

PREVALENCIA DE MICRONÚCLEOS DE MUCOSA BUCAL EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS DE FRAILE PINTADO, JUJUY, ARGENTINA

PREVALENCE OF BUCCAL MICRONUCLEI IN FARM WORKERS FROM FRAILE PINTADO, JUJUY, ARGENTINE

Graciela Eugenia Bianco Sadir^{1,2}, Rocío Florencia Julián¹, María del Carmen Rivera^{1,2}, Lauro Nicolás Cazón¹, Emanuel Celestino González Poma^{1,2}, Hugo Mario Borsetti^{1,2,3}, Julio César De Luca^{4,5*}

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina

²LAG – Laboratorio de Análisis Genético, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina

³ICEGEM – Instituto de Estudios Celulares, Genéticos y Moleculares, Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina

⁴IGEVET – Instituto de Genética Veterinaria (UNLP-CONICET LA PLATA) Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata, Argentina

⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), CABA, Argentina

*Julio C. De Luca, IGEVET – Instituto de Genética Veterinaria (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, CC 296, B1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina; Phone/Fax: (+54) 221 4211799;

***Autor para correspondencia:**

jdeluca@fcv.unlp.edu.ar

Licencia:

[Licencia Creative Commons](#)

[Atribución-NoComercial-](#)

[CompartirIgual 4.0 Internacional](#)

Período de Publicación:

Julio 2020

Historial:

Recibido: 12/08/2019

Aceptado: 28/05/2020

RESUMEN

El conocimiento sobre las medidas de bioseguridad y los efectos tóxicos durante la aplicación de pesticidas en la provincia de Jujuy, Argentina, es escaso, particularmente en relación con las medidas de protección y la mezcla de pesticidas utilizados por los trabajadores rurales. Este estudio se realizó para determinar la prevalencia de la actividad de acetilcolinesterasa de glóbulos rojos (AChE) y micronúcleos bucales (MN). Se realizó un estudio observacional de 209 trabajadores agrícolas (106 individuos expuestos y 103 controles) de Fraile Pintado, Jujuy, Argentina. Se recogieron muestras de sangre completa (2 ml) en tubos Vacutainer heparinizados. La actividad de AChE se determinó de acuerdo con el método de Ellman. Las células de la mucosa bucal exfoliada se recogieron usando un cepillo de dientes. Los resultados citogenéticos mostraron un aumento significativo de MN en individuos expuestos a pesticidas en comparación con los controles (10.08 y 2.15; $p < 0.0001$), mientras que la actividad AChE fue significativamente menor en individuos expuestos en comparación con los controles (4093.44 y 9132.25; $p < 0.0001$). Los resultados actuales sugieren la necesidad del biomonitorio periódico de MN bucal y AChE junto con educación y capacitación de trabajadores ocupacionales sobre la aplicación segura de pesticidas potencialmente dañinos.

Palabras clave: actividad de acetilcolinesterasa, ensayo de micronúcleos, genotoxicidad, pesticidas.

SUMMARY

Knowledge about biosafety measures and toxic effects during pesticide application in the province of Jujuy, Argentine, is scarce, particularly concerning protective measures and the mixing of pesticides used by rural workers. This study was conducted to determine the prevalence of buccal micronuclei (MN) and red blood cell acetylcholinesterase (AChE) activity. An observational study of 209 agricultural workers (106 exposed individuals

and 103 controls) from Fraile Pintado, Jujuy, Argentina, was carried out. Blood samples (2 mL) were collected in heparinized Vacutainer tubes. AChE activity was determined according to Ellman's method. Exfoliated buccal mucosa cells were collected using a toothbrush. Cytogenetic results showed a significant MN increase in pesticide-exposed individuals as compared with controls (10.08 and 2.15; $p < 0.0001$), whereas AChE activity was significantly lower in exposed ones compared with control individuals (4093.44 and 9132.25; $p < 0.0001$). The present results suggest the need for the periodic biomonitoring of buccal MN and AChE together with education and training of occupational workers on the safe application of potentially harmful pesticides.

