 3. Tabla Análisis de Varianza (ANOVA). ....	31
Tabla 4. Factores relacionados con el daño genotóxico presentado en los Agricultores. ....	33
Tabla 5. Nivel de daño genotóxico evidenciado en 30 agricultores del municipio de Ábrego.....	34
Tabla 6. Comparaciones múltiples de las longitudes de cometa en linfocitos expuestos a las diferentes dosis utilizadas con los cinco pesticidas y el control negativo según la prueba LSD de Fisher. ....	40
Tabla 7. Tabla ANOVA.....	41
Tabla 8. Tipo de daño en linfocitos tratados con 3 dosis de pesticidas.....	42
Tabla 9. Tabla ANOVA.....	44
Tabla 10. Comparaciones múltiples entre las dosis aplicadas de Glifosol y Monocrotofos. ....	45

## RESUMEN

Los pesticidas son una alternativa económica y de fácil acceso para los agricultores, ya que mejoran el rendimiento de la producción de los cultivos, sin embargo, presentan efectos adversos sobre la salud, siendo los agricultores la población de mayor riesgo debido a su ocupación. En el presente estudio se realizó un biomonitoreo de agricultores expuestos a pesticidas, con el objetivo de demostrar la inducción de daño genotóxico por los mismos. El daño se evaluó mediante el ensayo cometa con 30 muestras de sangre periférica de agricultores del municipio de Ábrego y muestras de personas no expuestas a estos productos, como control negativo; sumado a esto, se realizaron ensayos para evaluar la genotoxicidad en linfocitos expuestos a pesticidas de uso común en la zona. El daño evidenciado en las células de los agricultores mostró diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ), el cual se relacionó con la mezcla y el tipo de pesticidas que utilizan al momento de fumigar, pues a mayor combinación o mezcla de pesticidas, se mostró longitudes de daño más elevadas. Los ensayos in vitro mostraron que el nivel de daño en las células mostró una relación directamente proporcional a la dosis aplicada, siendo el glifosol el que mayor longitud de cometa indujo en los linfocitos. Estos resultados evidencian que el mal manejo de los pesticidas y la exposición a mezclas complejas de agroquímicos, inducen daño en el material genético; asimismo, el glifosato, mostró mayor daño a comparación de los demás pesticidas analizados, aún estado categorizado como no peligroso.

**Palabras clave:** Agricultores, daño genotóxico, pesticidas, glifosato, ensayo cometa.

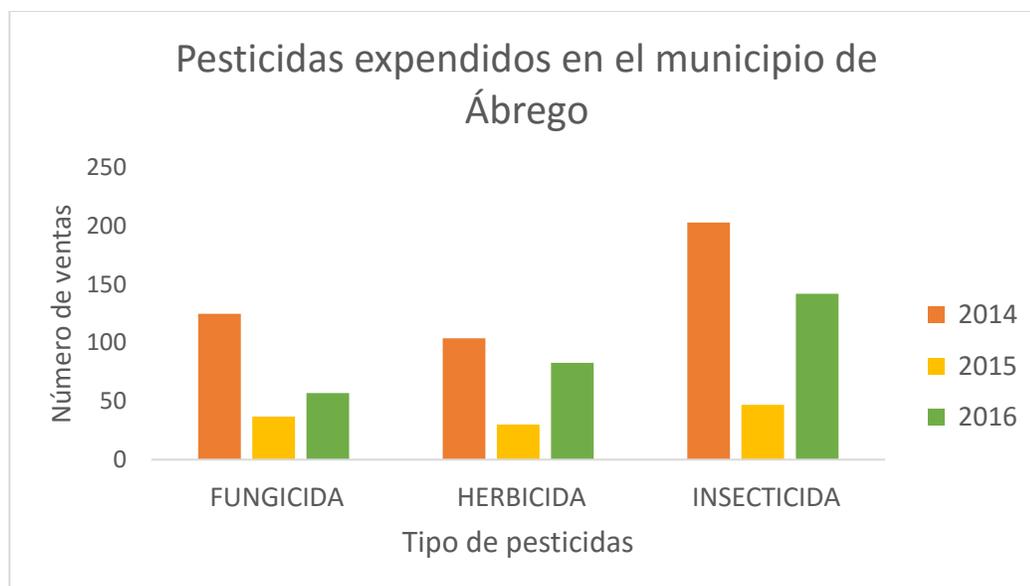
## 1. INTRODUCCIÓN

La principal fuente de economía del municipio de Ábrego es la agricultura, distinguiéndose a nivel nacional por sus productos, entre los que se destacan cultivos de cebolla roja (*Allium cepa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y maíz (*Zea mays*), entre otros (CONSORNOC, 2010). Sin embargo, estos cultivos se ven afectados por distintos tipos de plagas, que generalmente son insectos, ácaros, caracoles, aves y roedores, siendo los primeros, las plagas más comunes en las cosechas, generando daños directos como lesiones en frutos y en los diferentes órganos de la planta (Sistema agrícola, 2016); igualmente, los cultivos son atacados por patógenos como bacterias, micoplasmas, viroides y hongos, causándoles enfermedades, siendo los últimos los más habituales en las plantas, afectando los tejidos de la misma, provocando marchitamiento y además de esto, un crecimiento bajo en los cultivos, caída de los frutos y en ocasiones, si no es controlado, puede causar pérdida de producciones enteras (Hidroponía, 2017); de igual forma, otro problema con el que se enfrentan los agricultores son las plantas no deseadas en el cultivo, que se le consideran malezas o malas hierbas, pues compiten con las plantas de la cosecha por el uso de espacio, nutrientes y agua (Avocadosource, s.f.). Todas estas plagas, enfermedades y malezas que invaden los cultivos, contribuyen a la disminución en la producción y la calidad del producto, razón por la cual los agricultores acuden a la utilización de pesticidas para la eliminación o inhibición del crecimiento de estas y así asegurar la productividad de la cosecha (Bhatnagar, 2001; Rekha, Naik & Prasad, 2006).

En consecuencia, los agricultores del municipio de Ábrego manifestaron que recurren al uso de productos químicos como Furadan, Lannate, Karate, Curacron, Sunfire, Engeo, Exalt, Latigo, Monocrotofos, Arrivo, los cuales se utilizan para atacar plagas de insectos como el

gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), la mosca blanca, perteneciente a la familia Aleyrodidae, orugas de la familia Geometridae, comúnmente llamadas “gusano medidor”, insectos del orden Tisanópteros, gusano mojoyoy o chizas (*Phyllophaga obsoleta*), grillos de la familia Acrididae, conocidos coloquialmente como “langostas” y gusano verde (*Hypera postica*); del mismo modo, en el municipio, algunas cosechas se enfrentan a una enfermedad causada por un hongo ascomiceto del género *Alternaria*, el cual es atacado o inhibido con productos como Dithane, Manzate, Trivia, Amistar, Folicur, Bélico, Cobrethane; igualmente, para la eliminación de plantas indeseadas en los cultivos, son utilizados químicos como Glifosol, Gramoxone, Roundup, Glifosato.

Los agroquímicos son una alternativa económica y de fácil acceso para los agricultores, ya que han aportado grandes mejoras en cuanto al rendimiento de la producción de los cultivos (Arévalo, 2014). Dichos compuestos químicos están entre más de 1.000 ingredientes activos producidos y comercializados en un mayor porcentaje en Colombia, como insecticidas, herbicidas y fungicidas (ICA, 2017), siendo los insecticidas los de mayor demanda en el municipio de Ábrego dentro de la comunidad de agricultores (Figura 1) (IDS, s.f.); no obstante, debido a que algunas plagas han creado resistencia a estos agroquímicos, se ha visto la necesidad de formular nuevos y más potentes plaguicidas. Como resultado de esto, y al uso extensivo que se le ha venido dando a los pesticidas, se han presentado problemas en la salud humana debido a la exposición ocupacional o ambiental que tienen las personas a estos químicos (Abdollahi et al., 2004c; De Souza et al., 2011; Mostafalou and Abdollahi, 2012a).



*Figura 1.* Pesticidas expendidos en el municipio de Ábrego a partir del año 2014 al 2016.

Fuente: Instituto Departamental de Salud Norte de Santander, IDS

Entre los posibles efectos que induce la exposición a los productos químicos se encuentran los daños genotóxicos, los cuales como se mencionó, tienen importantes implicaciones sobre la salud humana, como la inducción de diferentes tipos de cáncer y daños reproductivos (Castillo et al., 2014). Se ha comprobado que la interacción de agentes químicos como los pesticidas, con el material genético, da como resultado daño al ADN o aberraciones cromosómicas, los cuales son desencadenantes de enfermedades crónicas (Mostafalou y Abdollahi, 2013).

Los daños genéticos causados por dichas interacciones pueden ser roturas de cadena, aductos o síntesis de ADN no programada, a los que se le conoce como daños premutagénicos; mutaciones en un gen específico, ya sea una inserción o delección de una base; o aberraciones cromosómicas, incluyendo pérdida o ganancia de todo el cromosoma. Los daños premutagénicos pueden ser reparados antes de la división celular, mientras que las mutaciones en un gen y

aberraciones cromosómicas son permanentes y tienen la capacidad de transmitirse a las células hijas (Mostafalou y Abdollahi, 2013). En consecuencia, se generó el interrogante: ¿se está presentando en los agricultores del municipio de Ábrego, daños significativos en el ADN por la exposición laboral a los pesticidas?

En relación con la problemática expuesta anteriormente, se realizó esta investigación con el objetivo de evaluar el efecto sobre el ADN causado por la exposición laboral de los agricultores a los pesticidas, en muestras de sangre total; adicional a esto, se realizaron ensayos para evaluar la genotoxicidad inducida por algunos pesticidas utilizados en la zona, en ambos casos, utilizando el ensayo cometa (EC); esto debido a que en municipios agrícolas como Ábrego, la fumigación de los cultivos involucra a las personas desde muy temprana edad, sumado al hecho de que en el municipio no se cuenta con planes de manejo, protección y control para el uso responsable de estos químicos, propiciando que estas sustancias sean inhaladas por los agricultores y pasen a las vías respiratorias, dérmicas y digestivas.

## **2. MARCO DE REFERENCIA**

El uso de plaguicidas en la agricultura moderna se ha dado por la necesidad de mejorar la productividad de los cultivos, a través de la inhibición de enfermedades causadas por diferentes organismos, por esta razón el modelo de desarrollo agrícola en Colombia ha incrementado el uso de estos pesticidas (Valencia et al., 2013; Varona et. al., 2003); sin embargo, la aplicación de estos productos se realiza en condiciones precarias en cuanto a elementos técnicos de protección personal, preparación y almacenamiento (Simoniello et. al, 2007).

A raíz del exceso en la utilización de estos químicos, se han generado problemas que afectan tanto a las especies de plantas y animales que están alrededor de los cultivos, como a los humanos, ya que debido a las prácticas de fumigación de cultivos con productos químicos, se han presentado acumulaciones de los agroquímicos en los ecosistemas, problemas en la salud humana, daños al medio ambiente y resistencia de los insectos a dichos productos, dando paso a que los productores de los plaguicidas desarrollen químicos más fuertes (Arévalo, 2014).

### **2.1.Pesticidas y su clasificación**

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define a los plaguicidas como sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir plagas o especies indeseadas de plantas o animales en los cultivos; estas sustancias son ampliamente utilizadas para proteger la producción y calidad de las cosechas de organismos que la amenazan, pues su aplicación es la medida más efectiva para el aumento de la productividad y rendimiento de los cultivos (Martínez y Gómez, 2007; Matheus y Bolaños, 2014). En Colombia la industrialización de pesticidas se inició hace unos 50 años atrás, el cual inició con un proceso

de formulación que consistía en mezclar uno o más ingredientes activos importados, con solventes y coadyuvantes (Nivia, 2004).

Estos productos químicos se clasifican según su blanco de acción como herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas, moluquicidas y rodenticidas; según la familia química a la cual pertenecen, basada en la estructura química, el modo de acción y las propiedades fisicoquímicas, en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides (Coalova et al., 2013; Isern, 2002) y otros compuestos inorgánicos que son utilizados como plaguicidas, como los metales pesados, los cuales también pueden inducir daños en los organismos vivos (El-Kady y AbdelWahhab, 2018).

Los plaguicidas organoclorados (OC), poseen una estructura que hace que tengan alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente soluble en disolventes orgánicos, favoreciendo su persistencia en el ambiente (OMS, 1990), así como también la contaminación de varios tejidos en humanos y mamíferos en general, pues debido a su alta lipofilia tienden a acumularse principalmente en el tejido celular subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y de la sangre (Saleh, 1994). En humanos, estas sustancias actúan principalmente a nivel de sistema nervioso, causando síntomas como convulsiones y en casos graves de intoxicación, la muerte por paro respiratorio (Martínez y Gómez, 2007), se consideran también, carcinógenos y mutágenos, asimismo tienen efecto sobre la reproducción, el sistema hormonal y el desarrollo embrionario en algunos organismos (Lacorte et al., 2018).

Los compuestos organofosforados (OF), se encuentran dentro de los productos de uso agrícola más utilizados a nivel mundial, son ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico, fosfónico y fosforico. A esta familia química de pesticidas pertenecen productos como Curacron, Latigo, Monocrotofos, Trivia y Roundup. A diferencia de los OC, estos

compuestos tienen mayor facilidad para descomponerse, se degradan por oxidación e hidrólisis, lo que los hace solubles en agua, menos persistentes y con baja acumulación en el organismo humano (OMS, 1993; Saleh, 1994, Dahiri, 2018). Sin embargo, se ha descrito que tiene propiedades alquilantes, lo cual es de mucha importancia desde el punto de vista de la mutagénesis, puesto que añade grupos alquilo, metilo y etilo a las bases nitrogenadas (Martínez y Gómez, 2007), provocando cambios en la expresión génica, los cuales pueden ser transmitidos a generaciones posteriores o servir como base para el desarrollo de enfermedades a largo plazo (Weinhold, 2006). Ojha y Gupta, en el 2016, realizaron un estudio *in vitro* en linfocitos de ratas, expuestos a dosis de compuestos organofosforados, demostrando que la exposición a estos compuestos induce estrés oxidativo en la célula, causando daños en el ADN por oxidación de purinas e induciendo roturas de cadena simples y dobles, sugiriendo que el estrés oxidativo juega un importante papel en la genotoxicidad inducida por pesticidas OF.

Los pesticidas carbamatos (C) forman otro grupo de plaguicidas, que pueden ser de tres tipos principales: a) derivados de ésteres carbamatados, generalmente usados como insecticidas; b) derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas, y c) carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas. Son inestables, a comparación de los grupos anteriores, por lo tanto, son poco persistentes en el ambiente. Se degradan por oxidación y sus metabolitos pueden ser excretados por la orina y heces fecales (OMS, 1993; Saleh, 1994), sin embargo, algunos compuestos de carbamatos contienen tiourea de etileno (ETU), el cual, mediante bioensayos en roedores se demostró que tiene la capacidad para inducir el desarrollo de tumores (Chhabra, Eustis, Haseman, Kurtz & Carlton, 1992). Entre los carbamatos más comunes se encuentran Furadan y Lannate.