Keywords: acetylcholinesterase activity, genotoxicity, micronucleus assay, pesticides.

INTRODUCCIÓN

Los pesticidas son sustancias activas químicas, heterogéneas y biológicas que actúan en el control de insectos, bacterias, hongos, gusanos, roedores y malezas. Además, las sustancias activas utilizadas para su formulación generalmente tienen características apolares, baja selectividad y capacidad de bioacumulación, lo que contribuye a que los pesticidas sean tóxicos para especies no objetivo, como los seres humanos (Bolognesi y Holland, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que anualmente hay 3 millones de casos de intoxicación por pesticidas en todo el mundo. Como resultado, la exposición a pesticidas se ha convertido en un problema de salud pública ya que se ha relacionado con problemas gastrointestinales, oculares, respiratorios, cardiovasculares y neurológicos, así como con cáncer (Damalas y Koutroubas, 2016).

Varios estudios han demostrado que los pesticidas pueden afectar directa e indirectamente el material genético, ya que pueden inducir roturas de la cadena de ADN, alteraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y formación de micronúcleos (Bolognesi y Holland, 2016; Bianco y otros, 2017).

El daño al ADN puede ocurrir a través de cualquier modificación química o estructural promovida por varios factores y mecanismos, que pueden desencadenar un proceso de carcinogénesis (Alleva y otros, 2018).

Actualmente se utiliza una amplia gama de métodos para detectar los primeros efectos biológicos de los agentes que dañan el ADN en entornos ocupacionales. Este es el caso del ensayo de micronúcleos (MN), que se ha utilizado ampliamente en estudios de biomonitorio en humanos (Da Silva y otros, 2008).

El ensayo de MN en células de la mucosa bucal exfoliada es un procedimiento relativamente no invasivo para la medición del daño del ADN, la proliferación celular, la diferenciación y la muerte (Thomas y otros, 2009; Bolognesi y otros, 2015).

El ensayo fue desarrollado para seres humanos y ha proporcionado información sobre los efectos genotóxicos de factores como el estilo de vida, la nutrición y otros procesos etiológicos (Thomas y otros, 2009). También se ha utilizado con éxito para evaluar el impacto de factores como la contaminación atmosférica, partículas de polvo y metales pesados (Espitia-Perez y otros, 2016) y pesticidas (Castañeda-Yslas y otros, 2016). Es probable que estos factores xenobióticos afecten a muchos otros grupos de organismos que se encuentran en los mismos entornos. Por lo tanto, el uso de células exfoliadas para el ensayo de MN se ha establecido en estudios epidemiológicos destinados a definir los efectos genotóxicos en los tejidos diana, después de la exposición crónica a agentes genotóxicos y citotóxicos (Chakraborty y otros, 2006).

Tolbert y otros, 1991, describieron otras anomalías nucleares que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular y que

son indicadores de daño en el ADN, citotoxicidad y muerte celular. Estas anomalías consisten en cambios en el tamaño, la densidad y la distribución de la cromatina y se pueden distinguir de las células normales, ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo (entre ellas se encuentran la cromatina condensada, la cariorrexis, el núcleo picnótico, la kariólisis, las células nucleolobuladas y binucleadas). Aunque el mecanismo de formación o el significado biológico de cada una de estas anomalías nucleares no está completamente claro hasta ahora, su frecuencia es alta en condiciones patológicas (artritis reumatoide, diferentes tipos de cáncer, problemas hematológicos como linfoma inmunoblástico, leucemia megaloblástica aguda, Hodgkin's linfoma, entre otros (Torres-Bugarín y otros, 2013) o de exposición (tabaco, alcohol, drogas, quimioterapia antineoplásica).

Se ha encontrado que la exposición a pesticidas, los síntomas de toxicidad y la actividad de la acetilcolinesterasa de glóbulos rojos (AChE) se asocian significativamente en las poblaciones expuestas (Singh y otros, 2011). Existen dos tipos de colinesterasas, la que se encuentra presente en los tejidos neurales (AChE) y la que se encuentra en el suero sanguíneo y es sintetizada por el hígado, denominada pseudo o butirilcolinesterasa (BChE) (Remor y otros, 2009). La prueba de colinesterasa en sangre se ha utilizado ampliamente para controlar la exposición a los inhibidores de colinesterasa como los pesticidas organofosforados y carbamatos, que se usan comúnmente en la agricultura en todo el mundo y pueden aumentar la actividad parasimpática a través de la inhibición de la actividad AChE. En los últimos años, se ha informado que una cantidad de productos químicos distintos de los insecticidas organofosforados y carbamatos disminuyen cada vez más la actividad AChE, incluidos los pesticidas de diferentes familias químicas (piretroides, triazinas y paraquat), metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, detergentes y diferentes clases de nanopartículas (Lionetto y otros, 2013).

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto tóxico y/o citotóxico de la exposición a pesticidas en los agricultores agrícolas de Fraile Pintado, provincia de Jujuy, Argentina, utilizando el ensayo bucal de MN y midiendo parámetros bioquímicos como la actividad AChE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Un total de 209 trabajadores rurales de Fraile Pintado, Jujuy, fueron incluidos en este estudio observacional. Se dividieron en dos grupos: expuestos ($n = 106$) y no expuestos (grupo de control, $n = 103$) a pesticidas.

Fraile Pintado se encuentra en el departamento de Ledesma a unos 65 km al noreste de la capital provincial de Jujuy, y es fácilmente accesible a través de la ruta nacional 34 (Figura 1). La región es un área de transición entre las Yungas y la llanura chaqueña. El clima es tropical con altas temperaturas diurnas casi todo el año; en verano, especialmente durante diciembre y enero, las temperaturas absolutas pueden alcanzar los 46 °C, mientras que en las noches de invierno (junio y julio), las temperaturas caen esporádicamente por debajo de los 10 °C. La actividad económica de Fraile Pintado se basa principalmente en la producción de tomate, maíz, frijol, berenjena, pimiento, pepino y calabacín. En general, los agricultores mezclan diferentes agroquímicos, ignorando las instrucciones de manejo y preparación de los mismos. En el caso de los trabajadores rurales, sólo unos pocos conocen los pesticidas que aplican y el efecto sobre su salud, no usan ningún tipo de medidas de protección personal como guantes, protección para los brazos o mascarilla facial al mezclar, manipular o aplicar el stock de formulaciones de pesticidas. Esto ha provocado que en los últimos 10 años hayan sufrido una exposición directa a estos compuestos, ya sea por inhalación, por la piel o por los ojos.



Figura 1. Ubicación del departamento de Ledesma en la provincia de Jujuy, Argentina.

El presente estudio fue aprobado por "Secretaría de Coordinación General del Sistema de Salud. Dirección Provincial de Capital Humano. Comité de Ética de la Investigación de la Provincia de Jujuy". Todos los participantes recibieron información escrita específica sobre el objetivo del estudio y dieron su consentimiento informado por escrito. Antes de la extracción de sangre, se pidió a cada individuo que completara un cuestionario estructurado anónimo sobre sexo, edad, tabaquismo, hábitos alimenticios, consumo de alcohol, exposición previa a radiografías de diagnóstico, uso de drogas terapéuticas y exposición laboral a agentes peligrosos. Para garantizar el anonimato de los participantes, se numeró cada encuesta. Se hicieron preguntas adicionales relacionadas con la agricultura solo a las personas del grupo expuesto, como el uso de pesticidas y la duración de la exposición. Los criterios de inclusión fueron consumo moderado de alcohol y tabaquismo, no haber recibido rayos X, exposición a agentes genotóxicos o terapéuticos y uso de drogas (Oliver y cols., 2000; Fagerström, 1978; Becoña Iglesias y cols., 2009; OPS y OMS, 2008; WHO, 2015).