Las piretrinas, son compuestos derivados de extractos naturales de pireto obtenido de las flores del género *Chrysanthemum*. Las principales piretrinas son las cinerinas I y II, las jasmolinas I y II, y las piretrinas I y II, estas últimas se considera que tienen efecto más potente. Las moléculas de piretrinas son neuroactivas, de baja absorción dérmica, con metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera, (Saleh, 1994). De las piretrinas surgieron los piretroides (P), que son piretrinas sintéticas, otorgando una mayor efectividad. Químicamente se dividen en dos tipos: sin grupo alfaciano y con grupo alfaciano. Todos se metabolizan por hidrólisis, oxidación y conjugación, son poco acumulables en los tejidos, y se degradan de manera más rápida en el ambiente, debido a esto tienen una baja toxicidad para los mamíferos (Saleh, 1994; Nasuti, Falcioni, Nwankwo, Cantalamessa, & Gabbianelli, 2008). Dentro de este grupo de plaguicidas están los productos Karate, Engeo y Arrivo.

La aplicación de estos agroquímicos intrínsecamente tóxicos tiene la capacidad de contactar con otros organismos, afectando así la salud pública y el ambiente (Butinof, 2017), pues a causa de su toxicidad, la utilización de estos trae consigo riesgos para la salud humana, ya que estas sustancias pueden penetrar en el cuerpo mediante ingestión, inhalación o absorción dérmica (Bartual y Berenguer, s.f.).

Los agricultores que a diario realizan la actividad de fumigación de los cultivos, están expuestos a una mezcla compleja de insecticidas organofosforados, piretroides y organoclorados, así como también a fungicidas y herbicidas (Angerer, et al., 2007), los cuales han sido asociados con el desarrollo del cáncer, enfermedades crónicas, enfermedades degenerativas y malformaciones congénitas, esto como consecuencia de los efectos genotóxicos que inducen estos productos (Bolognesi, 2003; Bhali, et al., 2009). Dicha toxicidad varía considerablemente

según el grado de envenenamiento, vía de absorción de la sustancia y algunos factores como la edad, sexo y la salud en general (Angerer, et al. 2007; Hodgson, 1999; da Silva et al., 2008).

No obstante, las consecuencias por la exposición mencionadas anteriormente no siempre están relacionadas con lesiones inmediatas y aparentes, pues estas pueden tardar mucho tiempo en manifestarse (Larrea et al., 2010), por lo que se han realizado estudios de biomonitorización para evaluar los efectos genotóxicos en poblaciones expuestas a pesticidas. En Estados Unidos, Anwar y colaboradores (1997), encontraron una alta frecuencia de rompimientos cromatídicos en un grupo de agricultores, en comparación con el grupo control; por otra parte, en Italia, un estudio realizado por Bolognesi y colaboradores (1993), se evidenció un incremento en la formación de micronúcleos en floricultores expuestos constantemente a plaguicidas; asimismo Joksic y colaboradores (1997), en Yugoslavia, revelaron que la exposición directa a pesticidas causa una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas. De la misma manera, se han realizado estudios para evaluar si estos agroquímicos son capaces de inducir mutaciones, ya que pueden dañar la línea germinal, lo que conlleva a problemas de fertilidad y la herencia de las mutaciones a generaciones futuras, presentándose como mutaciones puntuales, donde solo se modifica una base única, grandes deleciones o reordenamientos en el ADN, rupturas o reordenamientos cromosómicos, o ganancia o pérdida de cromosomas enteros (Mortelmans y Zeiger, 2000).

## **2.2. Genotoxicidad por exposición a pesticidas**

Como se ha mencionado, la exposición ocupacional a los productos químicos ha sido relacionado con efectos adversos en la salud de los trabajadores directamente expuestos a los agroquímicos, siendo uno de los efectos más relevantes el daño genotóxico, ya que dicho daño

puede inducir al desarrollo de diferentes tipos de cáncer o daños reproductivos (Calao y Marrugo, 2015). Así pues, para detectar los daños ocasionados por estos agroquímicos, se realizan ensayos de genotoxicidad buscando establecer relación entre la exposición a estos compuestos y la inducción de alteraciones genéticas (Arnaiz, s.f.).

Los daños genéticos causados por la exposición a pesticidas pueden ser, premutagénicos, los cuales pueden repararse antes de la división celular; mutagénicos o aberraciones cromosómicas, estos últimos permanentes y con capacidad de ser transmitidos a las células hijas después de la división celular (Guy, 2005). Estos daños pueden llevar al desarrollo de diferentes neoplasias: linfomas, sarcomas de partes blandas, y diferentes tipos de cáncer, como cáncer de mama, de próstata, cáncer de pulmón, de cerebro, colorrectal, cáncer de testículo, de páncreas, de esófago, de estómago y cáncer de piel (Peláez, 2004; Mostafalou y Abdollahi, 2013).

Hace unos 50 años aproximadamente, se dieron los primeros informes sobre la relación plaguicida/cáncer, ya que se evidenció una mayor prevalencia de cáncer de pulmón y de piel en agricultores que usaban insecticidas en campos de uva (Penel y Vansteene, 2007). Sierra et al. (1998), en Colombia, evidenciaron la actividad mutagénica de un insecticida ampliamente utilizado en el país, evaluada mediante el test de Ames. Peláez et al. (2004), reportaron que agricultores frecuentemente expuestos a pesticidas, presentaron una mayor probabilidad de desarrollar cáncer urotelial vesical, siendo el riesgo superior conforme incrementó el tiempo de exposición. En 2006, 2007 y 2008, Van Maele et al., reportaron que la exposición a los agroquímicos es un posible factor de riesgo para el cáncer de próstata y la leucemia, mediante un análisis de las estimaciones de riesgo en trabajadores de fabricación de pesticidas.

Por tal motivo, en los últimos años se han venido realizando trabajos con el objetivo de evaluar daños provocados por agentes químicos, utilizando biomarcadores de genotoxicidad, los

cuales han resultado buenos parámetros para analizar el potencial de riesgo de una sustancia, ya que han revelado información sobre el daño causado en el ADN, considerando ser muy eficientes biomarcadores ya que permiten evaluar la capacidad nociva de una sustancia (Coalova, et al., 2013; Mudry, y Carballo, 2006). Los biomarcadores más utilizados para análisis de genotoxicidad se encuentran la frecuencia de micronúcleos (MN), aberraciones cromosómicas (AC), el índice de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo cometa (EC), principalmente para estos ensayos los sistemas celulares más utilizados son los linfocitos de sangre periférica y las células de la mucosa bucal (Coalova, et al., 2013).

Los ensayos de ICH y EC han sido de mucha utilidad en estudios de este tipo ya que presentan una alta sensibilidad para detectar daños crónicos y agudos, respectivamente, además de que son ensayos que se pueden realizar en tiempos cortos (Ascarrunz et al., 2006). Por tanto, emplear los biomarcadores genéticos anteriormente mencionados, es importante ya que por medio de estos se pueden evaluar exposiciones que posiblemente lleven a causar enfermedades. También, se pueden encontrar factores genéticos o adquiridos que pueden cambiar la susceptibilidad de un individuo hacia una enfermedad o desarrollar un tipo de cáncer, lo cual aporta al diseño de estrategias de intervención, prevención y promoción en el área de la salud (Gentile et al., 2016).

La realización de las investigaciones en esta área es de mucha importancia a nivel social, ya que revela el reconocimiento temprano de factores carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en personas que están ocupacionalmente expuestas a agentes genotóxicos (Martínez y Gómez, 2007). Es así como se ha evidenciado en diversos estudios, la relación existente entre el tiempo de exposición y el incremento en los daños en la molécula de transmisión de la información, el ADN. En un estudio realizado por Noriega y colaboradores, en

el año 2005, con ratones expuestos al pesticida metamidofos, observaron que este, incrementó el número de micronúcleos en la célula, conforme incrementaba la exposición al mismo, sugiriendo que el compuesto químico evaluado es altamente genotóxico, provocando graves daños en la molécula de ADN. En trabajadores rurales, expuestos a compuestos químicos, se observaron altos niveles de roturas de cromátidas y cromosomas, presentándose diferencias altamente significativas entre el grupo de expuestos y el grupo control, lo que pone en manifiesto que las exposiciones constantes a plaguicidas presentan un alto riesgo para la salud humana (Mañas et al., 2009).

Igualmente, en un biomonitoreo realizado en una población rural expuesta a plaguicidas, hallaron una diferencia significativa en el índice de daño evaluado a través del ensayo cometa, entre las poblaciones expuestas directa e indirectamente, frente a la población control. Estos resultados muestran que las exposiciones a plaguicidas ya sean directa o indirectamente, causan graves daños genotóxicos (Simoniello et al., 2007). En otro de los estudios realizados en personas expuestas a plaguicidas, los resultados mostraron niveles altos de toxicidad en el ADN, este daño provocado, posiblemente pueda volverse irreversible por la saturación de los sistemas de reparación del ADN y en el futuro desarrollar diversos tipos de cáncer (Peralta et al., 2011). Ascarrunz y colaboradores (2006), reportaron valores significativamente altos de Intercambio de cromátidas Hermanas, Aberraciones Cromosómicas, en relación con el grupo control, siendo este resultado, un aporte más a la literatura, donde se ha confirmado la alta toxicidad que causan los pesticidas en el ADN.

En Colombia, el uso de plaguicidas en la actividad agrícola ha venido aumentando significativamente, es por esto por lo que se han realizado estudios para evaluar los efectos que dichos compuestos químicos causan en la población humana. Monroy y colaboradores, en el

2005, en estudios in vitro en células humanas expuestas al Glifosato, herbicida ampliamente utilizado en Colombia para la erradicación de cultivos ilícitos, con la prueba del ensayo cometa, demostraron que este pesticida provoca un incremento significativo del daño en el ADN, teniendo en cuenta parámetros como la longitud de la cola del cometa y la morfología de este. En el año 2009, se realizó una evaluación de los efectos causados por plaguicidas en la salud humana en zonas donde hubo erradicación de cultivos ilícitos, con los resultados que aquí se obtuvieron, se puso en manifiesto los riesgos asociados al uso y exposición de los plaguicidas y la necesidad de fortalecer la vigilancia en salud pública sobre los potenciales efectos adversos sobre la salud que pueden producir estas sustancias químicas (Varona et al., 2009).

En investigaciones recientes, se han observado, altos índices de genotoxicidad en los individuos estudiados. Pabuena (2014), evidenció daño genotóxico significativamente alto en linfocitos humanos expuestos a distintas dosis de extractos de fresa sometidas a fumigación, esto utilizando pruebas de EC e ICH. Por otra parte, Yañez et al. (2017), demostró que existe efecto genotóxico en linfocitos humanos expuestos a distintas dosis de extractos de duraznos, el cual dependía de la concentración de la dosis aplicada.

Igualmente, otros estudios han manifestado el riesgo que presenta la exposición a plaguicidas, pues han demostrado la actividad mutagénica de los productos químicos indicados por la presencia de aberraciones cromosómicas (Antonucci y Colus 2000, Bolognesi, 2003, Ergene 2007). Por lo tanto, la identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones se ha convertido en un tema de mucha importancia en el área de la investigación, pues los químicos mutágenos también son capaces de inducir cáncer, lo que ha generado preocupación y ha impulsado la realización de programas de prueba de mutagenicidad (Mortelmans y Zeiger, 2000).

En la actualidad, la exposición a estos productos químicos es considerada como uno de los factores de riesgo más importantes para la expansión del cáncer, motivo por el cual, antes de permitir la comercialización de uno de estos productos, se desarrollan pruebas de carcinogenicidad para detectar su potencial carcinógeno (Mostafalou y Abdollahi, 2013).

### **2.3. Ensayo Cometa (EC): Electroforesis alcalina en gel de células individuales**

El ensayo cometa, es una técnica ampliamente utilizada para la detección de rupturas de una o dos hebras del ADN, errores en la reparación por escisión y enlaces cruzados en células individuales, caracterizándose por ser un método altamente sensible, rápido y sencillo (Cenkci et al. 2010; MckelveyMartin et al. 1993).

Esta técnica se empezó a llevar a cabo hacia los años 70, cuando Peter Cook y colaboradores desarrollaron una técnica basada en la lisis de las células con detergentes no iónicos y cloruro de sodio a alta molaridad. Años después, Rydberg y Johanson (1978), introdujeron el uso de la electroforesis, donde utilizaron células de hámster embebidas en agarosas, que luego de ser sometidas a lisis en un medio alcalino, las cadenas de ADN se podían visualizar con naranja de acridina. El método fue modificado por Östling y Johanson en 1984, siendo la primera técnica de electroforesis en microgeles para detectar el daño al ADN a nivel de células individuales. Sin embargo, esta técnica se realizaba en condiciones neutrales, lo que limitaba la utilidad del ensayo, por esta razón, en 1988, Singh y colaboradores, modificaron la técnica involucrando la electroforesis en condiciones alcalinas.

La técnica consiste en cuantificar el daño en el ADN de células que son embebidas en agarosa que posteriormente son lisadas, para finalmente someterlas a una electroforesis en pH

alcalino, logrando con esto, que los fragmentos de cromosomas se dirijan al ánodo y se revelen como la cola de un cometa, las cuales se pueden visualizar al ser teñidas con un colorante fluorescente (Tice et al., 2000). Esta capacidad de migración que se evidencia está sujeta a la cantidad de rompimientos producidos por el agente que se está evaluando (Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2001).

Este ensayo presenta la ventaja de que, al ser a nivel de células individuales, provee información de la distribución intercelular del daño y de la reparación, asimismo, se requiere un número pequeño de células para realizar la técnica y se puede utilizar cualquier población de células eucariotas (Tice et al. 2000, Di Giorgio et al. 2001, Frenzilli et al. 2009). Además de esto, se ha reportado que presentan una mayor sensibilidad de detección del daño comparándolos con otro tipo de pruebas de genotoxicidad (He et al., 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1.General

- Determinar la genotoxicidad en el material genético de agricultores expuestos laboralmente a pesticidas en el municipio de Ábrego, Norte de Santander.

#### 3.2.Específicos

- Determinar mediante el ensayo cometa (EC), la genotoxicidad inducida por pesticidas en muestra de sangre total de agricultores del municipio de Ábrego, Norte de Santander.
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* en linfocitos humanos inducida por pesticidas de uso común por los agricultores del municipio de Ábrego, Norte de Santander.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Área de estudio

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en cuatro zonas del área rural del municipio de Ábrego, ubicado en el departamento Norte de Santander, con coordenadas  $8^{\circ} 07' 34''$  latitud norte  $73^{\circ} 19' 56''$  y longitud oeste, a 1398 m de altura. Veredas San Miguel, El Salado, Santa Lucía y Casa de Teja (Figura 2).