Los criterios de exclusión incluyeron participantes que no firmaron el consentimiento informado antes de la encuesta, grandes fumadores (≥ 20 cigarrillos por día en los últimos 10 años), consumidores de más de 5 vasos de alcohol por día y personas expuestas a factores dañinos distintos a aquellos incluidos en este estudio. La información se ingresó en una base de datos especialmente diseñada.

Recolección celular y ensayo bucal MN

Antes de la recolección, se les pidió a los trabajadores rurales enjuagarse la boca con agua. Luego, las células de la mucosa bucal exfoliadas se recogieron suavemente usando un cepillo de dientes y se colocaron en 10 ml de solución salina celular (NaCl 3.72%). Antes de la preparación del portaobjetos, las células se lavaron para permitir la identificación de los diferentes tipos celulares. El ensayo de micronúcleos de mucosa bucal se realizó de acuerdo con Thomas y otros, 2009 con algunas modificaciones, se usó metanol / ácido acético (3: 1) para la fijación. Los portaobjetos se tiñeron con orceína y se codificaron para la evaluación de anomalías nucleares.

Análisis citogenético

Se contó un total de 1000 células de la mucosa bucal por caso para el ensayo de MN. Las preparaciones teñidas se observaron en un microscopio óptico ($400 \times -1000 \times$ aumento). Colorante Giemsa no se usó porque puede conducir a resultados falsos positivos (Nersesyan y otros, 2006).

Determinación de la actividad de AChE

Se tomaron muestras de sangre de los individuos expuestos dentro de un rango de 24-48 h después de la aplicación de agroquímicos. Posteriormente, se usaron 2 ml de sangre heparinizada de cada individuo para determinar la actividad de RBC-AChE de acuerdo con el método de Ellman (Ellman y otros, 1961).

Las muestras heparinizadas se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. Los glóbulos rojos se lavaron dos veces con solución fisiológica y se hemolizaron con agua destilada. Una fracción del hemolizado se incubó con la solución tampón (fosfato) -cromógeno (ácido 5, 5-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) durante 3 minutos a 30°C . El sustrato yoduro de acetiltiocolina se usó a una concentración final de 8 mmol / L. Se midió la absorbancia inicial y luego cada 30 s durante 2 minutos a 405 nm. La actividad de AChE (UI / L; valores de referencia, 7120 - 11760 UI / L) se calculó como el promedio de la absorbancia Δ / min.

Análisis estadístico

El análisis citogenético de los datos se realizó mediante la prueba T para muestras independientes. Las variables se agruparon en las siguientes categorías: exposición (expuesta / no expuesta), sexo (mujer / hombre), tabaquismo (sí / no), consumo de alcohol (sí / no) y edad (jóvenes / adultos / ancianos). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Las características demográficas de la población de estudio se presentan en la Tabla 1. En el grupo de control, la edad promedio fue de 35.36 ± 10.68 años (rango de edad, 19-50 años). En el grupo expuesto, la edad promedio fue de 34.92 ± 9.69 años (rango de edad, 18-52 años).

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

	Control	Expuestos
Tamaño de la muestra (n)	103	106
Hombres (%)	0.48	0.52
Mujeres (%)	0.52	0.48
*Edad	35.36 ± 10.68	34.92 ± 9.69
No fumadores (%)	0.62	0.78
Fumadores (%)	0.38	0.22
No bebedores (%)	0.46	0.47
Bebedores (%)	0.54	0.53
Uso de ropa protectora. (%)		
No	-	1
Si	-	0

* La edad se expresa como media ± desviación estándar

El tiempo de exposición a los pesticidas fue entre 0 y 10 años en el 28,44% de los casos, entre 10 y 20 años en el 41,28% y > 20 años en el 30,27% de los casos.