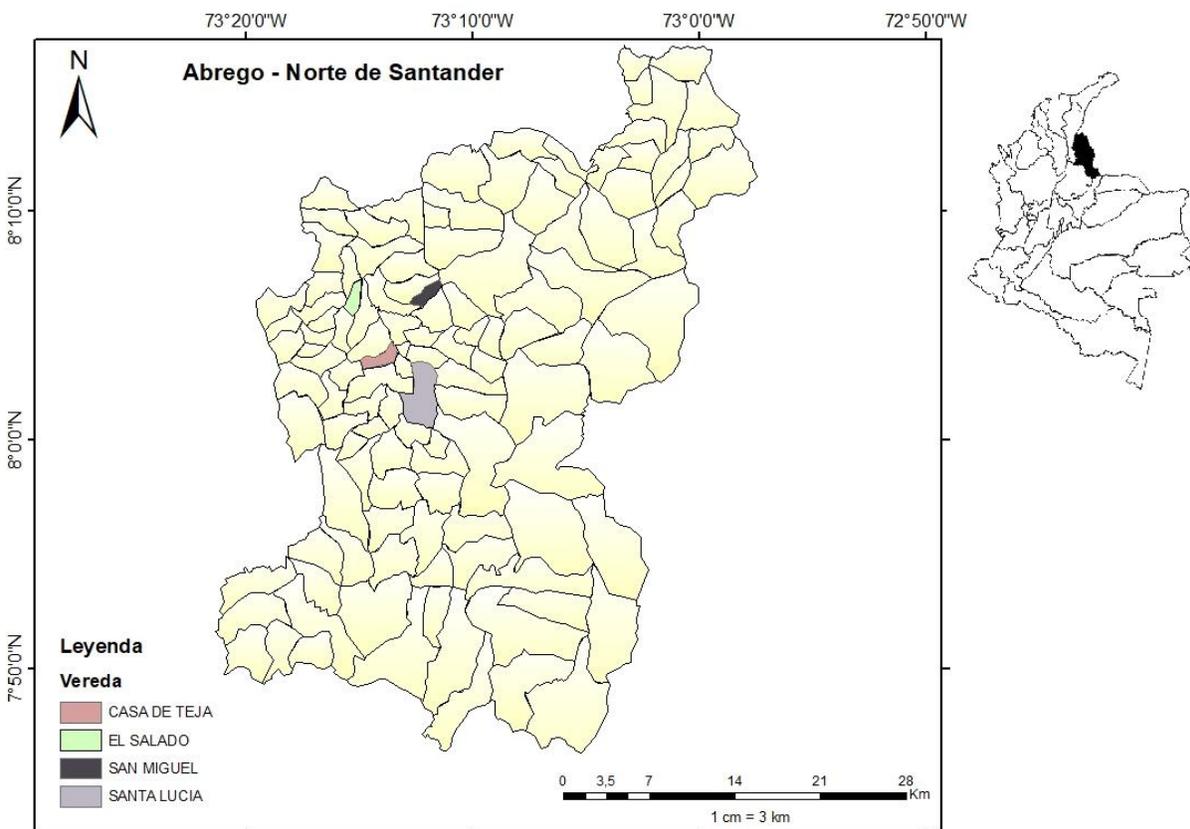


Figura 2. Área de estudio. Veredas municipio de Ábrego, Norte de Santander.

Fuente inédita: Álvarez, Y. (2019).

## 4.2. Obtención y transporte de las muestras

Se tomaron muestras de sangre a 30 agricultores, a los cuales inicialmente se les brindó información del proyecto, alcances y objetivos de este, posteriormente se solicitó su consentimiento para la toma de sangre y se procedió a tomar la muestra, procedimiento que fue realizado por una persona capacitada para la extracción de sangre, se hizo una encuesta a cada uno de los agricultores para obtener información de edad, tiempo y frecuencia de exposición, antecedentes de cáncer, enfermedades respiratorias, reciente exposición a otro tipo de riesgo ocupacional; igualmente se solicitó información sobre hábitos de vida como, consumo de alcohol y cigarrillo, hábitos alimenticios y ejercicio. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en una caba con geles refrigerantes para su preservación a una temperatura adecuada durante el traslado al laboratorio de Mutagénesis de la Universidad de Pamplona-Colombia, para su procesamiento (Figura 3). Para los controles positivo y negativo se tomó una muestra de sangre adicional de una persona no expuesta a pesticidas.



Figura 3. Obtención y transporte de muestras de sangre.

Fotografías por: Verjel, M (2018).

### **4.3.Detección de daño Genotóxico por Ensayo cometa**

#### **4.3.1. EC con sangre total de Agricultores expuestos**

Para cumplir con el primer objetivo de la investigación, se utilizaron muestras de sangre total periférica de los agricultores expuestos ocupacionalmente a los pesticidas para evaluar el daño en el ADN utilizando el ensayo Cometa, siguiendo la metodología propuesta por (Singh et al., 1988) y modificada por (Pandurangi, Ralph, & Vrzoc, 1995). Cada muestra se hizo por duplicado. Se utilizaron 15 µL de muestra de sangre total, se le adicionó 1 mL de PBS y se centrifugó por 2 minutos a 3000 RPM y se descartó el sobrenadante. El pellet se mezcló con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 0,5% a 47°C y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%, cubriéndose con un cubreobjetos y se refrigeró a 4°C por 6 minutos; luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, y nuevamente se refrigeró a 4°C por 6 minutos. Se sumergieron las placas en solución de lisis (sarcosinato de Na 1%, NaCl 2.5 M; Na<sub>2</sub> - EDTA, 100 mM, tris 10mM; pH 10 y triton x100, 1%) por 1 hora a 4°C. Las placas se lavaron con PBS y se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal con un buffer pH>13 (H<sub>2</sub>O, EDTA 1mM y NaOH 300 mM) y se incubó por 30 minutos para la desnaturalización del ADN y optimizar la ruptura de los sitiosapurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos, luego se corrió a 25V y 250 mA por 30 minutos. Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante (tris 0,4 M pH 7,5) por 5 minutos y posteriormente fijados con metanol, se tiñeron con 50 µL de Bromuro de etidio (0.02mg/mL) para realizar las observaciones en un microscopio de fluorescencia (Olimpus Cx41) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

Como control negativo, se utilizó la muestra de sangre de una persona, joven, saludable y no expuesta a agroquímicos; como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  25 mM).

La ocurrencia de daño en el ADN se determinó mediante el uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5) basado en las mediciones de la longitud total del cometa.

#### **4.3.2. Determinación *in vitro* del daño genotóxico inducido por pesticidas de uso común por los agricultores de la región**

##### *4.3.2.1. Obtención de linfocitos*

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de una persona joven, saludable, no fumador, no deportista de alto rendimiento y sin ningún tipo de tratamiento clínico. Se tomaron 5 mL de sangre en un tubo vacutainer con heparina de sodio, como anticoagulante, se mezclaron con 5 mL de Buffer fosfato de sodio (PBS). En un tubo aparte, se adicionaron 3 mL de Hystopaque 1077 de Sigma y se agregó lentamente por las paredes, evitando la turbulencia, seguidamente se centrifugó durante 30 minutos a 2.000 rpm tomando como resultado la capa de linfocitos (nube blanca, encima de la capa de Hystopaque) y se pasó a otro tubo limpio y seco, para realizar el conteo y determinar la viabilidad celular. El conteo se realizó en un hemocitómetro contando las células que se encontraban en los cuadrantes, para tener el dato de la cantidad de células por mL (Ecuación 1).

**Ecuación 1.** Cantidad de células/mL = (Promedio de células de los 4 cuadrantes) \*  $10^5$

#### *4.3.2.2. Determinación de dosis subtóxicas*

Con cada uno de los pesticidas, Folicur, Glifosol, Arrivo, Cobrethane y Monocrotofos, se ensayaron concentraciones distintas, pues cada producto presenta un nivel de toxicidad diferente. Inicialmente se utilizaron concentraciones de 75%, 50%, 25% y 12,5% para los 5 pesticidas, sin embargo, se evidenció toxicidad superior al 90% en todos tratamientos, por lo cual se dedujo que los pesticidas a estas concentraciones inducen alto daño celular, por lo tanto, se ensayó con concentraciones menores hasta que las células fueran viables para continuar con el ensayo.

#### *4.3.2.3. Prueba de citotoxicidad mediante exclusión con el colorante azul de tripano*

El azul de tripano es un colorante empleado para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. Este colorante es imprescindible para la diferenciación entre células muertas (con disrupción membranal), de las vivas con membranas íntegras. Cuando las células nucleadas o linfocitos fueron expuestas a las diferentes concentraciones empleadas de los pesticidas, esta técnica permitió observar y cuantificar la toxicidad sobre la membrana celular.

Se utilizó el protocolo descrito por Strober (2001), con algunas modificaciones. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular antes y después de la incubación de los tratamientos, tomando 50  $\mu$ L del colorante azul de tripano 0,4% y 50  $\mu$ L de suspensión celular, se dejó reposar durante 5 minutos y se observó en un microscopio convencional, se contaron 100 células en cada una de las dos repeticiones para determinar viabilidad celular (Ecuación 2). Los datos se presentan como el valor medio obtenido para el porcentaje de viabilidad celular y el error estándar de la media.

$$\text{ECUACIÓN 2. \%viabilidad celular} = \frac{\text{Número total de células vivas}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: Folicur: 0,25%, 0,12% y 0,06%; Glifosol: 1%, 0,50% y 0,25%; Arrivo: 2,5%, 1,25% y 0,6%; Cobrethane: 0,5%, 0,25% y 0,12%; Monocrotofos 1%, 0,50% y 0,25%. Se trataron aproximadamente 300.000 células, a las cuales se les aplicó 50 µL del pesticida. El control negativo se realizó con PBS y el control positivo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM), cada experimento se realizó por duplicado. Posteriormente se incubaron los tratamientos a 37°C durante una hora.

Se utilizaron aproximadamente 15.000 células que se resuspendieron con 80 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 0,5% a 47°C y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%, cubriéndose con un cubreobjetos y se refrigeró a 4°C por 6 minutos; luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, y nuevamente se refrigeró a 4°C por 6 minutos. Seguido a esto, se lisan las células y se realiza la electroforesis (siguiendo el mismo procedimiento del punto 4.3.1.)

#### **4.4. Análisis Estadístico**

Para el análisis de los datos obtenidos en ambos objetivos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.I; se hizo un análisis de comparación múltiples, la prueba LSD de Fisher, con un nivel de significancia del 0,05. Los valores fueron expresados como la media, la desviación estándar

( $\bar{X} \pm DS$ ) y las pruebas se consideraron significativas ( $p \leq 0.05$ ). Los datos obtenidos fueron tabulados en el software Microsoft Excel.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinación de las dosis subtóxicas de los pesticidas

Las dosis subtoxicas de los diferentes pesticidas se establecieron mediante la técnica de exclusión con azul de tripano, la cual se utiliza para determinar la viabilidad de las células. Garantizando una viabilidad alta, aseguramos que el daño genotóxico cuantificado por el ensayo cometa sea debido al compuesto analizado y no a otros factores que conllevan a la muerte celular.

Fueron utilizadas distintas concentraciones con cada pesticida, debido a que cada uno tienen un nivel de toxicidad distinto, es así como cada plaguicida cuenta con una clasificación toxicológica (Tabla 1).

Tabla 1. *Clasificación toxicológica de los pesticidas a los que fueron expuestos los linfocitos.*

<b>Pesticida</b>	<b>Categoría toxicológica según la OMS</b>	<b>Clasificación de peligro</b>
<b>Monocrotofos</b>	I b – Muy Peligroso	TÓXICO
<b>Arrivo</b>	II – Moderadamente Peligroso	NOCIVO
<b>Folicur</b>	II – Moderadamente Peligroso	NOCIVO
<b>Cobrethane</b>	III – Poco Peligroso	CUIDADO
<b>Glifosol</b>	IV Productos que normalmente no ofrecen peligro	

La viabilidad de los linfocitos expuestos a los diferentes pesticidas antes de someterlos al tratamiento se observa en la figura 4, con las tres dosis evaluadas. Se observa que el porcentaje de viabilidad no disminuyó del 85%, lo que indica que se está trabajando con una población celular óptima. Podemos observar que el glifosol fue el único pesticida que mostró la viabilidad

más baja en su concentración mayor, a diferencia de folicur, cobrethane, monocrotofos y arrivo que mostraron viabilidades entre el 94 y 99%.

#### Viabilidad celular de los linfocitos antes del tratamiento



Figura 4. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos antes del tratamiento con los pesticidas.

Fuente: Verjel, M. (2019)

En la figura 5, se puede observar la viabilidad celular después de incubar por una hora los diferentes tratamientos y controles.

Se puede observar que, aunque la viabilidad disminuyó comparado con las células antes del tratamiento, el porcentaje de mortalidad no superó el 20%, lo cual nos garantiza que la

genotoxicidad cuantificada es debida únicamente a los tratamientos. Como se observa en las figuras 4 y 5 el pesticida Folicur fue el que presentó una mayor citotoxicidad, aun cuando se utilizaron menores concentraciones comparado con los demás plaguicidas. Además, se observó que la viabilidad disminuye a medida que se aumenta la dosis del pesticida, lo cual es evidencia de un efecto de dosis.

#### Viabilidad celular de los linfocitos después del tratamiento

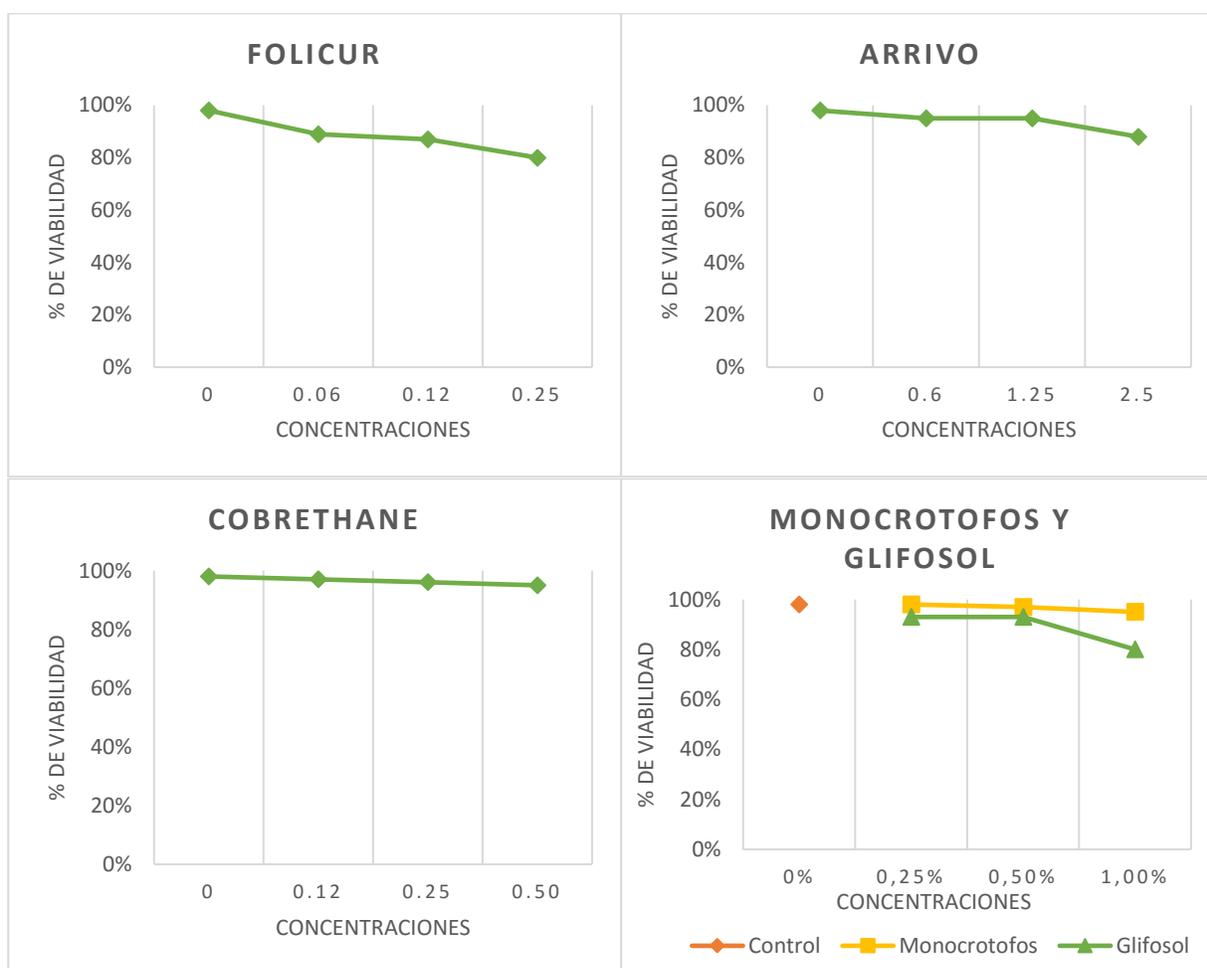


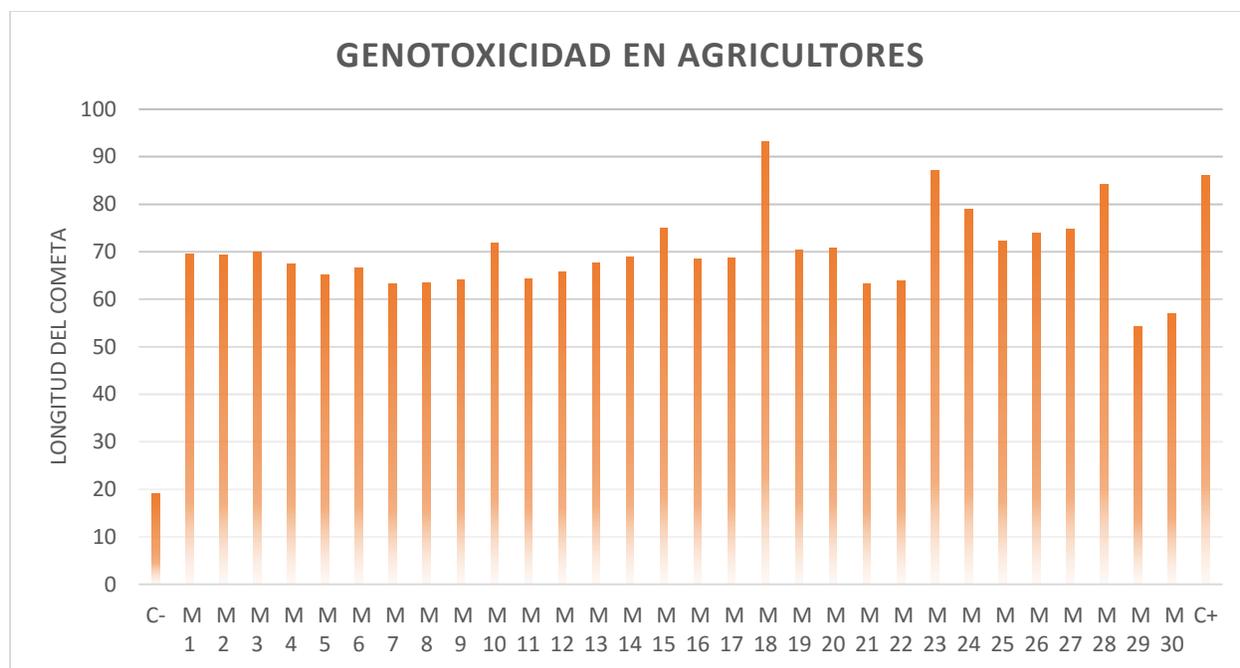
Figura 5. Porcentaje de viabilidad después de someter la incubación con los tratamientos.

Fuente: Verjel, M. (2019)

## 5.2. Daño genotóxico en Agricultores del municipio de Ábrego

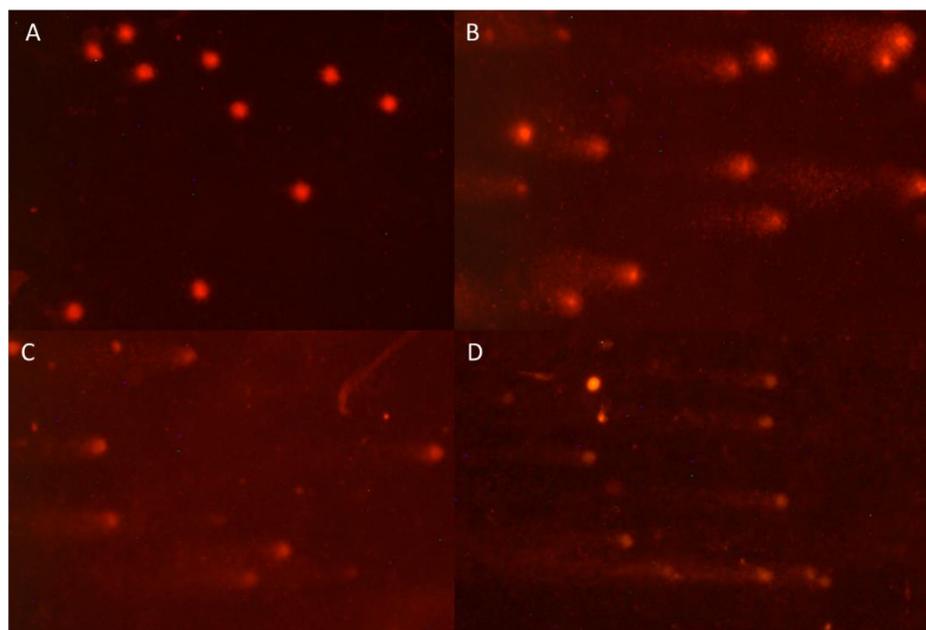
En la figura 6, se muestra el daño genotóxico de las 30 muestras analizadas de los agricultores expuestos laboralmente a pesticidas, cuantificado mediante el ensayo cometa. Este ensayo muestra la fragmentación del ADN, el cual es manifestado por la migración del mismo cuando se somete a electroforesis, formando una cola y dando la apariencia de un cometa (Figura 7). Como se observa en la figura 6, todos los individuos analizados muestran un daño genotóxico que supera más de tres veces el control negativo, lo cual es un indicativo de daño genotóxico en sus células debido a la exposición laboral. Además, se puede observar que los individuos 29 y 30 son los que menos daño genotóxico evidencian.

En la figura 7 se observan fotografías microscópicas con un aumento de 100X de diferentes tipos de daños genotóxicos, figura 7-A, corresponde a células de una persona que no está expuesta a pesticidas, la figura 7-B corresponde a células sometidas a un compuesto que se conoce induce daño genotóxico, como es el  $H_2O_2$ , y las figuras 7-CyD corresponden a células de individuos expuestos laboralmente. Se puede observar que, en cada uno de ellos, la longitud de la cola muestra diferencias.



*Figura 6.* Daño genotóxico presentado en células sanguíneas de Agricultores del Municipio de Ábrego, expresado en longitud total del cometa ( $\mu\text{m}$ ). C-: control negativo (PBS); M1 a M30: Muestras analizadas de los agricultores; C+: Control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  25mM).

Fuente: Verjel, M. (2019)



*Figura 7.* Daño genotóxico evidenciado en células de los Agricultores. (A) Control negativo, mostrando células sin daño o con poca migración. (B). Control positivo, se observó bastante migración de DNA debido al tratamiento con

Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (C) Muestra de 18 y (D) muestra 21 de agricultores del municipio, se observa migración del DNA debido a la exposición constante a los agroquímicos. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia con aumento de 100x.

Fuente: Verjel, M. (2019).

Para encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), se realizó una comparación de rangos múltiples con la longitud de los cometas de las 30 muestras analizadas y el control negativo (Tabla 2). Se identificaron 18 grupos homogéneos mediante el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, lo cual indica que las 30 muestras analizadas muestran diferencias significativas de daño genotóxico con respecto al control negativo.

En otras palabras, que el factor de riesgo, que en este caso es la exposición a pesticidas está induciendo un daño genotóxico que es estadísticamente significativo comparado con personas no expuestas al factor de riesgo.

Tabla 2. Comparaciones múltiples de las 30 muestras analizadas y el control negativo según la prueba LSD de Fisher.

	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>Control negativo</b>	1,906E7	X
<b>M29</b>	5,429E7	X
<b>M30</b>	5,692E7	X
<b>M7</b>	6,326E7	X
<b>M21</b>	6,327E7	X
<b>M8</b>	6,338E7	X
<b>M22</b>	6,395E7	X
<b>M9</b>	6,414E7	XX
<b>M11</b>	6,421E7	XX
<b>M5</b>	6,518E7	XXX
<b>M12</b>	6,567E7	XXX
<b>M6</b>	6,666E7	XXX
<b>M4</b>	6,753E7	XXX
<b>M13</b>	6,759E7	XXX
<b>M16</b>	6,847E7	XXX
<b>M17</b>	6,873E7	XXX
<b>M14</b>	6,898E7	XXX

<b>M2</b>	6,928E7	XX
<b>M1</b>	6,955E7	XXX
<b>M3</b>	6,988E7	XXXX
<b>M19</b>	7,03E7	XXX
<b>M20</b>	7,088E7	XXX
<b>M10</b>	7,185E7	XXX
<b>M25</b>	7,232E7	XXX
<b>M26</b>	7,39E7	XXX
<b>M27</b>	7,482E7	XX
<b>M15</b>	7,492E7	X
<b>M24</b>	7,89E7	X
<b>M28</b>	8,409E7	X
<b>M23</b>	8,718E7	X
<b>M18</b>	9,324E7	X

Fuente: Verjel, M. (2019)

Realizado el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 3), el cual descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de un grupo, arroja un valor de Fisher igual a 175,00, el cual nos indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 31 variables con un nivel de confianza del 95,0%, dado que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05.

Tabla 3. *Tabla Análisis de Varianza (ANOVA).*

	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrados medios	Fc	p-Valor
Entre grupos	4,40084E17	30	1,46695E16	175,00	0,0000
Dentro de grupos	2,57257E17	3069	8,38245E13		
Total	6,97342E17	3099			

Fuente: Verjel, M. (2019)

En la figura 8, se puede observar que el daño genotóxico obtenido en los linfocitos de los agricultores expuestos laboralmente, mostraron valores significativos con respecto a individuos no expuestos laboralmente (control negativo, señalado en círculo azul). Se observa que las

medias entre las muestras no están muy alejadas entre sí, con excepción de algunos valores que se dispersan un poco, como son las muestras 18, 23, 24 y 28 (señalados en círculo rojo), que mostraron longitudes de cometa más alta y las muestras 29 y 30 (señaladas en círculo verde), en las que se observaron las longitudes más bajas a comparación de las demás muestras analizadas.

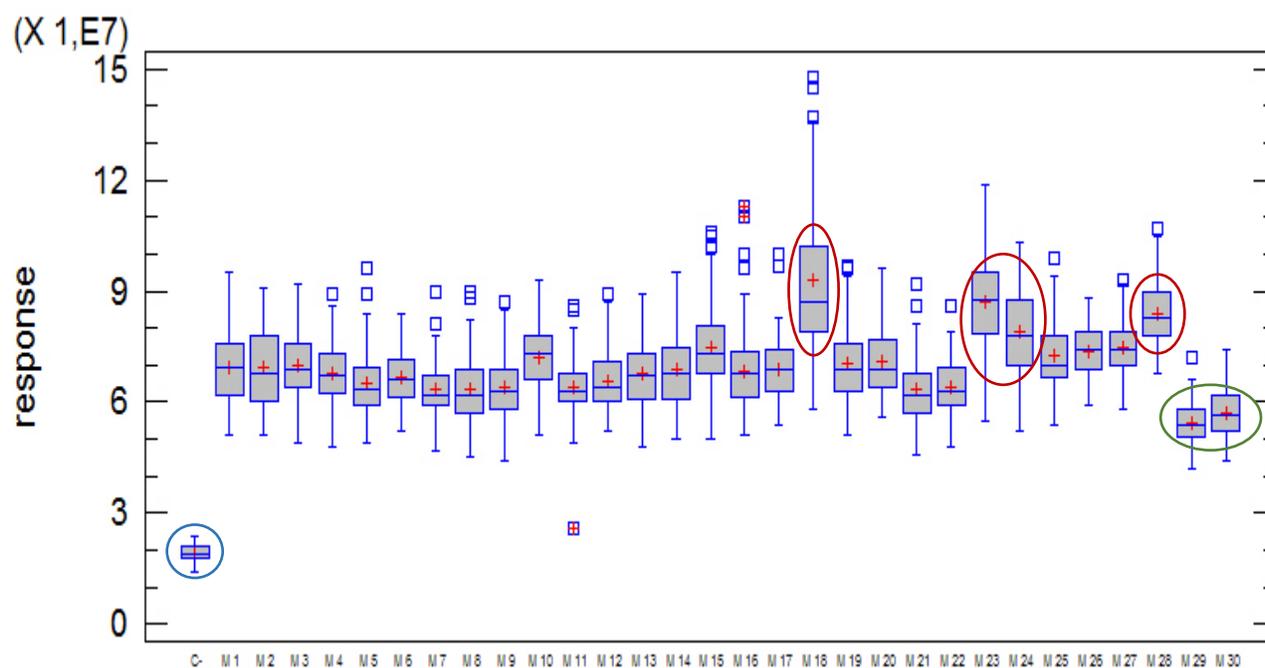


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes. Longitud de cometa de las 30 muestras de los Agricultores.

Fuente: Verjel, M. (2019)

Como en la metodología se tuvieron en cuenta otros factores diferentes a la exposición laboral, los cuales pueden influenciar la respuesta genotóxica (edad, frecuencia de exposición, tiempo de exposición, protección personal, consumo de alcohol y tabaco, hábitos alimenticios, ejercicios, exposición a rayos X, antecedentes de cáncer, enfermedad respiratoria, mezcla de pesticidas y tipo de pesticidas utilizados); se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar que factor se relaciona con el daño genotóxico evidenciado como longitud del cometa

y así establecer o relacionar factores que posiblemente indujeron junto con la exposición a pesticidas, el daño presentado en el ADN (Tabla 4). Como se evidencia en esta tabla, la mezcla y tipo de pesticidas que los Agricultores utilizan en el momento de realizar la fumigación de las cosechas, son los factores que más se relacionan con el daño genotóxico mostrado. La utilización de mezclas de pesticidas arroja un  $p$ -valor de 0,0382, y los tipos de pesticidas utilizados arrojó un  $p$ -valor de 0,0261, lo cual indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre estos factores y la longitud del cometa.

Tabla 4. Factores relacionados con el daño genotóxico presentado en los Agricultores.