Actividad AChE

En el grupo expuesto, la actividad de AChE disminuyó en comparación con los controles (9132.25 y 4093.44 UI / L, respectivamente; $p < 0.0001$). Por otro lado, las diferencias entre categorías no fueron significativas entre los grupos (control y grupos expuestos: fumar, 10.35 y 9.09; $p = 0.0561$; consumo de alcohol, 9.62 y 10.48; $p = 0.2567$; sexo, 9.80 y 10.33; $p = 0.4916$)

Resultados citogenéticos

Los resultados citogenéticos obtenidos mostraron un aumento significativo en la frecuencia de MN bucal en individuos expuestos en comparación con los controles (10.08 y 2.15; $p < 0.0001$) (Tabla 2). Sin embargo, las diferencias entre las categorías no fueron significativas en ambos grupos de estudio, lo que demuestra que estas variables fueron independientes (grupos expuestos y de control: tabaquismo, 10.35 y 9.09; $p = 0.0561$; consumo de alcohol, 9.62 y 10.48; $p = 0.2567$; sexo, 9.80 y 10,33; $p = 0,4916$).

Tabla 2. Incidencia de daño citogenético evaluado por el ensayo de micronúcleos en células epiteliales bucales*.

Grupos estudiados	%MN	%BN	%CP	%KL	%CC	%KH	%BN
Control	0.21 ± 0.01**	0.41 ± 0.02**	0.46 ± 0.02**	0.98 ± 0.04**	0.25 ± 0.01**	0.21 ± 0.01**	0.12 ± 0.01**
Expuestos	1.00 ± 0.01**	1.70 ± 0.01**	0.29 ± 0.02**	1.24 ± 0.018**	1.21 ± 0.01**	1.27 ± 0.020**	1.31 ± 0.024**
Rangos de las diferentes alteraciones por cada 1000 cells							
Control	0 - 0.5	0.1 - 0.9	0.1 - 0.9	0 - 1.8	0 - 0.6	0 - 0.5	0 - 0.3
Expuestos	1.2 - 2.2	1.2 - 1.9	1 - 1.8	1 - 1.6	1 - 1.7	1 - 1.7	1.1 - 1.7

* Los resultados se presentan como medias ± desviación estándar. MN, micronúcleos; BN, brote nuclear; CP, células picnóticas; KL, células carioplásticas; CC, cromatina condensada; KH, células cariorrecticas; BN, células binucleadas

DISCUSIÓN

El contacto ocupacional con pesticidas representa un peligro potencial para la salud de los rociadores en campos agrícolas durante la fumigación, considerando que la exposición puede conducir a enfermedades crónicas y graves riesgos laborales (Yaduvanshi y otros, 2012). El efecto potenciado de la mezcla de pesticidas, actuando simultáneamente de diferentes maneras, aumenta su toxicidad y plantea un mayor riesgo mutagénico. El efecto tóxico de los pesticidas se ha confirmado mediante la medición directa del daño en el ADN mediante el análisis de la fragmentación del ADN nuclear asociada a la apoptosis (Li y otros, 2015). En nuestro estudio, la relación de frecuencia media (FR) utilizada para medir el daño en el ADN y calculada con referencia a la presencia de MN y otras anomalías nucleares, reveló los posibles efectos de la exposición a pesticidas. Hallazgos similares se han reportado en otros lugares (Martínez-Valenzuela y otros, 2017; Carbajal-López y otros, 2016). Se toman varios puntos finales citogenéticos para biomonitorizar la exposición humana a sustancias cancerígenas, donde el aumento en la frecuencia de MN se considera un predictor de un riesgo elevado de cáncer (Carbajal-López y otros, 2016).

Nuestros resultados demostraron que la frecuencia de MN aumentó significativamente en individuos expuestos, lo que fue consistente con otros informes (Paiva y otros, 2011). Los rociadores de pesticidas son el grupo de trabajadores agrícolas más frecuentemente expuesto, con resultados positivos obtenidos en 18 de 27 estudios

y que presentan tasas de exposición 1.12-7.67 más altas que otros trabajadores (Bolognesi, 2003). El riesgo de exposición es mayor en los trabajadores empleados en la producción de pesticidas, así como en los agricultores que usan pesticidas; en consecuencia, son más susceptibles a los posibles efectos de los pesticidas en la salud (Bolognesi y otros, 2011).

La inhibición de la colinesterasa se usa como un biomarcador de exposición, no como un indicador de toxicidad para los organofosforados. Los biomarcadores utilizados habitualmente para evaluar la exposición a pesticidas proporcionan información sobre la exposición en el momento del muestreo y no es probable que reflejen exposiciones que ocurrieron varios días antes (Rohlman y otros, 2011). En nuestro estudio, la actividad de AChE en los trabajadores ocupacionales también disminuyó en comparación con los sujetos de control, lo cual está de acuerdo con los estudios informados previamente (Jintana y otros, 2009).

Los pesticidas pueden inhibir la actividad de AChE ya que modulan el sitio activo de la enzima, lo que resulta en una acumulación excesiva de acetilcolina en las terminaciones nerviosas y provoca el bloqueo de la transmisión del impulso nervioso. Los organofosforados, los ésteres del ácido fosfórico, son una clase de inhibidores irreversibles de la AChE (Grupta y Bechan, 2016). Su escisión por AChE deja un grupo fosforilo en el sitio esterático, que es lento para hidrolizarse y puede unirse covalentemente. Por otro lado, los carbamatos, ésteres del ácido N-metil carbámico, son inhibidores reversibles de la actividad AChE

que se hidrolizan en horas y ocupan el sitio esterático por cortos períodos de tiempo.

La actividad de AChE en seres humanos puede considerarse como un biomarcador para evaluar el estado colinérgico central (Grupta y Bechan, 2016). Los pesticidas pueden inducir estrés oxidativo (SO), y la producción excesiva de intermedios reactivos y especies reactivas de oxígeno pueden causar daño al ADN (Upadhyay y otros, 2008; Muniz y otros., 2008). La susceptibilidad de los glóbulos rojos y los linfocitos a la SG debido a la exposición a pesticidas es una función del equilibrio general entre el grado de SG y la capacidad de defensa antioxidante (Zeljezic y otros, 2008). Por otro lado, la baja actividad de glóbulos rojos observada no solo indica su integridad, sino que también actúa como un biomarcador viable para evaluar el grado de exposición de estas células a productos químicos naturales o antropogénicos (Callahan y Kruckenberg, 1967). La inhibición de la actividad de AChE en las neuronas como resultado de la exposición a los ésteres de los ácidos fosfórico, sulfúrico y sulfónico y a los carbamatos representa un parámetro real del estrés toxicológico. Sin embargo, la determinación de dicha inhibición a nivel neuronal es prácticamente imposible, pero puede realizarse indirectamente a través de la medición de la actividad de AChE en los glóbulos rojos. Esto proporciona una medida directa del daño causado, independientemente del tipo de químico inhibidor de la ECA, y ha demostrado ser el indicador más apropiado para controlar la exposición biológica (Callahan y Kruckenberg, 1967).

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la frecuencia de MN y una disminución significativa en la actividad de AChE en los trabajadores agrícolas. Estos hallazgos confirman que el ensayo de MN en la mucosa bucal y la evaluación de la actividad de AChE son biomarcadores útiles para determinar la exposición humana a los pesticidas y la necesidad de realizar un biomonitoreo permanente en agricultores expuestos ocupacionalmente a pesticidas y sus mezclas. Haciéndolo extensivo a los trabajadores agrícolas que se dedican al cultivo de diferentes especies vegetales en la Provincia de Jujuy. Al mismo tiempo, los resultados actuales indican la necesidad de mejorar las condiciones de trabajo de los trabajadores rurales, así como la disponibilidad

de información y acciones contra el problema. Dado que estos ensayos son marcadores importantes de efecto temprano, permiten detectar un nivel reversible de daño y, por lo tanto, juegan un papel importante en la prevención de la salud en la población en estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todas las personas de Fraile Pintado, que voluntariamente participaron en este estudio, especialmente a las Farmacéuticas María Marcela Konicek y Fabiola Carolina Barrera por colaboración en la organización de la toma de muestras para el presente estudio. Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto "Evaluación del efecto de la exposición a plaguicidas a través del uso de biomarcadores en trabajadores del sector hortícola y del contexto socio-sanitario de Fraile Pintado Jujuy" subsidiado por Secretaría de Ciencia y Técnica y Estudios Regionales de la Universidad Nacional de Jujuy, SECTER.