<b>Daño genotóxico en Agricultores expuestos laboralmente a pesticidas</b>				
<b>Técnica estadística ANOVA:</b>				
<b>Longitud de cometa (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	<b>Promedios</b>	<b>P-valor</b>	<b>Interpretación</b>
Edad de los Agricultores	14 a 29 años	66,1111	0,2749	No existen diferencias significativas entre la longitud del cometa y la edad de los Agricultores.
	30 a 49 años	71,6154		
	>50 años	70,875		
Tiempo de exposición a los pesticidas	Menos de 5 años	67,0	0,1055	Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre el tiempo de exposición y la longitud del cometa.
	5 a 10 años	71,5		
	10 a 15 años	62,8		
	15 a 25 años	74,4286		
	25 a 35 años	73,4286		
	>40 años	66,6667		
Frecuencia de exposición	1 vez	67,7	0,6301	No hay diferencias significativas entre la frecuencia de exposición a los pesticidas y el daño en el ADN
	2 veces	68,2		
	3 veces	72,5		
	> 3 veces	70,7143		
Protección personal	Equipo completo	69,7143	0,1755	No hay diferencias significativas
	Ninguna	68,1111		
	Tapabocas	75,8		
Consumo de Alcohol	1 vez a la semana	67,125	0,2930	No hay diferencias significativas
	Esporádicamente	73,5455		
	No consume	67,9		
	Varias veces por semana	68,0		
Antecedentes de Cáncer	NO	69,9167	0,9359	No hay diferencias significativas
	SI	69,6667		
Exposición a rayos X	NO	69,8095	0,9657	No hay diferencias significativas
	SI	69,6667		
	NO	69,7692	0,9966	No hay diferencias significativas

Enfermedad respiratoria	SI	69,75		
Ejercicio	1 vez a la semana	70,0	0,5328	No hay diferencias significativas
	No practica	73,3333		
	Todos los días	63,6667		
	Varias veces por semana	70,0909		
Mezcla de pesticidas	2	69,3077	<b>0,0382</b>	Estadísticamente existen diferencias significativas entre la mezcla de pesticidas utilizada por los agricultores y la longitud del cometa.
	3	63,5		
	>4	73,7273		
Tipo de pesticidas utilizados (grupo químico)	C-OF-P	74,0	<b>0,0261</b>	Hay diferencias significativas entre el tipo de pesticidas que utilizan los agricultores y la longitud del cometa.
	Otros	67,6429		
	Otros-C	54,0		
	Otros-OF	75,0		
	Otros-OF-C	67,3333		
	Otros-P	68,75		
	Otros-P-C-OF	83,0		

C: Carbamatos; OF: Organofosforados; P: Piretroides.

Fuente: Verjel, M. (2019).

El daño genotóxico se dividió en distintos niveles según la longitud del cometa, para establecer estos rangos, se toma como referencia el valor promedio del control negativo que para nuestro caso fue de 20  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con lo anterior, los rangos de daño establecidos fueron los siguientes: de 0 a 20  $\mu\text{m}$  daño tipo 0 = sin daño; 21 a 40  $\mu\text{m}$  daño tipo 1 = daño bajo; de 41 a 60  $\mu\text{m}$  daño tipo 2= daño medio; y mayor a 60  $\mu\text{m}$ , daño tipo 3= daño alto.

Como se observa en la tabla 5, el tipo de daño cuantificado en el control negativo corresponde a la categoría 0 (70%) y categoría 1 (30%), también podemos observar que, en los individuos expuestos laboralmente, el tipo de daño más frecuente es de las categorías 2 y 3.

Tabla 5. Nivel de daño genotóxico evidenciado en 30 agricultores del municipio de Ábrego.

Muestra	Promedio $\pm$ DS (Longitud del cometa $\mu\text{m}$ )	Tipo de Daño				% de células dañadas
		0	1	2	3	

<b>Control negativo</b>	19,06± 2,17	70	30	0	0	30
<b>M1</b>	69,55± 9,93	0	0	21	79	100
<b>M2</b>	69,28± 10,17	0	0	23	77	100
<b>M3</b>	69,88± 9,83	0	0	19	81	100
<b>M4</b>	67,53± 7,71	0	0	16	84	100
<b>M5</b>	65,18± 8,40	0	0	29	71	100
<b>M6</b>	66,66± 7,79	0	0	23	77	100
<b>M7</b>	63,26± 6,51	0	0	35	65	100
<b>M8</b>	63,38± 9,27	0	0	41	59	100
<b>M9</b>	64,14± 9,11	0	0	36	64	100
<b>M10</b>	71,85± 9,17	0	0	13	87	100
<b>M11</b>	64,21± 7,68	0	1	29	70	100
<b>M12</b>	65,67± 7,90	0	0	27	73	100
<b>M13</b>	67,59± 8,08	0	0	20	80	100
<b>M14</b>	68,98± 9,92	0	0	17	83	100
<b>M15</b>	74,92± 11,66	0	0	7	93	100
<b>M16</b>	68,47± 10,69	0	0	19	81	100
<b>M17</b>	68,73± 8,12	0	0	15	85	100

<b>M18</b>	93,24± 18,86	0	0	1	99	100
<b>M19</b>	70,3± 8,99	0	0	7	93	100
<b>M20</b>	70,88± 9,27	0	0	14	86	100
<b>M21</b>	63,27± 8,24	0	0	39	61	100
<b>M22</b>	63,95± 7,14	0	0	33	67	100
<b>M23</b>	87,18± 11,85	0	0	1	99	100
<b>M24</b>	78,9± 11,32	0	0	2	98	100
<b>M25</b>	72,32± 8,38	0	0	4	96	100
<b>M26</b>	73,9± 6,65	0	0	5	95	100
<b>M27</b>	74,82± 6,88	0	0	2	98	100
<b>M28</b>	84,09± 7,87	0	0	0	100	100
<b>M29</b>	54,29± 5,53	0	0	90	10	100
<b>M30</b>	56,92± 6,60	0	0	70	30	100

Fuente: Verjel, M. (2019).

Por cada muestra se analizaron 100 células, a las cuales se le hizo la medición de la longitud del cometa. Como se muestra en la figura 9, la mayoría de las células, muestran daño tipo 3.

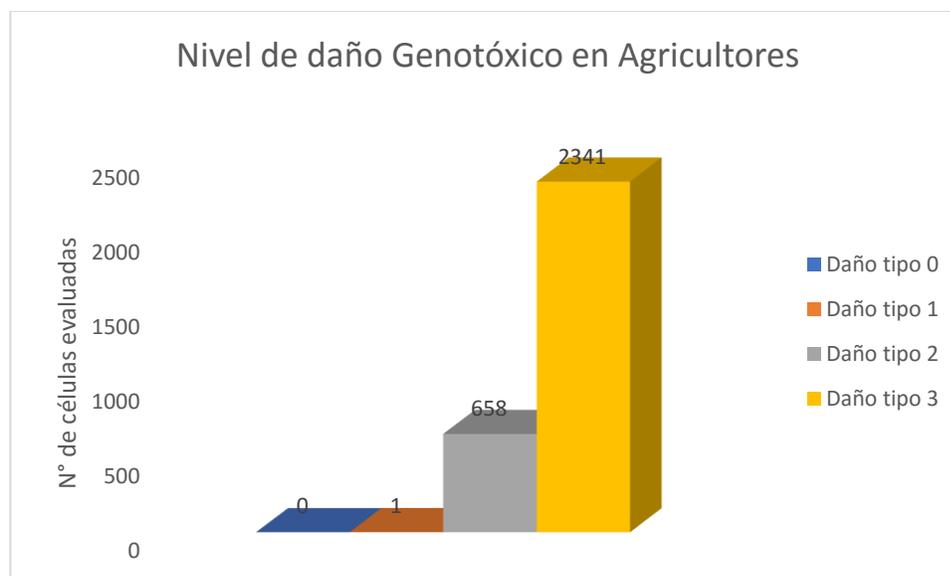


Figura 9. Tipo de daño genotóxico evidenciado en las células de los Agricultores.

Fuente: Verjel, M. (2019)

### 5.3. Genotoxicidad inducida por pesticidas de uso común en el municipio

En la figura 10 se muestran el tipo de pesticidas utilizados por los agricultores en el municipio, siendo los insecticidas organofosforados los que más uso tienen junto con otros tipos de plaguicidas que contienen metales pesados; de igual forma, los fungicidas carbamatos tienen una amplia demanda en el municipio.

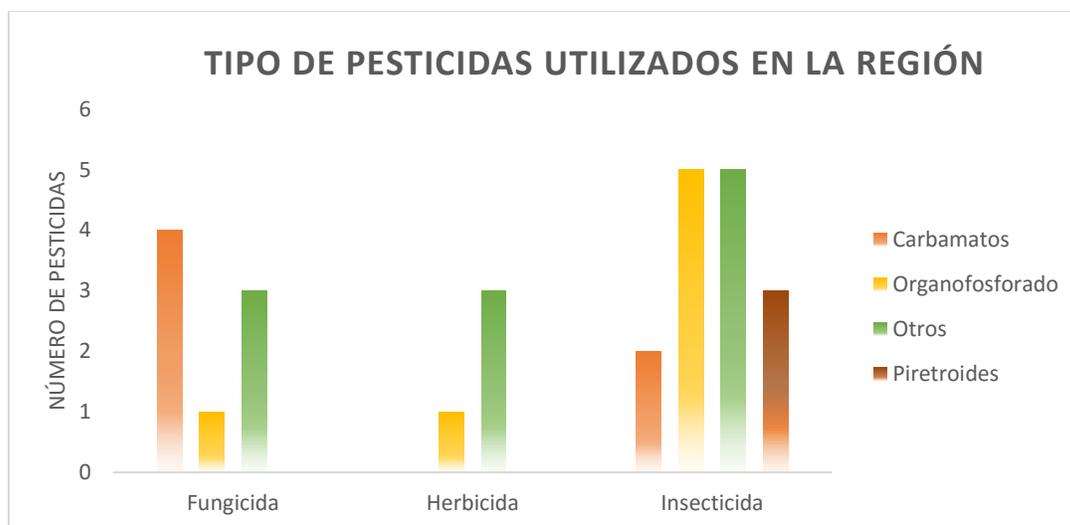
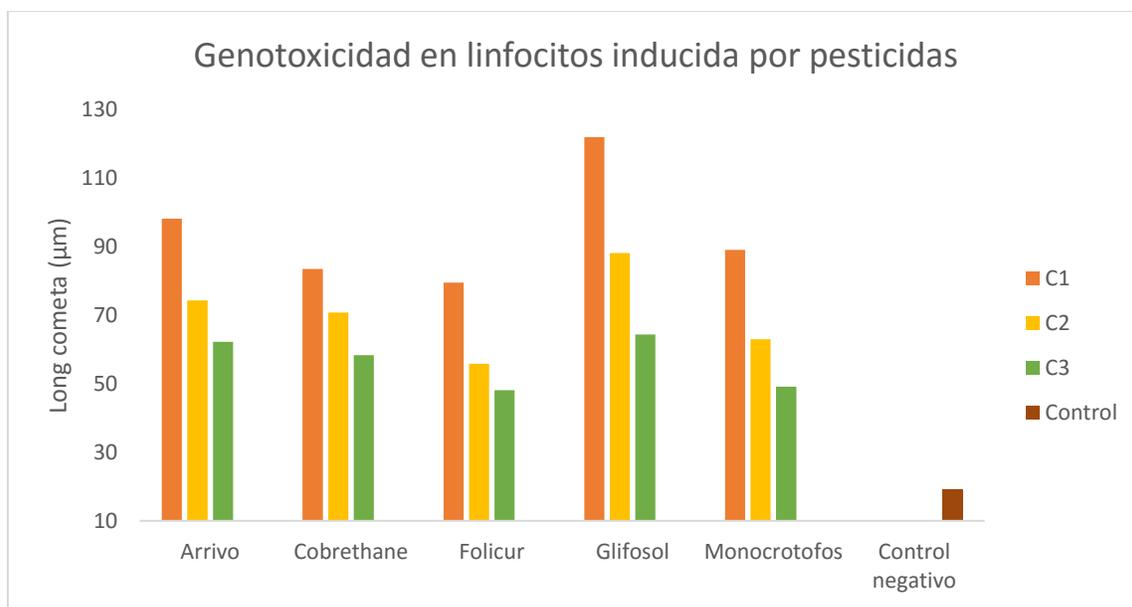


Figura 10. Tipo de pesticidas utilizados por los Agricultores. Por blanco de acción y grupo químico.

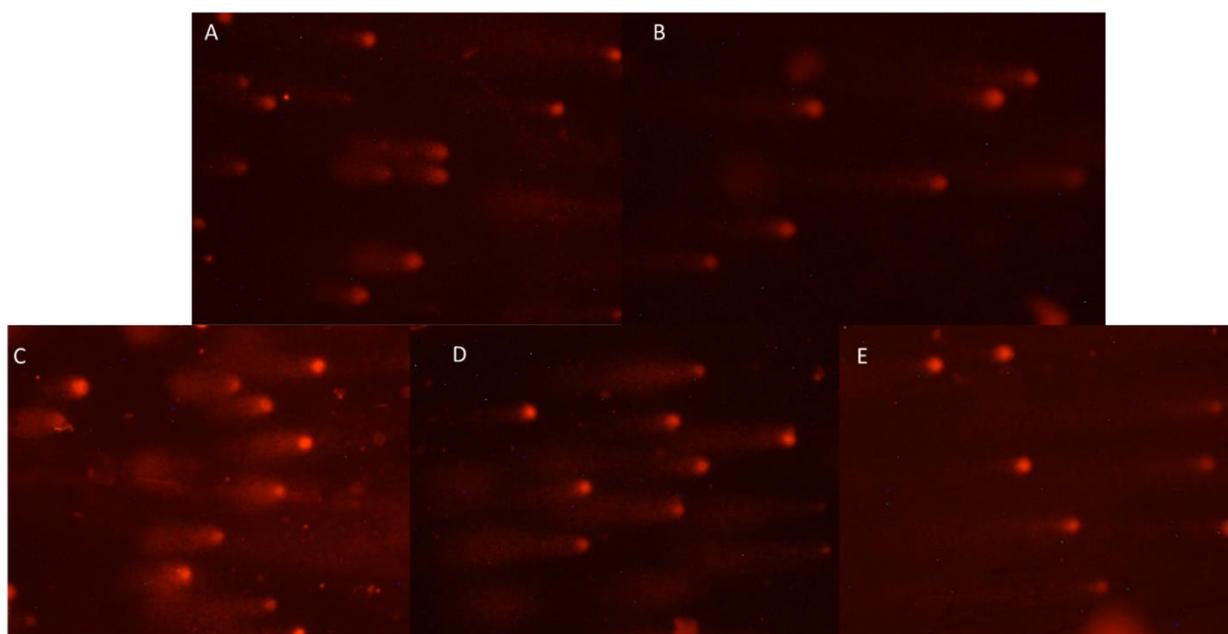
Fuente: Verjel, M. (2019)

En la figura 11 se muestra la longitud del cometa en los linfocitos humanos expuestos a pesticidas de uso común en el municipio de Ábrego, con las tres dosis utilizadas, se observa que, a mayor concentración, mayor migración del ADN, siendo C1 la concentración mayor utilizada y C3 la menor concentración, indicando un efecto dosis. De igual forma, se observa que el pesticida que más genotoxicidad indujo en los linfocitos humanos expuestos fue el glifosol en las tres concentraciones aplicadas. Se observa que, la dosis mayor del glifosol, supera al control negativo en más de 6 veces, el arrivo, 5 veces, el monocrotofos, 4,5 veces y el cobrethane y folicur aproximadamente 4 veces; lo cual nos indica un daño potencial inducido por los pesticidas, evidenciado por la migración del ADN formando el cometa (Figura 12).



*Figura 11.* Daño genotóxico en linfocitos inducido por pesticidas de uso común en Ábrego. C1: Concentración mayor, C3: concentración menor.

Fuente: Verjel, M. (2019).



*Figura 12.* Migración de DNA evidenciado en linfocitos expuestos a la concentración mayor con cada pesticida. (A) Arrivo, (B) Cobrethane, (C) Folicur (D) Glifosol y (E) Monocrotofos

Fuente: Verjel, M. (2019).

En la tabla 6 se muestran las comparaciones múltiples de diferencia mínimas significativas (LSD) de Fisher entre las longitudes de cometa de los linfocitos expuestos a los pesticidas, con las dosis aplicadas. Se identifican 12 grupos homogéneos, y se observa que las medias de daño inducidas por las dosis aplicadas de los cinco pesticidas presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto al control negativo, lo que indica que todos los pesticidas utilizados, indujeron daño en los linfocitos expuestos, aún con las dosis más bajas.

Tabla 6. Comparaciones múltiples de las longitudes de cometa en linfocitos expuestos a las diferentes dosis utilizadas con los cinco pesticidas y el control negativo según la prueba LSD de Fisher.

	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>Control negativo</b>	1,906E7	X
<b>Folicur C3</b>	4,809E7	X
<b>Monocrotofos C3</b>	4,916E7	X
<b>Folicur C2</b>	5,583E7	X
<b>Cobrethane C3</b>	5,827E7	X
<b>Arrivo C3</b>	6,223E7	X
<b>Monocrotofos C2</b>	6,297E7	X
<b>Glifosol C3</b>	6,431E7	X
<b>Cobrethane C2</b>	7,075E7	X
<b>Arrivo C2</b>	7,422E7	X
<b>Folicur C1</b>	7,942E7	X
<b>Cobrethane C1</b>	8,34E7	X
<b>Glifosol C2</b>	8,811E7	X
<b>Monocrotofos C1</b>	8,904E7	X
<b>Arrivo C1</b>	9,814E7	X
<b>Glifosol C1</b>	1,218E8	X

C1: Concentración mayor, C3: concentración menor.

Fuente: Verjel, M. (2019).

De la tabla 7 se infiere que el  $p$ -valor de la prueba F es menor que el nivel de significancia ( $0,00 < 0,05$ ), por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 16 variables con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 7. *Tabla ANOVA*

	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrados medios	Fc	p-Valor
Entre grupos	8,44061E17	15	5,62707E16	727,41	0,0000
Dentro de grupos	1,22535E17	1584	7,7358E13		
Total	9,66596E17	1599			

Fuente: Verjel, M. (2019).

La figura 13 muestra las longitudes de cometa obtenidas con cada una de las concentraciones utilizadas, se observa que, en todas las dosis se obtuvo diferencias en la longitud de cometa, con respecto al control negativo (señalado en círculo azul), así mismo, se evidenció que el daño disminuye conforme disminuye la dosis del pesticida. Además de esto, se observa que, el glifosol, en cada una de las concentraciones, indujo el mayor daño en los linfocitos expuestos (señalados en rojo).

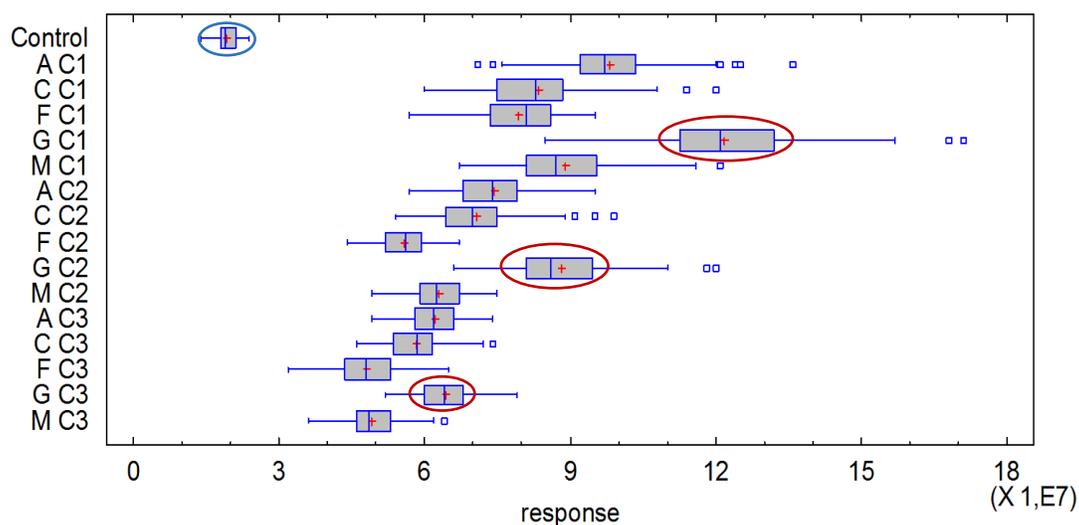


Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes. Longitud de cometa en linfocitos expuestos a pesticidas. A: Arrivo, C: Cobrethane, F: Folicur, G: Glifosol y M: Monocrotofos. C1: Concentración mayor, C3: concentración menor.

Fuente: Verjel, M. (2019)

El daño genotóxico se dividió en distintos niveles de daño según la longitud del cometa, para establecer estos rangos, se toma como referencia el valor promedio del control negativo, por lo que se establecieron 4 niveles de daño, desde el 0 hasta el 3, siendo el 0, células sin daño y 3 células completamente dañadas. Se observó que la totalidad de linfocitos expuestos a las diferentes dosis de pesticidas, presentaron daño en los distintos niveles, mientras que, el control negativo el 70% de los linfocitos, no presentaron ningún tipo de daño (categoría 0) (Tabla 8). En esta tabla se observa que, el pesticida Arrivo, en su concentración mayor, indujo daño tipo 3 en el 100% de las células, y con la concentración menor, indujo daños tipo 2 y 3; el pesticida Cobrethane, con la concentración mayor, se observó el 99% de las células con daño tipo 3, y con la concentración menor, se observó un 64% de las células en daño tipo 2; con el pesticida Folicur, se mostraron daños tipo 3 en el 100% de las células, con la mayor concentración aplicada, mientras que, con la menor concentración, se mostraron daños tipo 1 y tipo 2; con el pesticida Glifosol, se observó que en las tres concentraciones aplicadas, el mayor porcentaje de los linfocitos presentaron daño tipo 3; y el pesticida Monocrotofos, indujo en su mayor concentración, daño tipo 3 al 100% de las células, y con la menor concentración, se observaron linfocitos con daño tipo 1, 2 y 3.

Tabla 8. *Tipo de daño en linfocitos tratados con 3 dosis de pesticidas.*

Tratamiento	Promedio± DS (Longitud del cometa µm)	Tipo de Daño				% de células dañadas
		0	1	2	3	
Control negativo	19,06± 2,17	70	30	0	0	30

<b>ARRIVO</b>	2,5%	98,14± 11,45	0	0	0	100	100
	1,25%	74,22± 7,68	0	0	2	98	100
	0,60%	62,23± 5,43	0	0	37	63	100
<b>COBRETHANE</b>	0,50%	83,4±10,57	0	0	1	99	100
	0,25%	70,75± 8,81	0	0	10	90	100
	0,12%	58,27±6,30	0	0	64	36	100
<b>FOLICUR</b>	0,25%	79±6,38	0	0	0	100	100
	0,12%	55,83± 5,30	0	0	79	21	100
	0,06%	48,09± 6,38	0	9	90	1	100
<b>GLIFOSOL</b>	1%	121,8± 16,49	0	0	0	100	100
	0,5%	88,11± 11,10	0	0	0	100	100
	0,25%	64± 6,07	0	0	27	73	100
<b>MONOCROTOFOS</b>	1%	89,04± 12,28	0	0	0	100	100
	0,5%	62,97± 5,19	0	0	37	63	100
	0,25%	49,16± 5,20	0	5	92	3	100

Fuente: Verjel, M. (2019).

Por revisión de literatura, se documenta que, el glifosol está clasificado en la categoría IV como producto que no ofrece peligro, y el Monocrotofos, está dentro de la categoría Ib como muy peligroso, según la OMS (Tabla 1). Por esta razón, se realizó una comparación entre estos dos compuestos para analizar su efecto genotóxico sobre linfocitos humanos. Se encontró que, entre ellos existe diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) en la inducción de daño en el material genético en los linfocitos expuestos a 3 concentraciones (Tabla 9).

Se utilizó el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para comparar diferentes concentraciones de glifosol, de monocrotofos y células sin tratar. Se identificaron 5 grupos homogéneos (Tabla 10), formado el primero por el control negativo, el cual indica que hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ) con las distintas concentraciones aplicadas, los demás grupos se forman entre dosis en las que no se presentan diferencias significativas entre ellas, y finalmente, el último grupo lo forma la concentración mayor (C1) del glifosol, indicando que hay diferencia significativa entre la media de la longitud obtenida con dicha concentración y las medias de las longitudes de cometa de las demás concentraciones aplicadas a los linfocitos.

Tabla 9. *Tabla ANOVA.*

	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F-Ratio	$p$ -Valor
Entre grupos	6,48189E17	6	1,08032E17	1183,41	0,0000
Dentro de grupos	6,3263E16	693	9,12886E13		
Total	7,11452E17	699			

Fuente: Verjel, M. (2019).

Tabla 10. Comparaciones múltiples entre las dosis aplicadas de Glifosol y Monocrotofos.

	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>Control</b>	1,906E7	X
<b>Monocrotofos C3</b>	4,916E7	X
<b>Monocrotofos C2</b>	6,297E7	X
<b>Glifosol C3</b>	6,431E7	X
<b>Glifosol C2</b>	8,811E7	X
<b>Monocrotofos C1</b>	8,904E7	X
<b>Glifosol C1</b>	1,218E8	X

C1: concentración mayor, C3: concentración menor.

Fuente: Verjel, M. (2019)

En el diagrama de cajas y bigotes (figura 14), se observa que, existen diferencias significativas entre el control (circulo azul) y las 3 dosis aplicadas por cada pesticida. Además de esto, se muestra en la figura 14, que con la mayor concentración (C1) del glifosol, se obtuvo la mayor longitud del cometa (círculo rojo), a pesar de ser este clasificado como no peligroso. Se observa que las medias de la longitud de cometa obtenidas con la dosis 2 (C2) del glifosol y la dosis 1 (C1) de monocrotofos son similares, al igual que la dosis más baja (C3) del glifosol y la dosis 2 (C2) de monocrotofos (señalados con cuadros verdes).

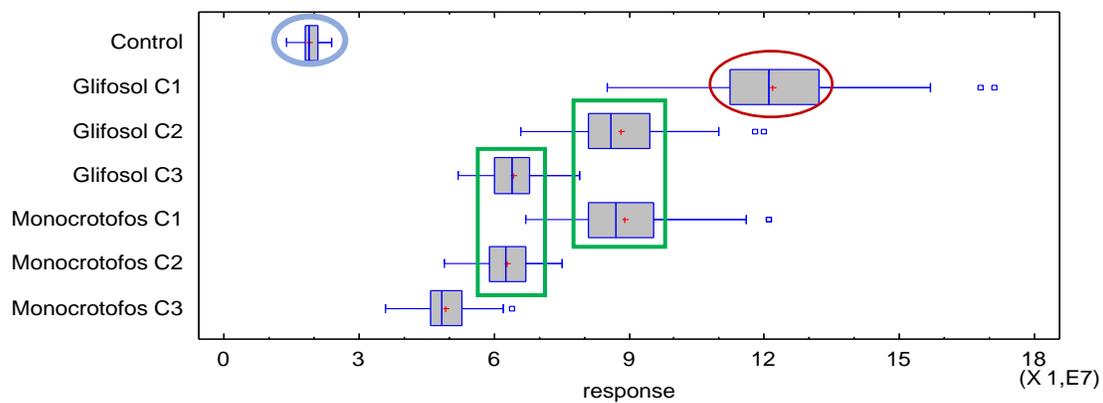


Figura 14. Diagrama de cajas y bigotes. Longitudes de cometa obtenidas con las 3 dosis de Glifosol y Monocrotofos. C1: Concentración mayor, C3: concentración menor.

Fuente: Verjel, M. (2019).

## 6. DISCUSIÓN

Las vías de entrada de los plaguicidas al organismo son las vías cutánea, respiratoria y digestiva. Aunque en general toda la población está expuesta a este tipo de productos químicos, los agricultores son los que más afectados se ven, ya que son los encargados de su aplicación. A lo anterior, podemos sumar que, no utilizan elementos de protección personal adecuados, tienen un mal manejo de estos químicos, realizando mezclas indebidas, sin respetar las recomendaciones para su utilización (Larrea et al, 2010), exponiéndose simultáneamente a mezclas complejas de pesticidas como organofosforados, piretroides y carbamatos, los cuales son considerados posibles indicadores de inducción de enfermedades crónicas o distintos tipos de cáncer, malformaciones congénitas y enfermedades degenerativas, esto como consecuencia de los efectos genotóxicos que suelen tener estos productos químicos (Benedetti et al, 2013).

El material genético puede sufrir diversos daños al tener contacto con los pesticidas, entre ellos, las mutaciones puntuales y cromosómicas, los cuales pueden generar transformación celular. De esta manera, si estas alteraciones ocurren en protooncogenes o genes supresores de tumores, pueden propiciar el desarrollo de cáncer, contribuir al envejecimiento prematuro o producir otro tipo de enfermedades (Ascarrunz, 2005). Se ha reportado evidencia que la exposición a pesticidas está relacionada con la inducción de cambios epigenéticos, como modificación de histonas, metilación del DNA, los cuales pueden ser transmitidos a generaciones posteriores, teniendo un papel importante en el desarrollo de enfermedades (Weinhold, 2006; Mostafalou y Abdollahi, 2013).

La exposición a agentes químicos ha sido asociada con el desarrollo de cáncer, ya sea, alterando el genoma celular o estimulando la proliferación y diferenciación celular (Cordon et

al., 2000; Cohen y Ellwein, 1991). La carcinogénesis, es un proceso establecido por varias etapas, que considera cambios tanto fenotípicos como genéticos. Entre los primeros se tiene en cuenta el crecimiento celular excesivo, la infiltración local y la capacidad de hacer metástasis. Desde la perspectiva molecular, estos fenómenos ocurren debido a la acumulación de lesiones genéticas que han sido causadas por los pesticidas que han tenido contacto con el ADN, y en algunos casos, estas lesiones son potenciadas por los defectos en la reparación. Esto contribuye al desarrollo de fallos en los procesos de división y diferenciación celular, apoptosis y en los mecanismos que conservan la integridad genómica (Peláez, 2004). Asimismo, los mecanismos carcinogénicos de los plaguicidas se pueden estudiar por su potencial para afectar el material genético, ya sea directamente a través de la inducción de daño estructural o funcional de cromosomas, ADN y proteínas histonas, o indirectamente alterando la expresión génica mediante el deterioro de organelos celulares como las mitocondrias y retículo endoplasmático, receptores nucleares, red endocrina y otros factores implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular (George y Shukla, 2011; Rakitsky et al., 2000).

Los pesticidas organofosforados, piretroides y carbamatos han sido reportados como genotóxicos, estos generan radicales libres que reaccionan con las membranas celulares, iniciando el proceso de peroxidación lipídica, y al haber acumulación de estos radicales se genera estrés oxidativo. Algunos plaguicidas que contienen iones metálicos interfieren en la reparación de ADN y producen especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionando daño oxidativo en el ADN, desencadenando cascadas de señalización que estimulan la proliferación celular, inhibición de sistemas de reparación, provocando inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones crónicas (Benedetti et al, 2013; Soloneski et al, 2015).

El grupo fosforilo de los compuestos organofosforados, es un sitio electrofílico potencial, el cual tiene la capacidad de reaccionar con el ADN, y su grupo alquilo interacciona con los centros nucleofílicos de la molécula como nitrógeno 7 de la guanina. Por esta razón, estos productos químicos actúan como agentes alquilantes, los cuales generalmente reaccionan con centros altamente nucleofílicos de ADN (átomos de nitrógeno), o poco nucleofílicos (átomos de nitrógeno). Los efectos oncogénicos y mutagénicos han sido relacionados con la alquilación de los oxígenos, mientras que la alquilación de los nitrógenos es relacionada con la citotoxicidad. Es así como la polaridad del grupo fosforilo presente en los pesticidas organofosforados, favorece la unión de estos compuestos al ADN, lo que lleva a la formación de aductos en el ADN (Qiao et al, 2003; Vindas et al, 2004; Larrea, 2010).

Algunos pesticidas contienen en su formulación metales pesados como el hierro (Fe), el cadmio (Cd), el cobre (Cu) y el manganeso (Mn), o algunos otros que contienen mercurio (Hg) o azufre (S), presentan igualmente riesgos para salud y se ha reportado que inducen daños en el ADN, pues tienen la característica de permanecer en el organismo por periodos largos de tiempo, induciendo efectos mutagénicos, carcinógenos y teratogénicos (Florea y Büsselberg, 2006; Dahiari, 2018).

La formación de micronúcleos, formación de cometas en el ADN, índices altos de intercambio de cromátidas hermanas y la presencia de aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a mezclas complejas de pesticidas, están asociadas con el daño oxidativo del ADN, lo que puede inducir procesos mutagénicos, indicando la persistencia de las lesiones o procesos de reparación incorrectos (Benedetti et al., 2013; Bonassi et al., 2011; Çelik et al., 2013; Thomas et al., 2008).

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de los agricultores expuestos laboralmente a pesticidas mostraron que existe daño genotóxico en el material genético (Figura 6 y 7), pues se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto a la muestra analizada de una persona no expuesta a estos plaguicidas (control negativo) (Tabla 3). Deduciendo a partir de estos resultados, que la exposición a dichos productos genera un gran riesgo, ya que la mayoría de las células muestran daño tipo 2 y 3 (tabla 5) (figura 9). Resultados similares reportados por Benedetti et al (2013), quienes realizaron ensayo cometa a muestras de sangre periférica de trabajadores de cultivos de soja, encontrando que la exposición a los pesticidas induce daño en el ADN, además de eso, realizaron un ensayo de micronúcleos de células bucales, en el cual detectaron altas frecuencias de micronúcleos en las células.

El daño en el material genético en poblaciones de agricultores expuestos a agroquímicos ha sido evidenciado en diversos estudios a nivel mundial, utilizando distintas técnicas, como aberraciones cromosómicas, micronúcleos y ensayo cometa, indicando altas frecuencias de daño en grupos expuestos en comparación con los grupos no expuestos (Ferré et al, 2018).

Con el análisis de varianza se determinaron factores relacionados con el daño observado en las células de los agricultores (Tabla 4). Factores como la edad de cada uno de los donantes, tiempo de exposición, frecuencia con la que realizan la fumigación no mostraron diferencias significativas con respecto a la longitud del cometa, igualmente el uso de equipos de protección personal, no mostró diferencias entre las longitudes de cometa de las personas que utilizan algún tipo de protección y los que no, lo cual es similar a otros estudios en los que tampoco encontraron asociación entre el daño en el ADN y el uso adecuado de protección personal, esto puede ser producto de las malas condiciones de higiene y mal manejo que se le da al equipo de protección personal (Benedetti et al, 2013; da Silva et al, 2008; Remor et al, 2009). Otros

factores como el consumo de alcohol y tabaco, antecedentes de cáncer, exposición a rayos X, hábitos alimenticios, ejercicio, tampoco mostraron diferencias significativas, por lo que se puede deducir que, todas las variables mencionadas anteriormente, no influyen en el daño genotóxico evidenciado en los agricultores. Las mezclas de pesticidas realizadas por los agricultores y el tipo de pesticidas que utilizan al momento de realizar la fumigación de las cosechas, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), lo que indica que el daño evidenciado en las muestras de sangre periférica está relacionado con las variables mencionadas, pues se demostró que las personas que realizan mezclas más complejas, que incluyen mezclas de organofosforados/carbamatos/piretroides/otros, presentaron mayor migración de ADN en las células, lo cual ha sido comprobado en otros estudios, en los que se relaciona de igual manera el uso de varios plaguicidas con el daño genotóxico (Balaji y Sasikala, 1993; Bolognesi, 2003). Resultados similares obtuvo Larrea et al (2010), donde evaluaron la genotoxicidad mediante ensayo cometa y micronúcleos en un grupo de agricultores de un municipio expuestos a plaguicidas, demostrando la relación entre el daño observado y los tipos de plaguicidas, pues los organofosforados y la mezcla organofosforado/piretroide, causaron mayor genotoxicidad con relación a otros tipos de pesticidas.

El daño en el material genético observado en los agricultores del municipio de Ábrego, puede ser una consecuencia del daño oxidativo, el cual resulta por la exposición a las mezclas complejas de los pesticidas a las cuales se exponen a diario en su ocupación, pues se ha reportado que estos químicos generan radicales libres, aumentos en la producción de ROS, provocando desequilibrio oxidativo, generando alteraciones en los distintos componentes celulares y de esta manera propiciando al desarrollo de enfermedades crónicas y cáncer (Benedetti et al, 2013; Mostafalou, S. & Abdollahi, M., 2013). Resulta difícil deducir si el daño

genotóxico en los agricultores es causado por un pesticida específico, debido a que generalmente estas personas mantienen varios cultivos, por lo tanto, necesitan hacer uso de más agroquímicos ya que cada cultivo tiene distintas necesidades en función de plagas, conservación y contaminación, por esta razón, se recurre a la realización de mezclas complejas de los productos (Larrea et al, 2010).

En los ensayos in vitro, el ensayo cometa indicó que existe un efecto genotóxico en los linfocitos humanos expuestos a distintas dosis de pesticidas, el cual depende de las dosis aplicadas, pues a mayor concentración, se generó mayor migración del material genético (figura 11 y 12), mostrando diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el control y las longitudes de cometa obtenidas con los diferentes tratamientos. Resultados similares mostraron Pabuena, 2014; Yañez et al, 2017, estudios en los cuales expusieron linfocitos humanos a distintas dosis de extractos de frutas que han tenido contacto con pesticidas, observando que, a mayor dosis del extracto, mayor daño genotóxico. A lo largo de los años se han llevado a cabo muchos estudios in vitro para evaluar la genotoxicidad de plaguicidas, donde se ha demostrado que diferentes pesticidas poseen la capacidad de inducir migraciones en el ADN (Rahman et al, 2002; Poli et al, 2003; Benedetti et al, 2013).

Los efectos genotóxicos de los plaguicidas han sido estudiados con otros organismos modelo, como es el caso de un estudio realizado en Brasil, donde se demostró la capacidad del glifosato de generar daño en linfocitos de caimán (*Caiman latirostris*), evidenciando que los niveles de daño inducidos por el pesticida fueron dependientes de la dosis aplicada (Poletta et al, 2009). Manikkan et al, 2012 demostraron que las mezclas de pesticidas en espermatozoides de ratas generaron 363 regiones diferenciales de metilación del ADN denominadas epimutaciones.

Además, estudios han demostrado relaciones existentes entre la exposición a plaguicidas y la incidencia de cáncer de mama en personas en zonas rurales, esto debido a que los mecanismos hormonales del estrógeno, se ve mimetizado por acción del plaguicida al contacto con el ADN (Santamaría-Ulloa, 2009), asimismo, Mayhhoub 2014, encontró relaciones entre la exposición ocupacional de mujeres en etapa de gestación, a estos productos químicos con factores como nacimientos prematuros o niños nacidos con bajo peso.

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial, está categorizado según la OMS como no peligroso para mamíferos, en el 2015 la Agencia Internacional sobre Cáncer lo consideró como producto probablemente carcinógeno (Tarazona et al 2017). Sin embargo, la Agencia Europea para las Sustancias Químicas y la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria, descartaron su incidencia de cáncer en humanos, por lo que la Unión Europea renovó la licencia del glifosato hasta el 2022 (Comisión Europea, 2017; Dahiri, 2018).

El pesticida glifosol, utilizado en los ensayos *in vitro*, siendo su principio activo el glifosato, se encuentra en la categoría IV: “producto que no ofrece peligro” según la OMS. En este estudio, el glifosol fue el pesticida que más provocó la migración del DNA en linfocitos humanos expuestos a tres dosis (Figura 13 y 14), lo que concuerda con estudios anteriores donde fue reportado que el glifosato induce migración del ADN en células expuestas e intercambio de cromátides hermanas (Lee et al, 2000; Monroy et al, 2005; Verona et al, 2009). Diversos estudios se han realizado con este pesticida, ya que es uno de los herbicidas más utilizados en Colombia. En ensayos de mutagenicidad no se ha demostrado que este pesticida sea agente mutágeno, lo cual es requerido para que se clasifique como cancerígeno, sin embargo, cuando se estudian las formulaciones comerciales del glifosato, se evidencia la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo de *Drosophila sp.* Igualmente se ha reportado, evidencias de

inducción de daño en el ADN por formulas comerciales, en tejidos y órganos de ratón, de esta manera se ha concluido a partir de dichas observaciones, que las preparaciones comerciales generan más peligro que el glifosato y sus metabolitos por si solos (Verona et al, 2009; Martínez et al, 2007; Campuzano et al, 2017).

Los pesticidas son ampliamente utilizados en la agricultura, formulaciones, combinaciones e interacciones entre compuestos y exposiciones múltiples, son el diario vivir en la práctica agrícola. En las mezclas complejas realizadas por los agricultores, se usan diferentes formulaciones de pesticidas, las cuales incluyen un número significativo de genotóxicos (Bolognesi, 2003). Como se ha venido recalado, algunos de estos compuestos están asociados con la incidencia de enfermedades crónicas, degenerativas y malformaciones congénitas, a consecuencia de sus efectos genotóxicos, los cuales varían considerablemente según el grado de envenenamiento, vía de absorción características específicas del producto o las prácticas de uso y manejo que se les da a los mismos (Bolognesi, 2003; Angerer, 2007; Bhali, 2009; da Silva, 2008).

## 7. CONCLUSIONES

Las malas prácticas de manejo de los pesticidas, sin tener en cuenta las indicaciones de su uso adecuado, además de esto la exposición a estos químicos sin tener en cuenta la utilización de equipos de protección personal apropiados en el momento de la manipulación y fumigación de las cosechas, induce la formación de daños en el DNA, lo cual puede resultar en el desarrollo de enfermedades a largo plazo.

Las mezclas complejas de pesticidas que los agricultores acostumbran a manejar, las cuales comprenden plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides, generan un mayor daño en el material genético, a comparación de cuando se utiliza un solo pesticida o mezcla de unos pocos.

El glifosol, utilizado en esta investigación, tiene como ingrediente activo el glifosato, que, según la OMS, está categorizado como producto que no ofrece peligro, sin embargo, en este estudio resultó ser uno de los que indujo mayor daño en las células expuestas, en las tres concentraciones aplicadas a comparación de los demás pesticidas analizados. Con esto se concluye que, a pesar de su categorización, queda demostrado que la exposición a este producto químico es de alto riesgo, pues como se demostró aquí, al compararlo con un pesticida clasificado como muy peligroso, genera altos niveles de daño en el ADN, incluso en su concentración más baja. Lo que genera alertas ya que los agricultores se exponen constantemente

a este producto, además de que, al ser mezclado con otros pesticidas, se incrementa el potencial genotóxico de estos químicos.

## **8. RECOMENDACIONES**

Se recomienda seguir realizando este tipo de estudios, ya que generan un gran impacto social, debido a que, a partir de estos hallazgos, se puede realizar con las entidades competentes, proyectos para la capacitación de los agricultores sobre las consecuencias de la exposición a estos químicos, así mismo, brindar información sobre el adecuado manejo, almacenamiento y uso de protección personal en el momento de la manipulación de los pesticidas.

Para posteriores estudios, se recomienda utilizar para el control, un grupo grande de personas no expuestas, para tener datos más precisos en cuanto a las diferencias de daño inducidas a personas expuestas y no expuestas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.P. Remor, C.C. Totti, D.A. Moreira, G.P. Dutra, V.D. Heuser, J.M. Boeira, (2009)  
Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and  
evaluation of genotoxicity, *Environ. Int.* 35, 273–278.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004c. Pesticides and oxidative  
stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10 (6), 141–147
- Ábrego Norte de Santander: Contribuyendo al Desarrollo Regional. (2010). Corporación Nueva  
Sociedad de la Región Nororiental de Colombia CONSORNOC.
- Acquavella, J., Doe, J., Tomenson, J., Chester, G., Cowell, J., Bloemen, L. (2003).  
Epidemiologic Studies of Occupational Pesticide Exposure and Cancer: Regulatory Risk  
Assessments and Biologic Plausibility. *Ann Epidemiol.* 13: 1-7,
- Al-Saleh I A. Pesticides: a review article. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1994; 13:151-161.
- Antonucci, G.A., Colus I.M. (2000). Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian  
population exposed to pesticides. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20:265–272.
- Anwar WA. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environ Health Persp* 1997;105:801-6.
- Arévalo, A., Bacca, T. y Soto, A. (2014). Diagnóstico del Uso y Manejo de Plaguicidas en  
Fincas Productoras de Cebolla Junca *Allium fistulosum* en el Municipio de Pasto. *Revista  
Luna Azul*; 38: 132-145.
- Arnaiz, R. R. (s.f.). La ciencia para todos. Obtenido de  
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>

- Ascarrunz, N., Tirado, N., Gonzáles, A., Cuti, M., Cervantes, R., Huici, O. y Jors, E., (2006).  
Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de  
Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. Cuadernos del Hospital de  
Clínicas. Vol.51-1.
- Avocadosource: Generalidades sobre las plagas y sus efectos en la producción agrícola (s.f.).  
Recuperado de:  
[http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA\\_1\\_PG\\_1-10.pdf](http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA_1_PG_1-10.pdf)
- B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the  
Balaji M. AND K. Sasikala.( 1993) Cytogenetic effect of malathion in vitro culture of human  
peripheral blood. *Mutat. Res:* (301)13-17.
- Bartual, J., Berenguer, M. (s.f.). Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Centro de  
Investigación y Asistencia Técnica. Barcelona, España.
- Benedetti, D., Sarmiento, M., Porto, C., Eliete, C. Ferraz, J. y Silva, J. (2013). Genetic damage in  
soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal  
micronucleus cytome assays. *Mutation Research* 752 28–33.
- Bhatnagar, V.K. (2001). Pesticides pollution: trends and perspectives. *ICMR Bulletin*, 31, 87-88.
- Bolognesi C, Panini M, Merlo F, Bonassi S. Frecuency of micronuclei in lymphocytes from a  
group of floriculturists exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health* 1993;40:405-11.
- Bolognesi C.(2003) Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies.  
*Mutation Research.* (543) 251-272.

- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., 2011. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 728, 88–97.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., Battershill, J.M., 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21 (2), 93–103,
- Butinof, M., Fernández, R., Lerda, D., Lantieri, M., Filippi, I. y Díaz, M. (2017). Biomonitoring en exposición a plaguicidas y su aporte en vigilancia epidemiológica en agroaplicaciones en Córdoba, Argentina. *Gac Sanit.* <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2017.12.002>
- C. Bolognesi, Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 543 (2003) 251–272
- Calao, C. y Marrugo, J. (2015). Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica*;35(Supl.2):139-51. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2392>
- Campuzano, C., Feijoó, L., Manzur, K., Palacio, M., Rendón, J. y Zapata, J. (2017). Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema. *Rev CES Salud Pública*.8(1): 121-133.
- Castillo, J., Sánchez, J., Sánchez, J. y Valencia, R. (2014). Los Plaguicidas en México. Aspectos Generales, Toxicológicos y Ambientales. Capítulo 5: Genotoxicidad de Plaguicidas. Estudios en Personas Laboral y/o Ambientalmente Expuestas. Primera Edición. Centro de Investigaciones en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

- Çelik, A., Yildirim, S., Ekinçi, S.Y., 2013. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 265–270.
- Cenkci S., Yıldız M. Ciğerci, Bozdağ A., Terzi H. y Terzi E.S.A. (2010). Evaluation of 2, 4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotox. Environ. Saf.* 73, 1558-1564.
- Chhabra, R. S., Eustis, S., Haseman, J. K., Kurtz, P. J., & Carlton, B. D. (1992). Comparative carcinogenicity of ethylene thiourea with or without perinatal exposure in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18(3), 405-417. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90139-9](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(92)90139-9).
- Coalova, I., Mencacci, S. y Fassiano, A. (2013). Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta Toxicol. Argent.* 21 (1): 5-14.
- Cohen SM, Ellwein LB. (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res*; 51:6493-505.
- Colette, M. (2014). Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO). Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología.
- Comisión Europea. Frequently Asked Questions: Glyphosate. 2017 [en línea].
- Cook PR, Brazell IA, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science. PubMed.* 1976 Nov 1;22(2):303–24.

- Cordon Cardo C, J Cote R, Sauter G. (2000). Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. *Scand J Urol Nephrol Suppl*; 205:82-93.
- Dahiri, B. (2018). Consecuencias sobre la salud de mujeres en edad fértil tras la exposición laboral a plaguicidas (Tesis de pregrado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- De Souza, A., Medeiros Ados, R., De Souza, A.C., Wink, M., Siqueira, I.R., Ferreira, M.B., Fernandes, L., Loayza Hidalgo, M.P., Torres, I.L., 2011. Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). *Cien. Saude Colet.* 16 (8), 3519–3528,
- Di Giorgio M, Taja M, Nasazzi N, Bustos N, Cavalieri H, Bolgiani A. 2001. El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones fuertemente localizadas. *Memorias del 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety.* Recife, Brasil, 29 abril al 4 mayo.
- E. Hodgson, Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action, *Toxicol. Ind. Health* 15 (1999) 6–11.
- El-Kady A, Abdel-Wahhab M. Occurrence of trace metals in foodstuffs and their health impact. *Trends Food Sci Technol.* 2018; 75: 36-45.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T., Kaya, F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ. Internat.* 33: 877–885.
- Ferré, D., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., Carracedo, R. y Gorla, N. (2018). Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que

- han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.34 no.1 México.
- Florea AM, Büsselberg D. 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals*. 19: 419-427.
- Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681:80–92.
- 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).
- George, J., Shukla, Y., 2011. Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic-based findings. *J. Proteomics* 74 (12), 2713–2722.
- Guy, R.C., 2005. Toxicity testing, mutagenicity. In: Wexler, P., Anderson, B.D., Peyster, A.D., et al. (Eds.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier Inc,
- Harris, J. (2000). *Chemical Pesticide Markets, Health Risks and Residues*. Ascot, UK: CABI Bioscience,
- He J, Chen W, Jin L, Jin H. 2000. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Research* 469:223–231.
- Hidroponía: ¿Cómo afectan los hongos a los cultivos? (2017). Recuperado de:  
<http://hidroponia.mx/como-afectan-los-hongos-a-los-cultivos/>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), (2017). *Estadísticas de Comercialización de Plaguicidas Químicos de uso Agrícola 2016*. Pág. 10.

Instituto Departamental de Salud Norte de Santander (IDS).

Isern, M. (2002). La química de los Pesticidas y su Metodología Analítica. Copyright by UCEL: Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Printed in Argentine.

J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, Review human biomonitoring: state of the art, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210 (2007) 201–228,

J. da Silva, C.R. Moraes, V.D. Heuser, V.M. Andrade, F.R. da Silva, K. Kvitko, V. Emmel, P. Rohr, D.L. Bordin, A.C. Andreazza, M. Salvador, J. Antonio Pegas Henriques, B. (2008) Erdtmann, Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed in pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes, *Mutagenesis* 23 415–422.

J.A. Bhali, T. Ali, M.R. Asi, Z.M. Khalid, M. Ceppi, Q.M. Khan, DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides, *Environ. Mol. Mutagen.* 50 (2009) 37–45.

Joksic G, Vidakovic A, Spasojevic-Tisma V. Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ Res* 1997;75:113-8.

Lacorte, S., Ballesteros, R., Colomer, P., Zapata, P., Delgado, A., Martrat, G., Abad, E., Díez, S., Santos, F. y Bertolero, A. (2018). Control de contaminantes orgánicos persistentes según convenio de estocolmo y mercurio en huevos de láridos: bases de datos, series históricas y gestión ambiental. Recuperado de:  
<https://www.researchgate.net/publication/325539414>

- Larrea, M., Tirado, N. y Acarrunz, E. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *BIOFARBO*, 18(2), 31 – 43.
- Lee HL, Chen KW, Chi CH, Huang JJ, Tsai LM. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate -surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. *Acad Emerg Med*. 2000;7:906-10.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2012). Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 708-719. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.08.010>
- Mañas, F.; Peralta, L.; Gorla, N.; Bosh, B. y Aiassa, D. (2009). Aberraciones Cromosómicas en Trabajadores Rurales de la Provincia de Córdoba Expuestos a Plaguicidas. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 20 (1): 09-13.
- Maron, D. & B. Ames (1983) *Mutat. Res.* 113: 73-215. En: Trossero, C., Caffarena, G. Hure, E. y Rizzotto, M. (2006). Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (1): 139-44.
- Martínez A, Reyes I, Reyes N. Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomedica*. 2007;27(4):594-604.
- Martínez, C. y Gómez, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (4) 185-200.

- Matheus, T. y Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. Agosto 2014 Vol. 18 N° 2.
- Mayhoub S, Berton T, Bach V, Tack K, Deguines C, Floch-Berneaud A, Demots S, Stéphan-Blachard E, Chardon K. Self-reported (2014). Parental Exposure to Pesticide during Pregnancy and Birth Outcomes: The MecoExpo Cohort Study. *PloS One*; 9(6)
- Mckelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo & A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut. Res.* 288: 47-63.
- Miller GT. (2004). *Sustaining the Earth*. 6 th ed. Pacific Grove California: Thompson Learning.
- Monroy, C., Cortés, A., Sicard, D. y Groot, H. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas Expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*; 25:335-45.
- Mortelmans, K. y Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455. 29–60.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2012a. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clin. Exp. Pharmacol.* 2 (3), 1000e1108.
- Mudry M., Carballo M. *Genética Toxicológica*. Buenos Aires, Argentina: Ed. De Los 4 Vientos, 2006.
- Mutat. Res.* 543, 51–272. En: Mañas, F.; Peralta, L.; Gorla, N.; Bosh, B. y Aiassa, D. (2009). Aberraciones Cromosómicas en Trabajadores Rurales de la Provincia de Córdoba Expuestos a Plaguicidas. *Journal f Basic & Applied Genetics*, 20 (1): 09-13.

- Nasuti, C., Falcioni, M. L., Nwankwo, I. E., Cantalamessa, F., & Gabbianelli, R. (2008). Effect of permethrin plus antioxidants on locomotor activity and striatum in adolescent rats. *Toxicology*, 251(1–3), 45-50. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.049>.
- Nivia, E. (2004). Los plaguicidas en Colombia. *Revista Semillas*. Edición 21.
- Ojha A. y Srivastava, N. (2014). In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research* 761; 10–17
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), (1996). Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS, 1990.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, 1993:
- Organización Panamericana de la Salud. (2004). Vigilancia sanitaria de plaguicidas: experiencia de Plagsalud en Centroamérica. Washington D.C: OPS.
- Ostling O, Johanson KJ. Microeletrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;123(1):291-8.

- Pabuena, D. (2014). Evaluación de la actividad genotóxica en fresa cultivada en la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Tesis de Pregrado. Universidad de Pamplona, Colombia.
- Pandrangi R, P. M., Ralph S, Vrzoc M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen.*, 26(4) 345-356.
- Peláez, S., Hierro, I., Oña, S., Alonso, L. y Mantilla, A. (2004). Relación entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de carcinoma urotelial vesical superficial de bajo grado. *Med Clin (Barc)*;123(15):571-4
- Penel, N., Vansteene, D., 2007. Cancers and pesticides: current data. *Bull. Cancer* 94 (1), 15–22.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., & Mudry, M. D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 95-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.007>
- Poli P, DE Mello M.A, Buschini A, DE Castro V.L.S.S, Restivo F.M., C. Rossi, Zucchi T.M.A.D. (2003). Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis. *Mutation Research*. (540) 57-66
- Pupin, A., Caetani, S., Azevedo, L., Nogueira, A., Monteiro, M., Savioli, J., Luiz, A. y Matins, I. (2017). Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas

- Gerais, Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.013>.
- Qiao, D., F. Seidler, J. Violin & T. Slotkin. 2003. Nicotine is a developmental neurotoxicant and neuroprotectant: stage-selective inhibition of DNA synthesis coincident with shielding from effects of chlorpyrifos. *Develop. Brain. Res.* 147: 183-190.
- Rahman M.F., M. Mahboob, K. Danadevi, B. Saleha Banu, Paramjit G. (2002). Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research.* (516)139-147.
- Rakitsky, V.N., Koblyakov, V.A., Turusov, V.S., 2000. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20 (4), 229–240.
- Ramírez, J. y Lacastaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor;* 4(2):67-75
- Rekha, S.N.; Naik, R. y Prasad, F. (2006). Pesticide residue in organic and conventional food–risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety,* 13, 12-19.
- Rodríguez, A., Noris, E. y Fundora, M. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica;*35(2):184-194.
- Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt EC, Friedberg EC, Fox CF (eds). *DNA Repair Mechanisms.* New York: Academic Press; 1978. p. 465-8.

- Santamaría-Ulloa C. (2009). El impacto de la exposición a plaguicidas sobre la incidencia de cáncer de mama. Evidencia de Costa Rica. Poblac. Salud Mesoam. 7(1): art 1.
- Sierra, C., Cajas, N., Hoyos, L., Zuleta, M., Whorton, E. y Au, W. (1998). In vitro and in vivo genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. Mutation Research 415. 59–67
- Simoniello, M., Scagnetti, J., Mastandrea, C., Grigolato, R., Paonessa, G. y Kleinsorge, E. (2007). Biomonitoring of rural population exposed to pesticides. Revista FABICIB. Volumen 11: 73-85.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Expl Cell Res. PubMed.* 1988 Mar;175(1):184-91.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A. y Larramendy, M. 2015. Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*.
- Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability *Current Protocols in Immunology*: John Wiley & Sons, Inc.

Tarazona J, Court-Marques D, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente F. (2017).

Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol*; 91(8): 2723-2743

Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.* 638, 37–47.

Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. 2000. Single cell gel/comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221.

Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E. y Rizzotto, M. (2006). Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (1): 139-44.

Valencia, Q., Sánchez, J., Gómez, S., Cortés, J., Waliszewski, S., Fernández, S. y Villalobos, R. (2013). Genotoxicidad de Plaguicidas en Sistemas Vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (Número especial sobre plaguicidas) 133-157.

Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S., Lison, D., 2007. A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes Control* 18 (5), 457–478.

Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S., Mertens, C., Lison, D., 2008. Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies. *Environ. Res.* 106 (1), 121–137.

- Van Maele-Fabry, G., Libotte, V., Willems, J., Lison, D., 2006. Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes Control* 17 (4), 353–373.
- Varona, M., Cárdenas, O., Crane, C., Rocha, S., Cuervo, G. y Vargas. (2003). Alteraciones citogenéticas en trabajadoras con riesgo ocupacional de exposición a plaguicidas en cultivos de flores en Bogotá. *Biomédica*; 23:141-52.
- Varona, M.; Henao, G., Díaz, S.; Lancheros, A.; Murcia, A.; Rodríguez, N. y Álvarez, H. (2009). Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*; 29:456-75.
- Vergara, A. (2010). Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Vindas, R., Ortiz, F., Ramírez, V. y Cuenca, P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 601-609.
- Vindas, r., Ortiz, F., Ramírez, V. y Cuenca, P. 2004. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista de biología tropical* vol.52 n.3 San José, Costa Rica.
- Weinhold, B., 2006. Epigenetics: the science of change. *Environ. Health Perspect.* 114 (3), A160–A167.
- Yañez, L., Quijano, A. y Meléndez, I. (2017). Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de durazno, *Prunus persica* cultivados en Pamplonita Norte de Santander. *Ciencia en Desarrollo*, Vol. 8 No. 1 pp. 83-91.

Noriega, B., Armienta, E., Chávez, M., Cervantes, E., Ojeda, L., y Quevedo, I. (2005)

Valoración de genotoxicidad con determinación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos. Bol. Med. 1 (8-9), 13-17.

Peralta L. Mañas F., Gentile N., Bosch B., Méndez A., Aiassa D. (2011). Evaluación del daño

genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio de un caso en Córdoba, Argentina. Diálogos;2(1):7-26.