BIBLIOGRAFÍA

- Alleva, R.; Manzella, N.; Gaetani, S.; Bacchetti T. Bracci, M.; Ciarapica, V.; Monaco, F.; Borghi, B.; Amati M.; Ferretti, G. & Tomasetti, M. 2018. Mechanism underlying the effect of long term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. *Environ. Toxicol.* 33:476–487.
- Becoña Iglesias E., Fernández del Río E., López Durán A. y Míguez Varela M., (2009). La escala del Síndrome de Dependencia de la Nicotina (NDSS) en una muestra de fumadores que demandan tratamiento para dejar de fumar *Psicothema*. Vol. 21, nº 4, pp. 579-584 www.psicothema.com
- Bianco, G.E.; Suarez, E.; Cazon, L.; de la Puente T.B.; Benitez Ahrendts, M.R. & Julio César De Luca. 2017. Prevalence of chromosomal aberrations in Argentinean agricultural workers. *Environ Sci. Pollut. Res.* 24:21146–21152.
- Bolognesi, C. & Holland N. 2016. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutat. Res.* 770, 183–203.

- Bolognesi, C.; Roggieri, P.; Ropolo, M.; Thomas, P.; Hor, M.; Fenech, M.; Nersesyan, A. & Knasmueller, S. 2015. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis* 30:545–555.
- Bolognesi, C.; Creus, A.; Ostrosky-Wegman, P. & Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26:19–26.
- Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543:251–72.
- Callahan, J.F. & Kruckenberg, S.M. 1967. Erythrocyte cholinesterase activity of domestic and laboratory animals: normal levels for nine species. *Am. J. Vet. Res.* 28:1509–1512.
- Carbajal-López, Y.; Gómez-Arroyo, S.; Villalobos-Pietrini, R.; Calderón-Segura, M.E. & Martínez-Arroyo, A. 2016. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environ Sci Pollut Res* 23:2513–2520.
- Castañeda-Yslas, I.J.; Arellano-García, M.E.; García-Zarate, M.A.; Ruíz-Ruiz, B.; Zavala-Cerna, M.G. & Torres-Bugarín, O. 2016. Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of manadero agricultural valley, Baja California, Mexico. *J. Toxicol.* 7934257.
- Chakraborty, T.; Das, U.; Poddar, S.; Sengupta B. & De, M. 2006. Micronuclei and chromosomal aberrations as biomarkers: a study in an arsenic exposed population in West Bengal. *India. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76:970–976
- Da Silva, J.; Moraes, C.R.; Heuser, V.D.; Andrade, V.M.; Silva, F.R.; Kvitko, K.; Emmel, V.; Rohr, P.; Bordin, D.L.; Andreazza, A.C.; Salvador, M.; Henriques, J.A. & Erdtmann, B. 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23:415–22.
- Damalas, C.A. & Koutroubas, S.D. 2016. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. *Toxics*. 8. pii: E1.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr & Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88–95.
- Espitia-Pérez, L.; Sosa, M.Q.; Salcedo-Arteaga, S.; León-Mejía, G.; Hoyos-Giraldo, L.S.; Brango, H.; Kvitko, K.; da Silva, J. & Henriques, J.A. 2016. Polymorphisms in metabolism and repair genes affect DNA damage caused by open-cast coalmining exposure. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 808:38–51.
- Fagerström, K., (1978). Cuestionario de tolerancia de Fagerström, test de Fagerström. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/3-2015-05-20-TEST%20DE%20FAGERSTR%C3%96M.pdf>
- Gupta, V.K. & Bechan, S. 2016. Alleviation of acute poisoning of organophosphates in humans. *Anat. Physiol. Biochem. Int. J.* 1:555558.
- Jintana, S.; Sming, K.; Krongtong, Y. & Thanyachai, S. 2009. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 82:833–842.
- Li, D.; Huang, Q.; Lu, M.; Zhang, L.; Yang, Z.; Zong, M.; & Tao, L. 2015. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* 135:387–393
- Lionetto, M.G.; Caricato, R.; Calisi, A.; Giordano, M.E. & Schettino, T. 2013. Acetyl cholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Biomed. Res. Int.* 321213
- Martínez-Valenzuela, S.M.; Waliszewski, O. & Amador-Muñoz, E. 2017. Aerial pesticide application causes DNA damage in pilots from Sinaloa, Mexico. *C. Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:2412–2420
- Muniz, J.F.; McCauley, L.; Scherer, J.; Lasarev, M.; Koshy, M.; Kow, Y.W.; Nazar-Stewart, V.; & Kisby, G.E. 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot

- study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227:97–107.
- Nersesyan, A.; Kundi, M.; Atefie, K.; Schulte-Hermann, R. & Knasmüller, S. 2006. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 15:1835–1840.
- Oliver D., Costanza M., Ballvé J. L., Monteverde X., Zarza E., Fernández C., Pérez J., Murillo C. (2000). El tabaquismo en Atención Primaria El Sevier. *Medicina Integral. ABS Florida Nord. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.* Vol.35. Num. 2. páginas 72–80
- OPS y OMS, 2008. Alcohol y atención primaria de la salud. *Informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas.* Organización Panamericana de la salud y Organización Mundial de la Salud. Biblioteca Sede OPS - Catalogación en la fuente. Washington, D.C.: OPS.
- Paiva, J.C.; Cabral, I.O.; Soares, B.M.; Sombra, C.M.; Ferreira, J.R.; Moraes, M.O.; Cavalcanti, B.C. & Pessoa, C. 2011. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): genotoxic and cytogenetic studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 52:492–501
- Remor, A.P.; Totti, C.C.; Moreira, D.A.; Dutra, G.P.; Heuser, V.D. & Boeira, J.M. 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Int.* 35:273–8.
- Rohlman, D.S.; Anger, W.K.; & Lein, P.J. 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32:268–76.
- Singh, S.; Kumar, V.; Thakur, S.; Banerjee, B.D.; Chandna, S.; Rautela, R.S.; Grover, S.S.; Rawat, D.S.; Pasha, S.T.; Jain, S.K.; Ichhpujani, R.L.; & Rai, A. 2011. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31:278–85.
- Thomas, P.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi S.; Zeiger E.; Knasmueller S. & Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 4:825–37.
- Tolbert, P.E.; Shy, C.M.; & Allen, J.W. 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.* 34:840–850.
- Torres-Bugarín, O.; Zavala-Cerna, M.G.; Macriz-Romero, N.; Flores-García, A. & Ramos-Ibarra, M.L. 2013. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente* 8:4–11.
- Upadhyay, G.; Singh, A.K.; Kumar, A.; Prakash, O. & Singh, M.P. 2008. Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 596:146–152.
- WHO Framework Convention on Tobacco Control, Compendium of indicators, 2015. (1st edition) Editions of the WHO, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. ISBN 92 4 3591010.
- Yaduvanshi, S.K.; Srivastava, N.; Marotta, F.; Jain, S. & Yadav, H. 2012. Evaluation of micronuclei induction capacity and mutagenicity of organochlorine and organophosphate pesticides. *Drug Metab. Lett.* 6:187–197.
- Zeljezic, D.; Vrdoljak, A.L.; Kopjar, N.; Radic, B. & Milkovic Kraus, S. 2008. Cholinesterase inhibiting and genotoxic effect of acute carbofuran intoxication in man: a case report. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 103:329–35.



Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional