

**SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO  
SUE CARIBE**



**MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**DAÑO CITOGENÉTICO POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN NIÑOS EN EL  
MUNICIPIO DE SAN PELAYO DEPARTAMENTO DE CÒRDOBA – COLOMBIA**

**SIBILA DE JESUS NEGRETE HERNÁNDEZ**

**Director**

**JOSÉ LUIS MARRUGO NEGRETE. Phd**

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**MONTERIA, 2021**

**SISTEMA DE UNIVERSIDADES ESTATALES DEL CARIBE COLOMBIANO  
SUE CARIBE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**DAÑO CITOGENÉTICO POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN NIÑOS EN EL  
MUNICIPIO DE SAN PELAYO DEPARTAMENTO DE CÒRDOBA – COLOMBIA**

**SIBILA DE JESÚS NEGRETE HERNÁNDEZ**

**Bióloga**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Magíster  
en Ciencias Ambientales**

**Director**

**JOSÉ LUIS MARRUGO NEGRETE. Phd**

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**MONTERIA, 2021**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

---

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Jurado

Montería, Octubre de 2019

## **DEDICATORIA**

***A Dios por darme la fuerza y motivación para retomar y cumplir con una de mis más grandes metas en mi vida “terminar mi maestría”.***

***A mi familia, mis amados hijos y esposo que siempre estuvieron motivándome para seguir con este sueño que hoy se hace realidad.***

***A mis padres y hermanos que nunca perdieron la fe en mí, siempre con sus bolitas palabras llenándome de energía y finalmente dar por terminada esta obra.***

***A todos los profes y amigos que siempre estaban dispuestos a colaborar de la más bonita manera. Los quiero mucho.***

**SIBILA DE JESÚS NEGRETE HERNÁNDEZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme el conocimiento y motivación para alcanzar esta gran meta en mi vida.*

*A Colciencias y a la Universidad de Córdoba por la financiación del presente trabajo, mediante al proyecto No. 375 – 2013.*

*A los jurados por todos sus aportes y apoyo.*

*Al Dr. José Luís Marrugo por la oportunidad, confianza y paciencia a la hora de desarrollar este trabajo y aportar grandes conocimientos en mi vida profesional.*

*A mis compañeros y a los profesores de la Maestría por sus conocimientos aportados brindados en esta etapa de formación.*

*A mis compañeros de trabajo Clelia, José David, Javier, Pamela y Saudith y demás compañeros del laboratorio de toxicología y gestión ambiental por su apoyo incondicional.*

*A todas las personas que con su participación en el Proyecto de investigación contribuyeron con esta gran obra personal y académica*

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS GENERALES	20
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
3. MARCO DE REFERENCIA	21
3.1 Biomonitorización De Poblaciones Expuestas Agentes Genotóxicos	21
3.2 BIOMARCADORES	22
3.2.1 Ensayo Cometa	23
3.2.2 Ensayo Micronúcleo en Células Exfoliadas de la Mucosa Oral	24
3.3 LOS PLAGUICIDAS Y SU EFECTO TOXICOLÓGICO EN EL SER HUMANO	26
3.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS	27
3.3.1.1 Toxicidad	27
3.3.1.2 Plaguicidas Organoclorados	29
3.3.1.3 Plaguicidas Organofosforados	29
3.3.1.4 Plaguicidas Carbamatos	30
3.3.1.5 Piretroides Sintéticos	31
3.3.1.6 Plaguicidas Triazinicos	32
4. ANTECEDENTES	33
4.1 ENSAYO COMETA	33
4.2 ENSAYO MICRONÚCLEOS	35
5. METODOLOGÍA PROPUESTA	39
5.1 ÁREA DE ESTUDIO	39
5.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	40
5.3 GRUPO EXPUESTO	40
5.4 GRUPO CONTROL	41
5.5 MUESTRA	41
5.6 ENCUESTA	41

5.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	42
5.8 ASPECTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	42
5.9 TOMA DE MUESTRAS EN SANGRE, MUCOSA ORAL Y ORINA EN INFANTES EXPUESTOS Y GRUPO CONTROL	42
5.10 ENSAYO COMETA	43
5.10.1 Controles Positivos y Negativos	45
5.10.2 Criterios de Identificación del Ensayo Cometa	45
5.10.3 Análisis a Través del Índice de Daño para cada Muestra	46
5.11 MUCOSA BUCAL	46
5.11.1 Ensayo De Micronúcleos	46
5.12 ANÁLISIS DE METABOLITOS DE PLAGUICIDAS EN ORINA	48
5.12.1 Atrazina y Metabolitos en Orina	48
5.12.2 Determinación de creatinina en orina	49
5.12.3 Fundamento del método	50
5.12.4 Reactivos utilizados	50
5.12.5 Muestra de orina	50
5.12.6 Procedimiento	50
5.12.7 Cálculos	51
5.12.8 Intervalos Biológicos de Referencia de Creatinina en Niños	51
5.12.9 Control de Calidad	51
5.12.10 Características Metrológicas del Método	51
5.12.11 Control de Calidad métodos Cromatográficos	52
6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICOS DE LAS MUESTRAS	53
7. RESULTADOS	54
7.1 Características Sociodemograficas General Evaluadas en la Muestra Estudiada	54
7.2 Hábitos y Percepción del Riesgo para la Salud Respecto al Uso de los Plaguicidas	56
7.3 Otros Factores de Riesgo para la Salud y de Exposición a Plaguicidas	58

7.4 Biomarcadores de Daño Citogenéticos y de Exposición evaluados en la Muestra Evaluadas	59
7.5 Correlación entre Biomarcadores de Daño Citogenéticos con los Biomarcadores de Exposición y Variables Sociodemográficas que presentan Riesgo de Exposición	61
8. DISCUSIÓN	63
8.1 CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS GENERALES EVALUADAS EN LA MUESTRA ESTUDIADA	63
8.2 HÁBITOS Y PERCEPCIÓN DEL RIESGO PARA LA SALUD RESPECTO AL USO DE LOS PLAGUICIDAS	66
8.3 OTROS FACTORES DE RIESGO PARA LA SALUD Y DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS	67
8.4 BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGENÉTICOS Y DE EXPOSICIÓN EVALUADOS EN LA MUESTRA EVALUADAS	69
8.5 CORRELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGENÉTICOS CON LOS BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS QUE PRESENTAN RIESGO DE EXPOSICIÓN	71
9. CONCLUSIONES	75
10. RECOMENDACIONES	77
11. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
ANEXOS	104

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los plaguicidas según categoría toxicológica	28
<b>Tabla 2.</b> Criterios para identificar anormalidades nucleares	47
<b>Tabla 3.</b> Concentración urinaria de Atrazina y sus metabolitos	49
<b>Tabla 4.</b> Valores normales de creatinina en niños por años de edad en mg/dl	51
<b>Tabla 5.</b> Características sociodemográficas de la muestra de estudio	55
<b>Tabla 6.</b> Hábitos y percepción de riesgo de los plaguicidas sobre la salud de los niños	57
<b>Tabla 7.</b> Otros hábitos de riesgo en la salud de los niños por exposición a plaguicidas	58
<b>Tabla 8.</b> Biomarcadores de daño citogenéticos y de exposición evaluados en la muestra de estudio	60
<b>Tabla 9.</b> Correlación entre los biomarcadores de daño citogenéticos, biomarcadores de exposición y variables sociodemográficas que presentan riesgo de exposición a plaguicidas	62

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág</b>
<b>Figura. 1</b>	Ubicación geográfica de San Pelayo en Córdoba y Colombia	39
<b>Figura. 2</b>	Ubicación geográfica de la muestra en Pelayito	40
<b>Figura. 3</b>	Microfotografía de los cometas	45

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
<b>ANEXO 1.</b> Encuesta	104
<b>ANEXO 2.</b> Evidencias de estrategias de comunicación	107
<b>ANEXO 3.</b> Formato de consentimiento informado del proyecto	108
<b>ANEXO 4.</b> Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk) para las variables respuesta involucradas en los análisis de comparación entre grupos.	112
<b>ANEXO 5.</b> Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk) para las variables involucradas en los análisis de correlación en el grupo de Pelayito.	113
<b>ANEXO 6.</b> Registros fotográficos sobre la cercanía de los cultivos a las viviendas	114

## RESUMEN

En Colombia las actividades agrícolas constituyen una fuente de importancia económica, pero ejerce un impacto negativo sobre la salud de las personas y los ecosistemas que se encuentran en la zona.

En el departamento de Córdoba, hay reportes de la presencia de plaguicidas en suelos, aguas, y sedimentos (Marrugo *et al*, 2010). Así mismo hay reportes de dos estudios para los años 2015 y 2016 en poblaciones de niños asociados a zonas agrícolas, donde se evaluó el daño citogenético mediante el uso de ensayo Cometa, ensayo de Micronúcleos y presencia de metabolitos de plaguicidas en orina reportando mayor frecuencia de daño en relación a la muestra control. El municipio de San Pelayo posee un área de 447,6 km<sup>2</sup>, siendo la zona rural el 99.2 %; lo que lo convierte en un lugar casi en su totalidad con un uso del suelo dedicado a la ganadería y a la agricultura, exponiendo a sus habitantes y en especial a los niños que viven asociados a muchos de estos residuos peligrosos.

**Objetivos.** Evaluar el daño citogenético por exposición a plaguicidas de niños en edades de 5 a 15 años que viven zonas agrícolas en el municipio de San Pelayo departamento de Córdoba, Colombia. **Materiales y Métodos.** Se tomaron muestras de sangre periférica y orina a niños que viven asociados a las zonas de cultivos y niños de ciudad de Montería como grupo de control. La evaluación por exposición a plaguicidas se hizo a través de biomarcadores de exposición (concentraciones de atrazina en orina (ATZ) y sus metabolitos) y biomarcadores de daño citogenético (frecuencia de micronúcleos (MN) y Ensayo cometa (EC)).

**Resultados.** Se registraron concentraciones medibles de ATZ y / o sus metabolitos, así como mayor frecuencia de MN y se evidencio daño en el ADN en los parámetros evaluados de las muestras de sangre tomada en Pelayito con relación al control. Se registraron asociaciones positivas significativas entre la presencia de

metabolitos urinarios y frecuencia de micronúcleos ( $r = 0.368$ ,  $p < 0.05$ ) y el índice de daño al ADN ( $r = 0.374$ ,  $p < 0.05$ ). **Conclusiones.** Los niños están expuestos a uno de los plaguicidas más usados en Pelayito, mostrando una relación positiva con los biomarcadores de daño citogenéticos (MN y EC), comparándolas con el grupo control y de esta forma poniendo en riesgo la salud de los niños que se encuentran en esta zona de cultivo.

Del mismo modo los resultados pueden ser útiles en la implementación de políticas de protección de salud pública y comunidades científicas. Siendo este el primer estudio de daño al ADN en niños y evaluación de la mutagenicidad en niños de San Pelayo asociados a una zona agrícola.

**Palabras claves:** Plaguicidas, atrazina, niños, genotoxicidad, mutagenicidad.

## ABSTRACT

In Colombia, agricultural activities are a source of economic importance; however, it has a negative impact on people's health and ecosystems in the area.

In the department of Córdoba, there are reports about the presence of pesticides in soils, water, and sediments (Marrugo et al, 2010). Moreover, there are reports of two studies from 2015 and 2016 in infant populations associated with agricultural areas, where cytogenetic damage was evaluated through the use of the Comet Assay, Micronucleus test and presence of pesticide metabolites in the urine reporting a higher frequency of damage in relation to the control sample. The municipality of San Pelayo has an area of 447.6 km<sup>2</sup>, in which the rural area is represented by 99.2% of the populations. This makes almost the whole land dedicated to cattle raising and agriculture, exposing its inhabitants and children to live with many of these hazardous waste. Objective. To evaluate the cytogenetic damage caused by exposure to pesticides in children between the ages of 5 and 15 years old living in agricultural areas in the municipality of San Pelayo, Córdoba, Colombia. Materials and Methods. Peripheral blood and urine samples were taken from children living in the areas associated with the crop and children from the city of Monteria as a control group. The pesticide exposure evaluation was done through the exposure of biomarkers (Atrazine urinary concentration (ATZ) and its metabolites) and biomarkers of cytogenetic damage (frequency of micronuclei (MN) and Comet Assay (EC)). Results. Measurable concentrations of ATZ and / or its metabolites were found, as well as a higher frequency of MN and DNA damage was evidenced in the parameters evaluated of blood samples taken in Pelayito in relation to the control. Significant positive associations were registered between the presence of urinary metabolites and micronucleus frequency ( $r = 0.368$ ,  $p < 0.05$ ) and the DNA damage index ( $r = 0.374$ ,  $p < 0.05$ ). Conclusions. Children are exposed to one of the most widely used pesticides in Pelayito, showing a positive relationship with cytogenetic damage biomarkers (MN and EC), comparing them with the control group. Putting

children's health in risk. Furthermore, the results can be useful in the implementation of public health protection policies and scientific communities. This is the first study of DNA damage in children and the evaluation of mutagenicity in children of San Pelayo associated with an agricultural area.

**Keywords:** Pesticides, atrazine, children, genotoxicity, mutagenicity.

## INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícolas constituyen una fuente de importancia económica en Colombia, pero ejerce un impacto negativo sobre el medio ambiente y la salud de las personas con uso indiscriminado de plaguicidas para el control de plagas, lo que traduce en diversos e impredecibles problemas sobre la salud de las personas.

La mayor cantidad de envenenamientos en el mundo ocurre por plaguicidas; la Organización Mundial de la Salud, OMS, estima que en el mundo ocurren más de 3 millones de envenenamientos anuales y que probablemente la mortalidad es mayor del 1% en algunos países. Según estadísticas mundiales, uno de cada 7 trabajadores se intoxica por el uso de plaguicidas. Estos datos son más alarmantes si se tiene en cuenta que en América Latina, donde más se ha incrementado su uso en los últimos años y con ello las intoxicaciones. (Zuluaga, 2000).

En Colombia hay más de 1.200 plaguicidas comerciales registrados en el ICA y están formulados con base en más de 350 ingredientes activos, de los cuales también el 95% son químicos y el 5% biológicos o naturales. El 17% de los ingredientes activos químicos se encuentran prohibidos o severamente restringidos en otros países, de acuerdo con la Lista Consolidada de Naciones Unidas. (ICA, 2009)

Actualmente, por diferentes estudios realizados a nivel mundial y local, existen reportes de los posibles daños que estos productos causan sobre la salud de las personas en relación a que son capaces de producir lesiones agudas y persistentes, que se manifiestan con la aparición enfermedades como el cáncer, defectos de nacimiento, las lesiones hepáticas, alergias, afecciones del sistema nervioso central y periférico, y del funcionamiento del sistema endocrino. Los trastornos reproductivos, también, son causados por productos químicos que alteran las funciones endocrinas. Existe especial interés en el posible trastorno en el

desarrollo, en el sistema inmunitario y en el aprendizaje de los niños expuestos a plaguicidas (PNUMA, 2004).

En el departamento de Córdoba, hay evidencia de la presencia de plaguicidas en suelos, aguas, peces y sedimentos de la zona a evaluar (Marrugo *et al*, 2010).

Estos pueden afectar la vida acuática vegetal y animal por acción tóxica directa, o indirectamente por contaminación de especies que sirven de alimento a otras, o por producir cambios físico-químicos en el ambiente acuático. El transporte a través de la corriente de los ríos desde zonas agrícolas hasta las zonas costeras, estuarios y desembocaduras, afecta los ambientes marinos de alimentación, cría y desarrollo de un gran número de especies acuáticas de importancia económica y ambiental (RAPALMIRA, 2000). Así mismo hay reportes de dos estudios para los años 2015 y 2016 en poblaciones de niños asociados a zonas agrícolas, donde se describe una mayor frecuencia de daño citogenético en relación al control.

El municipio de San Pelayo se encuentra ubicado en la parte norte del Sinú Medio en el departamento de Córdoba, el territorio municipal posee un área de 451,12 km<sup>2</sup> esto es, 45.112 hectáreas, dedicada a la ganadería, a la agricultura, la pesca que son la base de la economía y otros usos, los principales cultivos son el algodón, maíz, arroz, plátano, frijol, yuca y ñame. Las tierras en su gran mayoría están dedicadas a la ganadería extensiva y la otra parte a la agricultura tecnificada. La zona rural representa el 99.2 %, con un área de 447,6 km<sup>2</sup> del territorio municipal. San Pelayo presenta un perímetro de sistemas de conducción de aguas que la hacen parecer rodeada de agua, principalmente en la zona norte y noroeste, en donde sus límites son el río Sinú, el cual en época de invierno derrama sus excedentes a los predios aledaños o que hacen parte de su plano inundable.

En cuanto al origen de los insumos utilizados en el proceso productivo del sector agropecuario como son fertilizantes, herbicidas, fungicidas, plaguicidas en el caso

del sector agrícola y productos veterinarios para el caso de la ganadería, estos son importados en su mayoría de países industrializados y en un bajo porcentaje provienen de la industria nacional. El capital humano vinculado a la actividad productiva posee un bajo nivel educativo y poco capacitado en el área técnica agropecuaria.

San Pelayo presenta un perímetro de sistemas de conducción de aguas que la hacen parecer rodeada de agua, principalmente en la zona norte y noroeste, en donde sus límites son el río Sinú, el cual en época de invierno derrama sus excedentes a los predios aledaños o que hacen parte de su plano inundable. El abastecimiento de agua de la población está dado por captación de fuentes de aguas superficiales y en algunos casos sin ningún tratamiento adecuado para su potabilización.

El uso de plaguicidas en la agricultura en el municipio puede estar causando grave problema de contaminación en los ecosistemas durante los procesos de transporte, almacenamiento o aplicación. La contaminación ocurre directa o indirectamente por derivas, por escorrentía, por drenajes de suelos tratados y durante el lavado de equipos de aspersión o por derrames accidentales poniendo en alto riesgo la salud de los niños asociadas a estas zonas de cultivos, además suelen convivir con los plaguicidas a muy temprana edad, ya sea, durante el almacenamiento dentro de la misma vivienda, la dosificación, cuando se hace la aplicación y al dejar desecho de los envases (Casadinho, 2005). Para ello se evaluó el daño citogenético en niños con edades de 5 a 15 años expuestos, mediante el uso de una batería de biomarcadores de efecto temprano en sangre periférica (Ensayo cometa) y Micronucleos en epitelio oral, así como, la determinación de la presencia de metabolitos de plaguicida en orina. Hasta la fecha no existen investigaciones científicas que permitan evidenciar el impacto de éstos sobre la salud de los infantes que se encuentran en las áreas agrícolas. Por lo anterior es de suma importancia realizar estudios que arrojen información al respecto y que permita que los niños,

en caso de estar afectados reciban la información y atención necesaria. Adicionalmente arrojará información que servirá como punto de partida para otras investigaciones en este tema.

Los resultados del estudio se analizaron utilizando estadística descriptiva de las variables citogenéticas y metabolitos encontrados en las muestras de orina, estableciendo relación o asociación con la frecuencia de daño encontrado. La información obtenida permitirá generar conocimiento que serán útiles para los organismos de control (secretaría de salud) en la implementación de programas de vigilancia epidemiológica en la zona, y seguimiento y control del uso de plaguicidas en las actividades agrícolas que pueden estar impactando el medio ambiente y la salud de los niños.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el daño citogenético por exposición a plaguicidas de niños en edades de 5 a 15 años que viven zonas agrícolas en el municipio de San Pelayo departamento de Córdoba – Colombia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los efectos genotóxicos en linfocitos de sangre periférica de los niños expuestos a plaguicidas utilizando las técnicas de ensayo cometa (EC) y Análisis de Micronúcleos (MN) en mucosa oral.
- Determinar la presencia de metabolitos secundarios de plaguicidas en orina de niños expuestos a plaguicidas.
- Establecer la relación entre el daño genotóxico y la presencia de metabolitos urinarios de plaguicidas en niños expuestos en la zona agrícola.

### 3. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 BIOMONITORIZACIÓN DE POBLACIONES EXPUESTAS A AGENTES GENOTÓXICOS.

El biomonitoreo en poblaciones humanas es una herramienta útil para estimar el riesgo genético frente a la exposición de mezclas complejas de químicos e intentar establecer una relación entre los factores ambientales y enfermedad, detectando alteraciones iniciales en fases todavía no malignas (Benites *et al*, 2010).

Los estudios de monitorización se basa en el análisis de los compuestos químicos a las que diariamente estamos expuestos o de sus metabolitos en fluidos o tejidos humanos, como por ejemplo muestra de sangre, orina, cabello entre otros, también puede evaluar el riesgo de exposición mediante la determinación de las posibles alteraciones tanto físicas como bioquímicas inducidas en los individuos (Albertini, 1994), enfocados esencialmente sobre aberraciones cromosómicas (AC), frecuencia de micronúcleos (MN) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Bolognesi, 2003).

Los estudios de Biomonitorización humana constituyen una herramienta muy útil para conocer el grado de eficacia de las medidas políticas medioambientales adoptadas. Estos estudios hechos a poblaciones expuestas a algún agente sospechoso de causar daño genético son un complemento a los estudios epidemiológicos, buscando una correlación entre el factor de riesgo y un incremento de la incidencia de cáncer u otra enfermedad genética. Así pues, la finalidad de la investigación es la prevención de la enfermedad mediante la identificación de la causa ambiental que provoca (Bolognesi, 2003).

Algunos de los trabajos realizados monitoreando niños expuestos a plaguicidas,

donde se analizaron muestras de sangre mediante cromatografía de gases han revelado que el 100% de las muestras tuvo niveles detectables de p,p'-DDE, comparados con el control (Cejudo *et al.* 2012). En otro estudio Benites – Leite (2010) determino el efecto de la exposición ambiental a pesticidas sobre el material genético de niños, encontrando que la frecuencia de Micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral, de la población potencialmente expuesta presenta mayor frecuencia de micronúcleos, células binucleadas, cariorrexis, picnosis que la no expuesta y la diferencia es altamente significativa.

### **3.2 BIOMARCADORES**

Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales. Cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, ya sea químico, físico o biológico (WHO/ IPCS, 1993). Son parámetros biológicos que proveen información sobre el estado normal o patológico de un individuo o una población, y son utilizados para la comprensión de diferentes enfermedades en variados aspectos como: el tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad, respuestas a la terapia, evaluación experimental toxicológica de medicamentos o pesticidas, medición de riesgo ambiental y epidemiológico, además de evaluación de la intervención terapéutica, entre otros (Lock, E *et al.* 2008).

Según Albertini y colaboradores, los biomarcadores se pueden dividir en tres grupos: biomarcadores de exposición, de efecto y de sensibilidad (Albertini, 2001a, b, 2004).

Los biomarcadores de exposición indican que el agente ha entrado en el organismo, proporcionando información cuantitativa sobre la exposición y el ingreso de sustancias tóxicas en el organismo. Se basan en estimas y mediciones de dosimetría interna, o sea de la valoración de la concentración de los xenobióticos

y/o sus metabolitos en los medios biológicos. Los biomarcadores de exposición detectan también la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinógenos o sus metabolitos en diversos tejidos o secreciones corporales (Corchado. 2015)

Los biomarcadores de efecto reflejan la interacción del químico con los receptores biológicos. Estas alteraciones pueden anteceder al daño estructural, y su detección permitir la identificación precoz de exposiciones excesivas o peligrosas y/o ser lesiones que indican estados avanzados del proceso de daño. Estos últimos llegan a ser cambios permanentes en la célula, órgano u organismo producidos por exposiciones pasadas, lo que los hace útiles para el estudio de daño acumulativo. Si nos restringimos al caso de compuestos químicos potencialmente genotóxicos, los biomarcadores de efecto serán aquellos parámetros que permiten identificar cambios que afectan la integridad de material genético, a nivel cromosómico o genómico. (Larrea. 2007)

Los biomarcadores de sensibilidad por su parte se utilizan para identificar aquellos individuos dentro de una población que, por sus características genéticas, son más susceptibles a los daños causados por diversos agentes ambientales (Corchado. 2015)

La identificación de todos estos biomarcadores de genotoxicidad es muy útil ya que puede definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención de la enfermedad, que es el objetivo final de la biomonitorización (Pastor, 2002).

**3.2.1 Ensayo Cometa (EC).** Desde hace varias décadas el ensayo Cometa, o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño de ácido desoxirribonucleico, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitoreo en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ácido desoxirribonucleico. Este

ensayo se distinguió por su simplicidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía. Es una poderosa técnica que se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ADN después que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina (Rodríguez- rey. 2016).

Permite la detección de daño simple y doble cadena de ADN, este ensayo es potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido (Mudri y Carballo, 2006), su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis (Laffon *et al.*, 2004).

### **3.2.2 Ensayo Micronúcleos (MN) en Células Exfoliadas de la Mucosa Bucal.**

Los micronúcleos (MN), son pequeños núcleos con membrana definida que presentan una apariencia morfológica redonda o almendrada, similar a la del núcleo principal de la célula. Los fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros resultantes de acciones clastogénicas o aneugénicas, carecen del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático y se retrasan durante la división celular quedando excluidos del núcleo principal de la célula interfásica (Corchado. 2015).

El ensayo de MN, es una prueba ampliamente utilizada y es una alternativa eficaz, sencilla y económica para detectar la pérdida de material genético. Por otro lado, este método revela los efectos citotóxicos (apoptosis y necrosis) de células previamente expuestas a sustancias químicas, físicas y de origen biológicos (Hintzsche y Stopper, 2010). Además, de los Micronúcleos de las células exfoliadas describe otras anomalías nucleares las que de ser fenómenos que podrían

ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, son indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular; ya que las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo, donde las modificaciones son en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina; estas anormalidades se pueden distinguir de células normales por sus alteraciones ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo, entre ellas se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), núcleo picnótico (NP), cariolisis (CL), núcleo lobulado también llamado prolongación nuclear, “bud cell” o “broken eggs” (NL, BE) y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN), (Torres y Ramos. 2013).

El epitelio oral está compuesto por 4 estratos de poblaciones celulares estructurales, progenitoras y de maduración, incluyendo la lámina propia o tejido conectivo, las células basales o lámina basal, capa o estrato espinoso y una capa superficial de queratina. Una serie de estructuras parecidas a dedos, conocidas como “rete pegs” proyectados desde el tejido conectivo hacia la capa epidérmica produciendo un efecto ondulante de las células de la capa basal. En el epitelio oral se produce una constante renovación de células, en el cual las células que se desprenden son reemplazadas por nuevas células resultantes de la mitosis que se produce en la capa basal (González y Mora. 2013). Y es en esta capa, donde se encuentran las células madre capaces de expresar alteraciones genéticas durante la división celular. A esta capacidad especial proliferativa hacen de la mucosa oral una herramienta usada para monitorear efectos genotóxicos tempranos (Torres - Bugarin. 2013)

### **3.3 LOS PLAGUICIDAS Y SU EFECTO TOXICOLÓGICO EN EL SER HUMANO**

Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfiere de cualquier otra forma en la producción,

elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera. El término incluye a las sustancias o mezcla de sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de las cosechas para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. Este término no incluye los agentes biológicos para el control de plagas (los agentes bioquímicos y los agentes microbianos). (Decisión 436 Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola). Los plaguicidas químicos de uso agrícola son sustancias activas y productos que tienen la capacidad de erradicar o combatir organismos nocivos o no deseados, como las plagas, enfermedades y las malezas (Bejarano. 2011).

El consumo y la variedad de plaguicidas a nivel mundial se ha incrementado dramáticamente a la par del aumento de la población y de la producción agrícola (Zhang *et al*, 2011). Este proceso se ha acompañado del inadecuado uso de estos compuestos, lo cual tiene como resultado impactos graves tales como la contaminación del ambiente y riesgos para la salud de los seres humanos. Los casos de intoxicación aguda por plaguicidas representan un porcentaje elevado en cuanto a la morbilidad y a la mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo (Kishi *et al*, 2001).

Los plaguicidas pueden tener un efecto negativo sobre la salud humana cuando el grado de exposición supera los niveles considerados seguros. Las personas pueden tener dos formas de exposición; directa e indirecta: La exposición directa ocurre en el caso de un manejo inadecuado tanto por los operarios, trabajadores, agricultores, aplicadores, etc.; así mismo una exposición indirecta ocurre como en el caso de residentes y transeúntes, en particular durante la aplicación o un tiempo después de la aplicación. (Bejarano.2011)

Los efectos negativos más comunes de los plaguicidas químicos de uso agrícola observados, son dolores de cabeza, náuseas, vómitos, trastornos de personalidad,

dolores musculares, calambres, dolores de estómago y diarreas, que se deben a una exposición inadecuada durante la aplicación, la preparación o la mezcla de los productos y la manipulación de contenedores. Si el nivel de exposición crónico, a través del tiempo, es más alto que el nivel de destoxificación o limpieza habrá efectos crónicos (Machado. 2012).

Con el crecimiento de la población ha aumentado significativamente la frontera ganadera y la agraria causando un importante consumo en el uso de plaguicidas. Según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública de Colombia (Sivigila) en 2013 se reportaron al Sistema 8245 intoxicaciones por plaguicidas, seguido por 9214 casos en 2014, 8732 casos para el 2015 y 8786 casos para el 2016, convirtiéndose en la segunda causa de intoxicación por sustancias químicas a nivel nacional del mismo modo se reportaron 134 muertes para el año 2016. (Instituto Nacional de Salud. 2011). Para el departamento de Córdoba en el mismo año se registró 263 casos de intoxicación al Sistema de Vigilancia en Salud Pública, pero se sabe que muchos casos no son registrados.

### **3.3.1 Clasificación de los plaguicidas**

**3.3.1.1 Toxicidad.** Es la capacidad de una sustancia química de causar daño a los organismos vivos. Ésta depende de la cantidad de sustancia administrada o absorbida y del tiempo de exposición a la misma. La correlación entre la exposición y la correlación entre la exposición y la incidencia o el grado de severidad es llamada correlación-respuesta. Los plaguicidas pueden afectar directamente a los organismos vivos causando la muerte por su toxicidad aguda (se refiere a los efectos tóxicos observados con una exposición única de corta duración menos de 24 horas en animales de laboratorio), o afectando el crecimiento, la sobrevivencia por factores reproductivos u otras funciones según su toxicidad crónica. Los plaguicidas pueden afectar indirectamente a los organismos por alteración de otros que le sirven de alimento, o por afectar la calidad del hábitat (Bejarano. 2011).

La clasificación según la toxicidad se realiza con base en la dosis que provoca mortalidad en un grupo seleccionado de animales de experimentación; para el caso de los plaguicidas las pruebas se hacen en ratas (Protocolo de Vigilancia y Control de Intoxicaciones por Plaguicidas. 2011). Según su toxicidad aguda (O.M.S.): esta se basa principalmente en la toxicidad por vía oral en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor DL50 (Dosis Letal Media) que es la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de prueba y se expresa en términos de mg/kg del peso del cuerpo del animal (González. 2009 - 2010).

**Tabla 1.** Clasificación de los plaguicidas según categoría toxicológica

Categoría antigua vigente	Definición antigua vigente	Categoría nueva - norma andina	Definición	Dosis letal 50 (oral aguda en ratas)
I	Extremadamente tóxicos	I A	Extremadamente peligroso	0-5 mg/kg
II	Altamente tóxicos	I B	Altamente peligroso	5-50 mg/kg
III	Medianamente tóxicos	II	Medianamente peligroso	50-500 mg/kg
IV	Ligeramente tóxicos	III	Ligeramente peligroso	mayor de 500 mg/kg

Fuente. Casaret & Doull's toxicology. 2005

Según su grupo químico del principio activo estos pueden ser: compuestos organofosforados, compuestos carbamatos, compuestos organoclorados, piretroides, derivado del biperidilo, triazina, tiocarbamatos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados de la cumarina, derivados del cloronitrofenol, compuestos organomercuriales, entre otros.

**3.3.1.2 Plaguicidas Organoclorados.** Como su nombre indica los Compuestos Organoclorados (OCs) básicamente su estructura química corresponde a hidrocarburos clorados aromáticos, en donde algunos o la totalidad de sus átomos de hidrógeno se substituyen por cloro, dentro de los compuestos organoclorados más

conocidos se encuentran el DDT, metoxicloro (HCH), aldrín, endosulfan y canfeotor (Larrea, 2007). son poco solubles en agua, estables a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, lo que los hace bastante persistentes en el medio ambiente. En los países donde se han utilizado estos compuestos, es frecuente encontrar residuos de ellos en alimentos (sobre todo en los de origen animal), precisamente por ser muy estables en el ambiente (Pastor S., 2002).

Jiménez y otros en el (2004) reportaron pesticidas organoclorados en suero y tejido adiposo de mujeres en una zona agrícola del sureste español.

La mayoría están prohibidos en los países desarrollados, ya que tienen una elevada persistencia en el medio ambiente y en los alimentos, gran estabilidad química y una marcada capacidad de bioacumulación y biomagnificación. Muchos de ellos son posibles carcinógenos. Los insecticidas organoclorados son neurotóxicos, causan intoxicación a través de todas las vías de absorción y tienen graves efectos ecológicos (pastor, 2002).

### **3.3.1.3 Plaguicidas Organofosforados**

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados, que comparten como característica farmacológica la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolintransferasa en las terminaciones nerviosas, lo que genera una acumulación de acetilcolina y como consecuencia se altera el funcionamiento del impulso nervioso (Fernández *et al*, 2010).

Estos compuestos son liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción; su toxicidad es variable y los efectos farmacológicos varían de acuerdo al grado de toxicidad y vía de entrada en el organismo (Weselak *et al*, 2007).

El cuadro de intoxicación por organofosforados genera un espectro de signos y

síntomas característico, conocido como síndrome colinérgico que se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y que se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora (Fernández *et al*, 2010).

La intoxicación aguda genera un conjunto de signos y síntomas denominados síndrome colinérgico el cual se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y que se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Universidad de Antioquia, 2005). Asimismo, se ha descrito que tienen propiedades alquilantes (Preussman *et al*. 1969, Fest *et al*, 1973), lo cual desde el punto de vista de la mutagénesis es de suma importancia, puesto que actúan directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) añadiendo grupos alquilo principalmente metilo y etilo a las bases nitrogenadas.

**3.3.1.4 Plaguicidas Carbamatos.** Son ésteres derivados de los ácidos N-metil o dimetil carbámico tiene efecto neurotóxico en dosis de exposición altas, puede llevar a la muerte. Son menos persistentes que los organoclorados y los organofosforados y de igual manera que estos últimos inhiben a la acetilcolinesterasa, ingresan al organismo por las vías cutánea, respiratoria y digestiva y los efectos tóxicos son muy similares (Sorgob *et al*, 2002). No se acumulan en el organismo, su biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación, la eliminación se hace principalmente por la orina, las heces y el aire inspirado (Pastor, 2002).

Los envenenamientos carbamáticos tienden a ser corta de duración debido a que la inhibición del tejido nervioso es reversible, y los carbamatos son metabolizados más rápidamente (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Universidad de Antioquia, 2005).

A través de evidencias de carcinogenicidad experimental con animales, el carbosulfán ha sido clasificado como un posible carcinógeno humano en células germinales (Giri *et al*, 2002).

**3.3.1.5 Piretroides sintéticos.** Los piretroides constituyen otro grupo de plaguicidas ampliamente utilizados, tanto en la agricultura como en el hogar. La exposición a insecticidas piretroides se ha descrito desde hace ya varios años, y los efectos negativos de estos compuestos incluyen alteraciones en el sistema nervioso y en el sistema inmunológico (Soderlund *et al.*, 2007).

Algunos de ellos son estrógenos ambientales, por lo tanto, interfieren en los procesos hormonales de animales y personas. Su acumulación en el organismo es baja y no persisten en el ambiente, son degradados rápidamente por la luz solar o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera (ATSDR, 2003).

La exposición breve a niveles muy altos de estos compuestos en el aire, los alimentos o el agua puede causar mareo, dolor de cabeza, náusea, espasmos musculares, falta de energía, alteraciones de la conciencia, convulsiones y pérdida del conocimiento (Du *et al*, 2010).

Los piretroides y sus metabolitos interrumpen la función de los receptores nucleares de hormonas múltiples y por lo tanto tienen el potencial de afectar el sistema endocrino y el sistema reproductivo en los humanos. Los piretroides sintéticos aumentan la formación de radicales libres (Pilipchuk *et al*, 1991)

**3.3.1.6 Plaguicidas Triazínicos.** Las triazinas son plaguicidas utilizados para el control del crecimiento de malezas, la mayoría son simétricas y de baja solubilidad en agua, se absorbe con facilidad por el tracto gastrointestinal, pero solo penetra a la piel en grado muy limitado, se elimina rápidamente a través de la orina, pero se acumula por mayor tiempo en los glóbulos rojos. (Guía para la salud y la seguridad,

1993). Parece ser que ejercen un efecto disruptor endocrino a nivel del Sistema Nervioso Central, concretamente en el hipotálamo, responsable de las alteraciones en los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante y prolactina. La atrazina presenta baja toxicidad aguda (Dosis Letal en ratas de 1900 mg/kg), pero produce sensibilización cutánea y ocular (Andalucía, 2003).

Los estudios epidemiológicos han investigado la posibilidad de que la atrazina puede causar efectos adversos en los seres humanos. Aunque algunos estudios han afirmado que la exposición resulta un riesgo elevado de cáncer de próstata (Gammon *et al*, 2005). Hay una relación causal entre la exposición a la atrazina y el cáncer de mama (James *et al*, 2011).

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 ENSAYO COMETA**

El ensayo cometa es una técnica de electroforesis en microgeles de agarosa considerada de alta sensibilidad para detectar daño al ADN, a nivel de células individuales. Permite evidenciar rupturas de simple y doble cadena del ADN, sitios álcali lábiles, y entrecruzamientos ADN/ADN o ADN proteína asociados con sitios de reparación por escisión incompleta en células individuales. Cuando el núcleo es

sometido a la electroforesis, los fragmentos rotos de ADN migran fuera del mismo, dándole la apariencia de cometa que dio lugar al nombre de la técnica (Rojas *et al.*, 1999).

Algunos estudios han empleado el ensayo cometa para evaluar el daño genotóxico de los plaguicidas en poblaciones humanas expuestas y obtenido resultados positivos (Lebailly *et al.*, 1998; Garaj *et al.*, 2000, 2001, 2002, Moretti *et al.*, 2002; Ramírez y Cuenca 2002; Paz *et al.*, 2004, 2007; Ascarrunz *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2006; da Silva *et al.* 2008; Remor *et al.*, 2009; Simoniello *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2011; Rohor *et al.*, 2011; Kvitko *et al.*, 2012 y Benedetti *et al.*, 2013).

Zeljezic *et al.*, 2001 en un estudio realizado en Croasia utilizando como ensayos análisis de aberración cromosómica y la electroforesis en gel de una sola célula alcalina (cometa) para evaluar el grado de daño en el ADN y la reparación del ADN en linfocitos de sangre periférica de sujetos empleados en la producción de plaguicidas, se tomaron muestras de sangre después de un largo período de 8 meses de exposición a una mezcla compleja de pesticidas y Para detectar la posible aparición de la reparación del ADN en los linfocitos de los mismos temas de la segunda muestra de sangre fue tomada después de un largo período de 8 meses de ausencia en la zona de la exposición a plaguicidas los resultados del grupo expuesto mostraron un aumento estadísticamente significativo del número de células aberrantes en comparación con los controles.

Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. 2002. Evaluó los daños del genoma en una población de trabajadores croatas empleados en la producción de plaguicidas mediante el análisis de aberraciones cromosómicas, ensayo de micronúcleos y ensayo cometa, el estudio incluyó a 10 trabajadores expuestos a una mezcla compleja de pesticidas (atrazina, alaclor, cianazina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, malatión) durante su producción y 20 sujetos control sin antecedentes de exposición a cualquier agente físico o químico los resultados en las personas expuestas mostró un aumento

estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en la migración del ADN.

Grover *et al*, 2003. En un estudio realizado en la India, determino el daño genético en trabajadores empleados en la producción de plaguicidas utilizando el ensayo de cometa. Los trabajadores expuestos tuvieron significativamente mayores longitudes medias de cola de cometa que los de los controles (media  $\pm$  SD  $19.17 \pm 2.467$  frente a  $8.938 \pm 2.889$ ,  $P < 0,001$ ).

Ascarrunz *et al* 2006 en la Paz –Bolivia estudio el efecto genotóxico a 259 trabajadores agrícolas con parámetros del ensayo cometa como: DNA de la cola, DNA de la cabeza, longitud de la cola, longitud del cometa. Los resultados mostraron un aumento en relación a los controles, ( $p < 0.05$ ).

Castillo *et al*, 2006 en México determino el daño de ADN a través del ensayo cometa a un grupo de floricultores expuestos a mezclas complejas de plaguicidas, reportando resultados positivos con una diferencia estadísticamente significativa en la fragmentación del ADN en el grupo expuesto de pesticidas en comparación con los otros dos grupos ( $P$  se encontró  $< 0,001$ )

En el Estado de Rio Grande do Sur (Brasil) Benedetti *et al* 2013, estudio el efecto de la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas utilizando como técnicas de biomonitorio ensayo cometa en leucocitos de sangre periféricos y el ensayo de micronúcleo en epitelio bucal, evaluaron un total de 127 individuos, 81 expuesta y 46 controles no expuestos, los datos revelaron daño del ADN en los trabajadores de la soya.

En el departamento de Córdoba, los estudios sobre plaguicidas se han realizado a nivel ambiental. Marrugo (2010), determinó las concentraciones de plaguicidas en suelos agrícolas del valle del Medio y Bajo Sinú, estableciendo su distribución espacial, comportamiento y dinámica, reportando la presencia de residuos de pesticidas organoclorados, piretroides, organofosforados y atrazina, del mismo

modo, Lans (2011), registro residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda proveniente de hatos lecheros del departamento de Córdoba, por lo que la población adulta mayor que habita en las subregiones Sinú Medio, San Jorge y Sabanas se encuentra expuesta a riesgo alto en la salud, así mismo en el año (2008) reporto concentraciones de plaguicidas organoclorados en la Ciénaga Grande del Bajo Sinú (parte sur) sobre el limite permisible por la legislación colombiana.

En Colombia se han publicado pocos estudios relacionado con la exposición a plaguicidas y sus posibles complicaciones sobre el daño a la molécula de ADN a través de las diferentes técnicas de biomonitoreo y hasta la fecha no hay reportes relacionados con estudio en niños expuestos a plaguicidas y los efectos que estos puedan estar causando sobre la salud de los mismos.

#### **4.2 ENSAYO DE MICRONUCLEOS**

El ensayo del micronúcleos permite la determinación de la actividad genotóxica en diferentes sustancias detectando retraso, roturas cromosómicas, pérdida cromosómica y apoptosis, además es uno de los tests de genotoxicidad más frecuentemente utilizado en mamíferos y actualmente se está empleando en la evaluación de las consecuencias genotóxicas de las exposiciones ambientales y laborales a mutágenos (Vaglenov et al, 2001).

Los primeros en adaptar el ensayo de micronúcleos a células humanas exfoliadas, fueron Stich et al (1982) y Stich y Rosin (1983) y comunicaron que la exposición a carcinógenos aumenta la frecuencia de micronúcleos antes que los síntomas clínicos se hagan evidentes. Sin embargo, un aumento en la frecuencia de micronúcleos no necesariamente indica formación de una lesión pre-neoplásica o de un carcinoma (Lee et al, 2002).

Muchos autores en distintas partes del mundo han encontrado resultados positivos con una correlación entre la frecuencia de MN y el tiempo de exposición en personas expuestas a plaguicidas (Bolognesi *et al*, 1993, 2002; Pasquini *et al*, 1996; Joksić *et al*, 1997; Falck *et al*, 1999; Márquez *et al*, 2005; Bhalli *et al*, 2006; Costa *et al*, 2006). Benítez *et al*, (2012) en Ñerby Paraguay, determino daño en el material genético a través de la frecuencia de micronúcleos (MN) encontrando que en el grupo expuesto potencialmente a pesticidas un promedio mayor de micronúcleos ( $5,1 \pm 2,9$  vs  $1,8 \pm 2,0$ ;  $p < 0,0001$ ).

Dos estudios llevados a cabo en Croacia en trabajadores expuestos a ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), atrazina, alaclor, cianazina y malatión, durante el proceso de producción, muestran un aumento significativo en la frecuencia de MN después de 8 meses de alta la exposición ( Garaj-Vrhovac & Zeljezic D, 2001 y 2002). En Pakistán con trabajadores de una industria de producción de pesticidas, que pertenece a la organofosforados y piretroides, se observaron aumentos significativos en la frecuencia de MN en los trabajadores, que muestra una correlación lineal con el tiempo de exposición (Bhalli *et al*, 2006). México, un estudio con 30 sujetos trabajando como floricultores en invernaderos muestra un aumento en la frecuencia de MN en células bucales (Remor *et al*, 2009). Un estudio adicional en México (Estado de Sinaloa) reportó un claro aumento de la frecuencia de MN en los trabajadores agrícolas utilizando principalmente organofosforados y carbamatos (Sailaja *et al*, 2006). Otro estudio llevado a cabo en Italia por Bolognesi y colaboradores en 71 floricultores y 75 controles mostró un incremento significativo de micronúcleos en los trabajadores expuestos, comparado con los del grupo control ( $8,57$  vs.  $6,67$ ,  $p < 0,05$ ); Varona *et al* 2003, en Bogotá determinó la frecuencia de alteraciones citogenéticas (micronúcleos y aberraciones cromosómicas), deficiencias en la reparación del ADN y actividad de la acetilcolinesterasa como biomarcadores de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en trabajadoras de cultivos de flores. En los ensayos citogenéticos, se encontró que el grupo expuesto presentó frecuencias mayores de células con aberraciones

cromosómicas y micronúcleos que el grupo no expuesto, con diferencias significativas ( $p=0,02$ ). Otro estudio en Colombia por Bolognesi *et al*, (2009) para investigar los efectos en la salud asociados con la exposición al glifosato, en el programa de áreas de fumigación para el control de los cultivos ilícitos y en la maduración de la caña de azúcar en comparación con la exposición a la mezcla de plaguicidas se recogieron muestras de sangre antes, durante y 4 meses después de la pulverización. Los resultados mostraron un aumento significativo en la frecuencia de MN después de la exposición al glifosato, principalmente cuando se aplica para la maduración de la caña de azúcar.

Estudios conducidos en niños expuestos a contaminantes ambientales en diferentes países han revelaron claramente un incremento en la frecuencia de micronúcleos en los infantes expuestos comparados con los controles. Rull *et al*, 2009 en California, examinaron si la proximidad residencial a las aplicaciones de plaguicidas en zonas agrícolas está asociada con el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda, el subtipo más común de este cáncer infantil; los resultados de ese trabajo sugieren la identificación de plaguicidas específicos que pueden desempeñar un papel en la etiología de la leucemia infantil. Gómez *et al* en el (2013), reporto en un estudio hecho en México un incremento significativo de las frecuencias MN indicando alto riesgo de salud para los niños expuestos. Benítez-Leite *et al*, 2010 evaluaron el daño en el material genético de una población infantil expuesta potencialmente a pesticidas en el ambiente, Participaron en el estudio 48 niños expuestos potencialmente a pesticidas y 46 niños no expuestos. Se obtuvo muestra de la mucosa bucal para determinar daño en el material genético a través de la frecuencia de micronúcleos (MN). Se encontró en el grupo expuesto potencialmente a pesticidas mostro un promedio mayor de micronúcleos ( $5,1\pm 2,9$  vs  $1,8\pm 2,0$ ;  $p<0,0001$ ), un promedio mayor de células binucleadas, ( $3,5\pm 2,7$  vs  $1,4\pm 1,4$ ;  $p<0,0001$ ), mayor frecuencia de cariorrexis ( $18,2\pm 18,4$  vs  $5,8\pm 18,4$ ;  $p<0,004$ ) y picnosis ( $24,8\pm 18,0$  vs  $17,1\pm 8,3$ ;  $p<0,03$ ). El 40% (19/47) de los niños expuestos potencialmente a pesticidas tuvieron un tiempo de exposición de 6 años. Esta

investigación aporta evidencias de daño genético en la población potencialmente expuesta a pesticidas en el ambiente.

Para el país más exactamente en el Departamento de Córdoba, se encuentran dos estudios realizados en niños asociados a zonas agrícolas, donde se evaluó el daño citogenético por exposición a plaguicidas en células de la mucosa oral de niños entre 5 a 15 años de edad para los años 2015 y 2016. El reporte mostro que hubo mayor daño citogenético en el grupo expuesto con una frecuencia ( $p < 00.5$ ) de micronúcleos de ( $5.7 \pm 2.5$  vs  $3.1 \pm 6.9$ ), células binucleadas ( $6.6 \pm 6.6$  vs  $1.2 \pm 1.6$ ), cariólisis ( $99.3 \pm 30.7$  vs  $62.0 \pm 21.4$ ) y pignosis ( $43.9 \pm 12.2$  vs  $26.9 \pm 11.14$ ); el otro estudio se llevó a cabo en linfocitos de sangre periférica en los municipios de Lorica y Majagual, reportando una mayor frecuencia ( $p < 00.5$ ) de micronúcleos ( $2.2 \pm 1.64$ ) y ( $2.0 \pm 1.61$ ).

Teniendo en cuenta la posible genotoxicidad de los plaguicidas, la población expuesta y la escasez de estudios en nuestro país, se realizó esta investigación con el fin de determinar el riesgo que los plaguicidas están ejerciendo en niños entre 5 y 15 años de edad expuestas a ellos, describiendo la frecuencia de alteraciones citogenéticas y el posible daño que causan en el ADN mediante la prueba de MN en epitelio bucal.

## **5. METODOLOGÍA PROPUESTA**

### **5.1 ÁREA DE ESTUDIO**

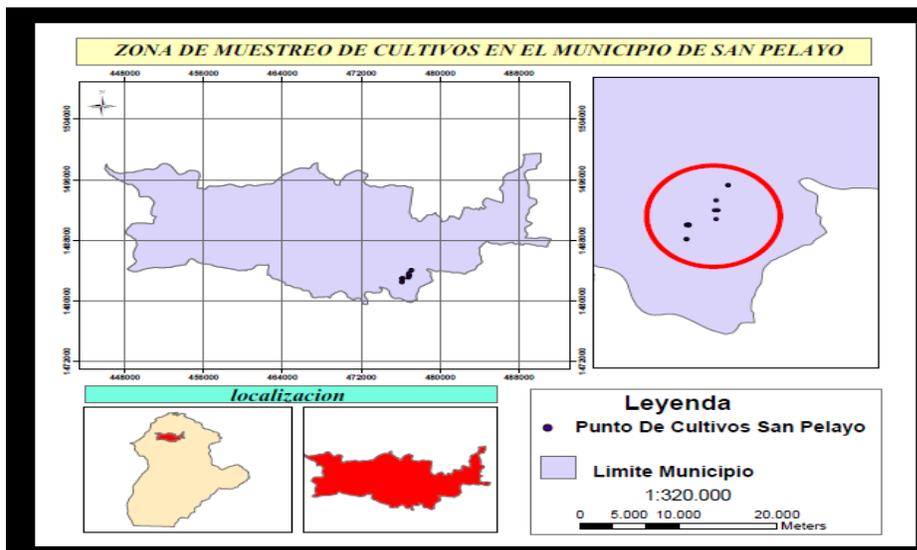
El municipio de San Pelayo se encuentra ubicado en la parte norte del Sinú Medio en el departamento de Córdoba, el territorio municipal posee un área de  $451,12 \text{ km}^2$  Limita geográficamente por el norte con el municipio de Santa Cruz de Lorica, y con el municipio de Cotorra, al oriente con los municipios de Chimá y Ciénaga de Oro, por el sur con los municipios de Cereté y Montería, por el occidente con el municipio de Puerto Escondido.

**Figura 1.** Ubicación geográfica de San Pelayo en Córdoba y Colombia.



Fuente: [http://www.sanpelayo-cordoba.gov.co/informacion\\_general.shtml](http://www.sanpelayo-cordoba.gov.co/informacion_general.shtml)).

**Figura 2.** Ubicación geográfica de la muestra en Pelayito.



Fuente: Instituto geográfico Agustín Codazzi: Autor, programa ArcGIs 10.2, Con imagen satelital lansad.

## 5.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Para seleccionar la muestra se realizaron visitas domiciliarias a las zonas rurales del municipio de San Pelayo que se dediquen a la agricultura, hogares con hijos en edades de 5 a 15 años, campos de cultivos a una distancia máxima de las casas entre 20 a 30 metros y que los padres o tutores sean agricultores o que trabajen en campos agrícolas; a los adultos responsables del hogar se le realizó una entrevista voluntaria. El grupo control estuvo conformado por niños que no viven en la zona, o que no hayan estado en los últimos 10 años.

## 5.3 GRUPO EXPUESTO

Niños sanos en rangos de edades entre 5 -15 años, que vivieran en las áreas agrícolas del municipio de San Pelayo. El rango de edad se escogió teniendo en cuenta que el comportamiento infantil y adolescente los expone a mayores riesgos, ya que los infantes exploran, tocan, prueban objetos y sustancias; no leen las

etiquetas y desconocen sus riesgos; el adolescente puede ser inexperto, inmaduro, arriesgado y verse involucrado en labores donde se utiliza plaguicidas (Faustam et al., 2000; Perry, 2003).

#### **5.4 GRUPO CONTROL**

Niños sanos de 5-15 años, que no vivieran en zonas urbana, del mismo municipio.

#### **5.5 MUESTRA**

El presente fue un estudio exploratorio de corte transversal en el cual se evaluó la frecuencia de marcadores de daño al ADN en mucosa oral (micronúcleos) y ensayo cometa de sangre periférica y la presencia o ausencia de marcadores de exposición a plaguicidas (Atrazina) en muestras de orina de la muestra, la cual estuvo constituida por niños de ambos sexos (masculino y femenino) en edades entre 5 y 15 años habitantes del área de estudio.

El número de participantes que fueron teniendo fue de 59 niños en edades entre 5 a 15 años, de los cuales 34 fueron el grupo expuesto y 24 la muestra control.

#### **5.6 ENCUESTA**

Los padres y/o adultos responsables, miembros del hogar respondieron un cuestionario voluntario utilizado por la Comisión Internacional para la protección a carcinógenos y mutágenos ambientales (Carrano y Natarajan, 1988), que incluirá la siguiente información: aspectos demográficos, estilo de vida (alimentación, tipo de actividad laboral, entre otros.), historia ocupacional, médica, familiar, cercanía de zonas agrícolas, entre otros. **Ver anexo 1.**

## **5.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- ✓ Niños de 5 a 15 años de edad
- ✓ Niños nacidos en las zonas de estudio o tener como mínimo 5 años de exposición a los plaguicidas.
- ✓ No tener antecedentes heredofamiliares con alteraciones genéticas
- ✓ No padecer enfermedades crónicas.
- ✓ No haber estado expuestos a radiaciones por lo menos 6 meses antes de la toma de muestra.
- ✓ No estar sometidos a tratamientos médicos o farmacológicos.
- ✓ Haber firmado el formato de consentimiento informado por el padre o adulto responsables del niño.

## **5.8 ASPECTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Teniendo en cuenta los lineamientos del Comité de ética para la investigación de la universidad de Córdoba, y en lo referente a la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Consejo Nacional de Salud, artículos 15 y 16, se aplicará un formato de Consentimiento Informado involucrando a los participantes y a sus padres, donde se les explicará los objetivos y alcances del proyecto, así como de las posibles repercusiones sobre su salud, para garantizar que su participación sea totalmente voluntaria. **Ver anexo 4.**

## **5.9 TOMA DE MUESTRA DE SANGRE, MUCOSA ORAL Y ORINA EN INFANTES EXPUESTOS Y GRUPO CONTROL.**

Se colectaron muestras de sangre y orina al grupo expuesto (30) y control (25) de los niños seleccionados para el estudio.

Para realizar los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad, se tomaron 10 mL de sangre entera por venopunción en tubos vacutainer adicionados con heparina, los

cuales fueron codificados, envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz, refrigerados a temperatura controlada y transportados al Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental, de la Universidad de Córdoba para su inmediato procesamiento. Este procedimiento fue llevado a cabo por un profesional de la salud (Bacteriólogo).

Las muestras de orina fueron colectadas a primera hora del día (primera orina de la mañana), por los participantes con ayuda de los padres o tutores responsables en recipientes plásticos (polietileno de alta densidad) estériles, previas instrucciones para su toma y conservación, posteriormente llevadas con hielo al Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental, de la Universidad de Córdoba para su inmediato procesamiento para su procesamiento.

#### **5.10 ENSAYO COMETA.** (Singh *et al*, 1988)

Una vez las muestras de sangre entera que se trajeron de campo en tubos heparinizados estériles en el Laboratorio de Toxicología y gestión ambiental de la Universidad de Córdoba, se dio inicio a la extracción de linfocitos. Se colocó en tubos de 50 mL volúmenes iguales de sangre + PBS (1:1) a temperatura ambiente, luego con una pipeta de Pasteur estéril se homogenizó la mezcla y se agregó por la pared del tubo que contenía Ficoll-Hypaque muy lentamente cuidando no mezclar las fases, luego se centrifugo 20 a 2000 rpm.

Con una pipeta de pasteur plástica se recuperó solo el anillo de linfocitos entre el plasma y el ficoll-Hypaque. Se resuspendió de 2 a 5 veces el volumen con PBS o solución fisiológica a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugo por 10' a 800-1000 rpm. Se volcó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente con PBS este último paso se realizó dos veces para al final obtener un pellet de linfocitos. En dos tubos de Eppendoff que contenían 120  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión se agregaron 10  $\mu$ L de limfocitos, de cada uno se tomaron 75  $\mu$ L con una

micropipeta depositándose en una lámina de portaobjetos previamente embebida en agarosa normal colocándosele una lámina cubreobjetos, estas se colocaron en bandejas para refrigerarlas hasta la solidificación entre un tiempo de 10 a 15 minutos, se retiró los cubreobjetos y las placas se sumergieron en una solución de lisis que contenía detergente y sales por 24 horas garantizando la desintegración de la membrana celular y nuclear. A partir de este punto, todo el proceso se realizó en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz al ADN.

Tras la lisis celular las preparaciones se colocaron en el tanque de la cámara de electroforesis (Mundial de equipos LTDA, Colombia), a una solución amortiguadora (pH= 13), quedando completamente sumergidas con el objeto de desenrollar las hebras del ADN durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se procedió a electroforesis por la misma duración.

Los portaobjetos fueron retirados con cuidado de la cubeta y se organizaron en una bandeja para someterlos a una serie de lavados con una solución neutralizadora de pH 7.5, luego las preparaciones son deshidratadas depositando en la superficie de cada una de ellas alcohol etílico.

Las muestras se tiñeron utilizando Bromuro de Etidio como fluorocromo justo antes del análisis microscópico de fluorescencia (G. BARCO S.A, COLOMBIA) equipado con un filtro de excitación de 505- 560 nm, utilizando un ocular de 20x de magnificación y un objetivo de 40 aumentos, y en oscuridad.

Para la cuantificación del daño genotóxico, fue evaluado como migración del ADN (Longitud de Cola), así como en unidades de longitud del núcleo (Cola/Cabeza) en 100 células de cada individuo (50 de cada lamina portaobjetos).

Por último, cabe recordar que durante todo el procedimiento se evitó la luz directa.

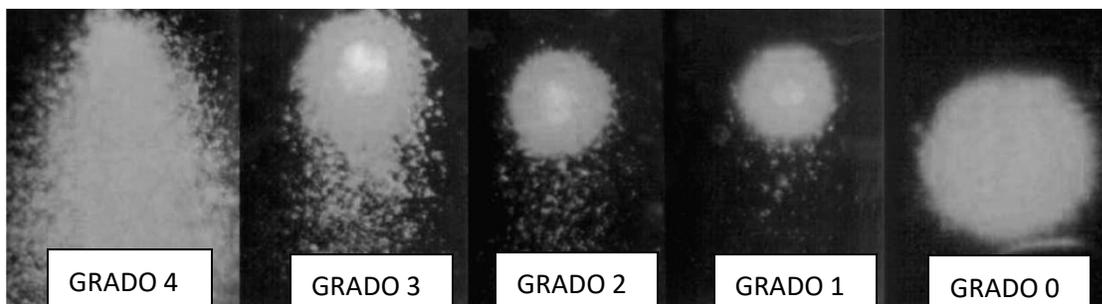
**5.10.1 Controles positivos y negativos.** Para los controles positivos tomaron muestras de sangre periférica de un individuo sano y que no estuviera expuesto a

contaminantes aparentes, las cuales se sometieron por 2 horas a la luz UV en una cabina de flujo laminar, después se realizó la extracción de linfocitos.

Para los controles negativos se les realizó la extracción de linfocitos sin someter a luz UV a la sangre, estos fueron utilizados en cada corrida de electroforesis, con duplicado cada uno, para asegurar las condiciones estándar de cada corrida. Se realizaron replicas para cada control.

**5.10.2 Criterios de identificación de ensayo cometa.** En la actualidad, los parámetros más comúnmente utilizados son % de ADN en la cola, el momento de la cola o longitud de la cola y comúnmente representados en  $\mu\text{m}$ , presentando una buena correlación con las dosis de los agentes genotóxicos (Müller, 2006<sup>a</sup>), relacionándose directamente con el tamaño del fragmento. El daño en el DNA se determinó teniendo en cuenta el % de este material genético mantenido en el núcleo del cometa y longitud de la cola, según lo anterior se estableció un patrón de clasificación considerando cinco niveles figura 3 : Grado 0 células no dañadas, grado 1 células ligeramente dañadas, con cola menor al tamaño de la cabeza, grado 2 células dañadas, con cola igual al tamaño de la cabeza, grado 3 células fuertemente dañadas, con cola mayor al tamaño de la cabeza, y grado 4 o células en apoptosis.

**Figura 3.** Microfotografía de los cometas. Los números indica el grado de daño en el ADN.



Para realizar las medidas de los linfocitos normales y que presentaron daño, se utilizó un micrómetro en el ocular del microscopio y el analizador de imágenes

CometScore, donde se determinaron el largo de la cola del cometa midiendo desde el centro del núcleo hasta el punto más alejado de la cola del cometa. La suma de los puntajes (0-4) de 100 cometas da una puntuación global de entre 0 y 400 unidades arbitrarias (Collins *et al*, 2008) y los resultados se expresaron en índice de daño al ADN (ID).

**5.10.3 Análisis a través del índice de daño (ID) para cada muestra.** Se calcula el Índice de daño:

$$ID = n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4$$

Donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño. Los resultados se expresan como IDEC (Monrroy *et al*, 2005).

## **5.11 MUCOSA BUCAL**

Con previo consentimiento informado (Ver anexo 4) se tomaron muestras de cavidad oral en niños expuestos y en la muestra control siguiendo el procedimiento descrito por Thomas *et al.*, (2009), se raspó el interior de ambas mejillas del donante con un cepillo histológico que posteriormente se colocó en un tubo cónico con 3 mL de solución salina, las cuales fueron conservadas en solución de Saccomano (50% (v/v) de etanol y 2% vol/vol polietilenglicol diluido en agua) y transportadas en hielo al laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad de Córdoba para su análisis posterior.

**5.11.1 Ensayo de Micronúcleos. (Thomas *et al*, 2009).** Las muestras de células de la mucosa oral se lavaron tres veces con 3 mL de solución salina, homogeneizando con vortex suavemente en cada paso y centrifugando a 1500 rpm por 10 minutos. En la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 0,5 mL de solución salina.

Se homogenizó nuevamente y con una pipeta pasteur se goteo desde una altura de 20 cm aproximadamente sobre porta objetos fríos, cubriendo todo el portaobjeto y sin gotear dos veces en el mismo lugar.

Se hicieron 4 portas para cada muestra, se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron en metanol frio al 80% por 30 minutos y se secaron nuevamente. Finalmente, se colorearon con solución de tinción Giemsa al 3 % (97 mL agua + 3 mL colorante glicerina giemsa) para la observación en microscopio óptico.

Se analizaron 2000 células por individuo para el registro de Micronúcleos (MN), además se determinaron las frecuencias de otras alteraciones nucleares como: picnosis, células binúcleadas, yemas nucleares, puentes nucleoplasmáticos, cariólisis y cariorexis, teniendo en cuenta los criterios que establece el protocolo original de la técnica, como son:

1. Tener un tamaño menor a 1/3 del núcleo principal
2. Estar en el mismo plano focal
3. Tener el mismo color y refracción que el núcleo principal
4. Tener forma redondeada o levemente ovalada
5. Estar separados del núcleo principal o si sus bordes se tocan, que sean totalmente distinguibles.

**Tabla 2.** Criterios para identificar anomalías nucleares

Características de identificación de Micronúcleos en epitelio bucal	
Yema nuclear	El núcleo principal tiene una pronunciada constricción formando una yema. La yema esta adjunta al núcleo principal. La yema tiene una intensidad de tinción similar al núcleo principal. El diámetro de la yema pueden ser un cuarto o la mitad del diámetro nuclear.
Bionucleadas	Las células contienen dos núcleos principales. Los núcleos son de similar tamaño e intensidad de tinción.

Cromatina condensada	El núcleo muestra áreas de cromatina agregada. Distintas áreas del núcleo son más intensamente teñidas. El núcleo muestra patrones de estriación.
Cariorrecticas	El núcleo tiene una extensa cromatina agregada. La fragmentación nuclear es evidente.
Pignotica	Las células tienen un pequeño encogido núcleo. El diámetro del núcleo es 1/3 o 1/2 del tamaño normal del núcleo.
Cariolisis	Desaparición del ADN en el núcleo. No hay tinción del núcleo

## 5.12 ANÁLISIS DE METABOLITOS DE PLAGUICIDAS EN ORINA.

### 5.12.1 Atrazina y Metabolitos en Orina. (Ruiz- Guzmán *et al*, 2017)

Para el análisis de biomarcadores de exposición a plaguicidas Triazinicos que son los que más frecuentemente usan los agricultores en la zona de estudio y la determinación de sus metabolitos, atrazina desisopropilo (ADI) y atrazina desetildesisopropilo (ADDI).

El estudio se realizó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS Trace 1310 Thermo Cromatógrafo de gases científicos y ISQ Thermo científico Mass Espectrómetro) luego de la extracción líquido-líquido con acetato de etilo y dietil éter y limpieza de los extractos (Florisil y sulfato de sodio), bajo condiciones de cromatografía: inyección volumen = 1 µL, temperatura del detector = 285 ° C, capilar DB5MS columna: 30 mx 0.2 mm x ID 0.20 µm y helio como gas portador [24]. Los límites de detección (LD en ppb) y cuantificación (LC en ppb) del método fueron ATZ: LD = 0,451; LC = 0,455; ADI: LD = 3.194; LC = 3.200; ADDI: LD = 7.123; y LC = 7.130.

**Tabla 3.** Concentración urinaria de Atrazina y metabolitos

Compuestos	Límite de Detección (µg/mL )	Límite de Cuantificación (µg/mL)	Recuperación (%)	Coefficiente de variación Reproducibilidad
Atrazina	0.451	0.455	<b>Rango bajo:</b> 84.30 <b>Rango Medio:</b> 88.65 <b>Rango alto:</b> 107.80	<b>Rango bajo:</b> 8.78 <b>Rango Medio:</b> 7.64 <b>Rango alto:</b> 1.76
Desisopropil Atrazina (DIA)	3.194	3.20	<b>Rango bajo:</b> 87.87 <b>Rango Medio:</b> 90.60 <b>Rango alto:</b> 104.34	<b>Rango bajo:</b> 6.30 <b>Rango Medio:</b> 6.94 <b>Rango alto:</b> 7.22
Desetil desisopropil Atrazina (DACT)	7.123	7.13	<b>Rango bajo:</b> 107.67 <b>Rango Medio:</b> 101.86 <b>Rango alto:</b> 98.38	<b>Rango bajo:</b> 9.69 <b>Rango Medio:</b> 9.41 <b>Rango alto:</b> 3.71

**5.12.2 Determinación de creatinina en orina.** La creatinina es el producto final del catabolismo de la creatina. Aunque muy pequeñas cantidades son reabsorbidas y también secretadas por los túbulos renales, en la práctica se considera que toda ella se filtra libremente por el glomérulo eliminándose en un 100%. La cantidad producida diariamente está relacionada con la talla, superficie corporal y masa muscular. Su utilidad está casi exclusivamente relacionada con la evaluación de la función renal (perfusión renal alterada, pérdida de la función de las nefronas) y la monitorización de la diálisis renal.

La determinación se hizo para corregir o normalizar los valores de concentración de los plaguicidas y de sus metabolitos que se excretan en orina debido a los fenómenos de dilución o saturación excesivas que pueden ocasionarse en muestras puntuales.

A cada individuo que se seleccionó se le tomó una muestra de orina de una micción

por la mañana (aproximadamente de 50ml) en frascos de polipropileno estéril tapa rosca.

La recolección y rotulación de las muestras biológicas estuvieron a cargo de profesionales (microbiólogo) y estas fueron codificadas y refrigeradas con el número correspondiente a la encuesta previa, para posterior análisis en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Córdoba.

**5.12.3 Fundamento del método.** La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho complejo en periodos iniciales cortos mediante el cambio de absorbancia, evitándose así la interferencia de otros compuestos.

**5.12.4 Reactivos utilizados.** Reactivo A: Hidróxido sódico (0,4 mol/L). Reactivo B: Acido pícrico (25 mmol/L).

C. Patrón primario acuoso de creatinina (2,0 mg/dL).

El reactivo de trabajo se preparó atemperando y mezclando volúmenes iguales de Reactivo A y de Reactivo B.

**5.12.5 Muestras de orina.** La orina fue recogida mediante procedimientos estándar. Diluida y fresca 1/50 con agua destilada antes del procedimiento.

#### **5.12.6 Procedimiento**

1. Se atemperó el reactivo de trabajo y procedimos a encendió el equipo de (Fotocolorímetro)
2. Con una pipeta se pipeteó en una cubeta reactivo de trabajo: 0,1 mL de muestra (orina diluida 1:50) o estándar más 1,0 mL de reactivo.
3. después se mezcló e insertó la cubeta en el fotocolorímetro.
4. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 500 nanómetros después de 30 segundos (A1) y de 90 segundos (A2).

**5.12.7 Cálculos.** La concentración de creatinina en la muestra se calculó a partir de la diferencia de absorbancia entre la segunda lectura y la primera dividida entre la absorbancia del patrón y multiplicando el cociente resultante por la concentración del patrón (2,0 mg/dL). En caso de determinación de creatinina en orina los resultados dados por el equipo hay que multiplicarlo por 50 (Factor de dilución). El equipo arrojó los resultados directamente.

(A2 – A1) muestra

Creatinina en orina (mg/dl) = \_\_\_\_\_ X concentración del patrón X 50 (A2 – A1) Estándar

#### 5.12.8 Intervalos biológicos de referencia de creatinina en niños.

**Tabla 4.** Valores normales de creatinina en niños por años en mg/dl

Años	Valore normales de creatinina en niños mg/dl
4-6	0.5-0.8 mg/dl
7-9	0.6-0.9 mg/dl
10-12	0.6-1 mg/dl
13-15	0.6-1.2 mg/dl

Fuente: HARRINSON, 20012. Principios de medicina interna.

**5.12.9 Control de calidad.** Se recomienda el uso de los Controles Bioquímica niveles I y II (cód. 18007, 18010 y 18043) casa comercial Byosistem, para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

#### 5.12.10 Características metrológicas del método

- ✓ Límite de detección: 0,03 mg/dL creatinina = 2,65 µmol/L creatinina
- ✓ Límite de linealidad: 20 mg/dL = 1768 µmol/L creatinina. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.
- ✓ Repetibilidad (intraserie):

CONCENTRACIÓN MEDIA	CV	n
1,7 mg/dL = 150 $\mu$ mol/L	2,9 %	20
5,3 mg/dL = 468 $\mu$ mol/L	1,3 %	20

✓ Reproducibilidad (interserie):

CONCENTRACIÓN MEDIA	CV	n
1,7 mg/dL = 150 $\mu$ mol/L	3,9 %	25
5,3 mg/dL = 468 $\mu$ mol/L	2,9 %	25

✓ Sensibilidad: 31 mA·dL/mg = 0,351 mA·L/ $\mu$ mol.

✓ Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia.

**5.12.11 Control de calidad métodos cromatográfico.** Los análisis de los metabolitos en muestras de orina se hicieron por duplicado, y se analizaron blancos de reactivos, y muestras fortificadas con los analitos para el control de calidad de los métodos. El criterio para las curvas de calibración fueron un r mayor a 0.999, y la desviación estándar relativa que se mantuvo menor del 15%. Las concentraciones se reportaron como mg/L corregidas por creatinina para muestras de orina.

## 6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para caracterizar las distribuciones de datos involucradas en los diferentes análisis y seleccionar el tipo de pruebas estadísticas a utilizar. En este caso debido a que varias series de datos no se ajustaron a una distribución normal, ni presentaron varianzas homogéneas, se aplicaron pruebas no paramétricas para los análisis. Se realizaron pruebas de Kolmogorv-Smirnov para evaluar las diferencias entre los biomarcadores de daño citogenético (ensayo cometa y de micronucleos) y de exposición (metabolitos urinarios) entre los grupos de estudio (control y Pelayito), y de variables como la edad y el sexo. Se realizaron análisis de correlación (Spearman) para evaluar la relación entre variables los biomarcadores de daño citogenético con variables como los biomarcadores de exposición, otras variables que pueden influenciar la aparición de estos biomarcadores de daño citogenético tales como la edad, sexo, distancia casa – cultivo, frecuencia de fumigación de los cultivos, frecuencia de olor a plaguicidas en las viviendas. Todos los análisis se analizaron en el programa estadístico SPSS versión 22 y en todos los casos se fijó como criterio de significancia un valor  $p < 0.05$ .

## **7. RESULTADOS**

## 7.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS GENERALES EVALUADAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA

La tabla 5 presenta la descripción de las características sociodemográficas generales evaluadas en la muestra de estudio. La distribución de sexo y edad fue similar, sin diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0.969$  para sexo y  $p= 0.260$  para edad, prueba de Kolmogorov-smirnov), todos los participantes asisten a la escuela y en la mayoría de los casos viven en sus respectivas zonas desde el nacimiento. El nivel de escolaridad de los padres fue menor en el grupo de Pelayito respecto al control, teniendo en cuenta que en Pelayito un porcentaje considerable de los padres (26.7%) nunca asistieron a la escuela, mientras que en el grupo control, todos (excepto un caso) mínimamente han terminado sus estudios de primaria. El nivel de escolaridad de las madres fue menor en Pelayito, considerando que entre no haber estudiado y haber cursado primaria incompleta suman 90%, mientras que en el control esto suma un 44%.

En Pelayito, la mayoría de las viviendas de los participantes estaban construidas con techos de palma, paredes de bloque bruto o bahareque y sin piso (tierra), mientras que, en control la mayoría de las viviendas tenían techos de eternit, paredes de bloque repelladas y pisos acabados o de cemento bruto. Todas las viviendas contaban con energía eléctrica y agua potable, excepto tres casos en Pelayito, donde ninguna vivienda contaba con alcantarillado ni gas natural.

**Tabla 5.** Características sociodemográficas de la muestra de estudio

		<b>Grupo</b>			
<b>Variable</b>		<b>Control</b>		<b>Pelayito</b>	
		<b>n</b>	<b>% n</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sexo <sup>a</sup>	Masculino	15	60,0	14	46,7%
	Femenino	10	40,0	16	53,3%
	Total	25	100,0	30	100,0%
Edad <sup>b</sup>	5 a 10 años	11	44,0%	18	60,0%
	11 a 15 años	14	56,0%	12	40,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Tiempo residencia en la zona	3 o más años	6	24,0%	3	10,0%
	Desde el nacimiento	19	76,0%	27	90,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Asiste a la escuela?	Si	25	100,0%	30	100,0%
	No	0	0,0%	0	0,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Escolaridad del padre	Universitario	4	16,0%	0	0,0%
	Técnico	6	24,0%	3	10,0%
	Secundaria completa	6	24,0%	7	23,3%
	Secundaria incompleta	2	8,0%	9	30,0%
	Primaria completa	6	24,0%	2	6,7%
	Primaria incompleta	1	4,0%	1	3,3%
	No estudió	0	0,0%	8	26,7%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
<u>Escolaridad de la madre</u>	Universitario	0	0,0%	0	0,0%
	Técnico	5	20,0%	3	10,0%
	Secundaria completa	9	36,0%	0	0,0%
	Secundaria incompleta	4	16,0%	11	36,7%
	Primaria completa	2	8,0%	3	10,0%
	Primaria incompleta	4	16,0%	12	40,0%
	No estudió	1	4,0%	1	3,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Material techo	Eternit	22	88,0%	8	26,7%
	Cinc	3	12,0%	6	20,0%
	Palma	0	0,0%	16	53,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%

	Bloque repellado	22	88,0%	4	13,3%
	Bloque bruto	3	12,0%	17	56,7%
Material pared	Tabla	0	0,0%	2	6,7%
	Bahareque	0	0,0%	7	23,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
	Acabado	15	60,0%	2	6,7%
	Cemento bruto	10	40,0%	7	23,3%
Material piso	Tierra	0	0,0%	21	70,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
	Si	25	100,0%	30	100,0%
Cuenta con energía eléctrica?	No	0	0,0%	0	0,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
	Si	25	100,0%	0	0,0%
Cuenta con agua potable?	No	0	0,0%	30	100,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
	Si	7	28,0%	0	0,0%
Cuenta con alcantarillado?	No	18	72,0%	30	100,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
	Si	25	100,0%	0	0,0%
Cuenta con gas natural?	No	0	0,0%	30	100,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%

<sup>a</sup> Comparación entre grupo control y Pelayito (prueba Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.97$ )

<sup>b</sup> Comparación entre grupo control y Pelayito (prueba Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.26$ )

## 7.2 HÁBITOS Y PERCEPCIÓN DEL RIESGO PARA LA SALUD RESPECTO A LOS PLAGUICIDAS

La tabla 5, presenta la descripción de algunos hábitos y percepción del riesgo para la salud respecto al uso de plaguicidas, todos los padres o responsables de los participantes de estudio consideran que los plaguicidas son peligrosos para la salud y el 73.3% de estos, creen que sus hijos están expuestos a estas sustancias; así también, la mayoría (93.3%) viven en hogares con padres (padre o madre) que trabajan con plaguicidas, y todos consideran que estos son peligrosos para la salud, en cuanto a la reutilización de sus enveses (23%) son usados en labores domésticas. Los Niños que han manipulado plaguicidas (un caso) y participan en

labores agrícolas (siembra, cosecha, ayudan en fumigación) diez casos. Pese a que estos datos son bajos los responsables de los niños afirman que 73% de los niños si están expuestos a estos productos.

**Tabla 6.** Hábitos y percepción de riesgo de los plaguicidas sobre la salud de los niños

	<u>Grupo</u>				
	<u>Control</u>		<u>Pelayito</u>		
	n	%	n	%	
Padre o madre trabaja con plaguicidas?	No	25	100,0%	2	6,7%
	Si	0	0,0%	28	93,3%
	_Total	25	100,0%	30	100,0%
Frecuencia trabajo con plaguicidas (veces/año)	72	0	0,0%	5	17,9%
	108	0	0,0%	13	46,4%
	144	0	0,0%	1	3,6%
	180	0	0,0%	4	14,3%
	216	0	0,0%	3	10,7%
	234	0	0,0%	2	7,1%
	Total	0	0,0%	28	100,0%
Guardan plaguicidas dentro de la casa?	No	25	100,0%	27	90,0%
	Si	0	0,0%	3	10,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Reutilizan envases plaguicidas en labores domésticas?	No	25	100,0%	23	76,7%
	Si	0	0,0%	7	23,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Considera peligrosos para la salud a los plaguicidas?	Si	25	100,0%	30	100,0%
	No	0	0,0%	0	0,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Cree a sus hijos expuestos a plaguicidas?	Si	0	0,0%	22	73,3%
	No	25	100,0%	8	26,7%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
El niño ha manipulado plaguicidas?	No	25	100,0%	29	96,7%
	Si	0	0,0%	1	3,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
El niño participa en labores agrícolas?	No	25	100,0%	20	66,7%
	Si	0	0,0%	10	33,3%

### 7.3 OTROS FACTORES DE RIESGO EN LA SALUD POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS

La tabla 7, en Pelayito, el 79.9% de las viviendas de los participantes están ubicadas entre 1 y 10 m de las áreas de cultivo, la frecuencia de fumigación es alta más de cien veces por campana del año, varió en la mayoría de los casos (más del 90%) entre 108 y 180 veces por año y en la mayoría de las viviendas se cocina con leña. El 83% no hacen un tratamiento al agua antes de consumirla

**Tabla 7.** Otros factores de riesgo en salud de los niños por exposición a plaguicidas

	<u>Grupo</u>			
	<u>Control</u>		<u>Pelayito</u>	
	n	%	n	%
Vive con padre o madre fumador?	No	23 92,0%	27	90,0%
	Si	2 8,0%	3	10,0%
	Total	25 100,0%	30	100,0%
Distancia casa – cultivo (m)	1	0 0,0%	11	36,7%
	2	0 0,0%	1	3,3%
	3	0 0,0%	1	3,3%
	4	0 0,0%	4	13,3%
	7	0 0,0%	1	3,3%
	10	0 0,0%	6	20,0%
	20	0 0,0%	1	3,3%
	100	0 0,0%	5	16,7%
	5000	25 100,0%	0	0,0%
	Total	25 100,0%	30	100,0%
Frecuencia fumigación de cultivos (veces/año)	36	0 0,0%	1	3,3%
	72	0 0,0%	2	6,7%
	108	0 0,0%	19	63,3%
	144	0 0,0%	2	6,7%
	180	0 0,0%	6	20,0%
	Total	0 0,0%	30	100,0%
Frecuencia olor plaguicidas en casa (veces/año)	72	0 0,0%	1	4,3%
	108	0 0,0%	18	78,3%

	180	0	0,0%	4	17,4%
	Total	0	0,0%	23	100,0%
Fuente agua de consumo	Grifo-potable	25	100,0%	0	0,0%
	Grifo-no potable			30	100,0%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Realiza tratamiento al agua antes del consumo?	Si	21	84,0%	5	16,7%
	No	4	16,0%	25	83,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%
Cual tratamiento?	Hervida	5	23,8%	4	80,0%
	Clorada	0	0,0%	1	20,0%
	Filtrada	16	76,2%	0	0,0%
	Total	21	100,0%	5	100,0%
Método de cocina	Gas natural	25	100,0%	5	16,7%
	Leña	0	0,0%	25	83,3%
	Total	25	100,0%	30	100,0%

#### **7.4 BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGENÉTICOS Y DE EXPOSICIÓN EVALUADOS EN LA MUESTRA DE ESTUDIO**

La tabla 8, presenta la descripción de los biomarcadores de daño citogenético y de exposición evaluados en la población de estudio. El ID de ADN, longitud de la cola y % de ADN en cola, evaluados mediante el ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica, fueron mayores en el grupo de Pelayito respecto al control, mientras que el % de ADN en cabeza presentó un comportamiento inverso. La frecuencia de aparición de MN y yemas nucleares evaluadas mediante en ensayo de micronúcleos en células de mucosa oral, fueron mayores en el grupo de Pelayito respecto al control. En 29 de las 30 muestras de orina evaluadas en el grupo de Pelayito, se detectaron concentraciones medibles de atrazina y/o sus metabolitos desisopropil-atrazina o desetil-desisopropil-atrazina, destacando que en todos los casos se detectaron al menos dos de estos compuestos.

**Tabla 8.** Biomarcadores de daño citogenético y de exposición evaluados en la muestra de estudio

Biomarcador	Control				Pelayito			
	n	Mínimo – Máximo	Media ± DE	Mediana	n	Mínimo - Máximo	Media ± DE	Mediana
Índice de daño al ADN	25	0 – 29	7,9 ± ±7,5 b	5	30	8-229	94,7±54 a	84
% ADN en <u>cabeza</u>	25	84-96,7	91,1±2,9 a	91,2	30	72,1-91,5	82,7±7 b	84,8
Longitud cola	25	6,7-67	33,2±18,3 b	31,6	30	30,7-350,8	99,9±68,6 a	83
% ADN en cola	25	7,1-20,3	10,5±3,3 b	9,8	30	10,3-27,9	18,9±5,9 a	17,9
Micronúcleos	25	1-15	6±5 b	3	30	2-94	24±23 a	15
Yemas nucleares	25	0-2	0,5±1 b	0	30	0-5	2±2 a	2
Células en cariólisis	25	12-110	55±22 a	56	30	9-261	67±51 a	59
Células en cariorrexis	25	1-34	11±8 a	8	30	1-216	13±39 a	6
Células en picnosis	25	6-32	14±6 a	13	30	0-22	11±6 a	13
Concentración de Atrazina en orina	25	ND*	ND	ND	29	11,9-64,1	20±9,3	17,8
Concentración de Desisopropil- atrazina en orina	25	ND	ND	ND	19	4,5-648,3	115,1±172,1	45,2
Concentración de Desetil- desisopropil- <u>atrazina en orina</u>	25	ND	ND	ND	26	3-298,5	28,1±55,9	17,2

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas (prueba Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0.05$ ) en la variable entre grupos de estudio (control y Pelayito)

\* ND = No se detectaron concentraciones medibles

## **7.5 CORRELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGENÉTICOS, BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS QUE PRESENTAN RIESGO DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

Tabla 9, El análisis de correlación entre los biomarcadores de daño citogenético con los biomarcadores de exposición y variables sociodemográficas que pueden representar factores de riesgo de exposición a plaguicidas e influenciar la frecuencia de aparición de estos biomarcadores de daño citogenético, mostró en el grupo de Pelayito correlaciones estadísticamente significativas entre la presencia del metabolito urinario Desisopropil-atrazina y la frecuencia de micronúcleos ( $r = 0.368$ ,  $p < 0.05$ ), la presencia del metabolito urinario Desetil-desisopropil-atrazina y el Índice de daño al ADN ( $r = 0.374$ ,  $p < 0.05$ ), y entre el sexo y la frecuencia de células en picnosis ( $r = 0.496$ ,  $p < 0.05$ ) siendo mayor en las niñas respecto a los niños. No se registraron correlaciones significativas entre variables como distancia casa-cultivo, frecuencia de fumigación de los cultivos y frecuencia de olor a plaguicidas en las viviendas, el hecho de que el niño participe en labores agrícolas o no y el método de cocina (leña o gas). En el grupo control, no aplica este análisis de correlación, debido a que no se registraron concentraciones medibles de atrazina ni sus metabolitos urinarios y la amplia distancia de las zonas de cultivo; sin embargo, se registraron correlaciones significativas entre la edad con la frecuencia de micronúcleos ( $r = -0.612$ ,  $p < 0.01$ ) y yemas nucleares ( $r = -0.751$ ,  $p < 0.01$ ).

**Tabla 9.** Correlación entre biomarcadores de daño citogenéticos, biomarcadores de exposición y variables sociodemográficas que presentan riesgo de exposición a plaguicidas

		Sexo	Concentración de Desisopropil-atrazina en orina	Concentración de Desetil-desisopropil-atrazina en orina
Índice de daño al ADN	Coefficiente de correlación	,035		,374*
	Sig. (bilateral)	,855		,042
	N	30		30
Micronúcleos	Coefficiente de correlación	,128	,368*	
	Sig. (bilateral)	,502	,045	
	N	30	30	
Células en picnosis (niñas mayor N° cel picn)	Coefficiente de correlación	,496**		
	Sig. (bilateral)	,005		
	N	30		

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS EVALUADAS DE LA MUESTRA ESTUDIADA

El vientre materno, el hogar o la escuela evocan en nuestra imaginación la idea de un lugar “seguro.” Sin embargo, es a menudo en esos los lugares donde los niños entran contacto con pesticidas (PAN, 2016). El 90% de los niños de Pelayito viven en la zona agrícola desde su nacimiento (tabla. 5) hecho que los coloca en una situación de alto riesgo a los efectos dañinos de los plaguicidas, Daston *et al* en el 2004, publicó un estudio donde dijo que cuando una mujer se expone a los pesticidas durante el embarazo, dichas sustancias, junto con otras que ya se han acumulado en su cuerpo, pueden atravesar la barrera placentaria, resultado de esto es que al llegar a este mundo los recién nacidos arrastran ya con ellos una carga de pesticidas. La exposición en el vientre puede resultar especialmente dañina. El desarrollo fetal está bajo el control casi exclusivo de hormonas que funcionan a concentraciones sumamente bajas y activan y controlan el crecimiento de varios sistemas corporales. Muchos pesticidas se encuentran en el grupo de sustancias conocidas como “interruptores endocrinos.” Estas sustancias actúan de forma similar a las hormonas o afectan su funcionamiento normal, con lo cual interfieren en los procesos de desarrollo fetal. Según la Sociedad de Endocrinología, la exposición a los interruptores endocrinos en el vientre “puede ser el origen de enfermedades que se manifestarán más adelante en la vida,” como son los efectos sobre el desarrollo neurológico, el cáncer y los daños al sistema reproductivo (Gere *et al*, 2010).

Desde el punto de vista de la escolaridad se muestra un escenario positivo, ya que todos los niños asisten a la escuela y esto hace que durante este tiempo no se vean involucrados en las labores agrícolas lo que disminuye el riesgo a una mayor exposición a estos contaminantes. Sin embargo, las escuelas se encuentran

ubicadas dentro del perímetro donde están los campos agrícolas, solo que a una distancia un poco mayor que en sus hogares. Por la mañana se realizan los mayores aportes de plaguicidas a los campos de cultivos y por efecto del viento, este también es menor en esta hora, favoreciendo una disminución con el contacto de las aspersiones de plaguicidas que pueden ser arrastradas por el viento y llevados a los sitios donde se encuentran los niños.

El nivel de escolaridad el 73% de los padres y madres en Pelayito fue menor que el grupo control (tabla 5), teniendo en cuenta que el 26,7 % nunca asistieron a la escuela, muchas situaciones relacionadas con la exposición a plaguicidas están ligadas a las condiciones de falta de educación. Estudios indican que aquellas personas con grados menores educación formal tienden también a ser menos saludables en su dieta (PAN, 2016) ya que se conoce que alta ingesta de cereales, legumbres, verduras, frutas y suplementos antioxidantes mejoran los procesos metabólicos de activación y desintoxicación del cuerpo (Kushi *et al*, 2012 ); el porcentaje de madres que no estudiaron y no terminaron la primaria fue del 73%, las mujeres son las encargadas de la administración del hogar y esto repercute negativamente ya que la falta de educación es de particular significado por sus consecuencias, cuando las niñas crecen, continúan con la responsabilidad de las tareas domésticas, la provisión de agua, la educación de miembros de la familia, llevar los alimentos a los sitios de trabajo en los cultivos, lavan la ropa contaminada con que sus familiares que han fumigado sin ningún tipo de protección, cuidado de los más pequeños y otras áreas donde los plaguicidas desempeñan su rol (PNUMA, 2004). Además, las mujeres al no tener estudios superiores la permanencia en el hogar es constante potencializando el riesgo a estar expuestas a estas sustancias peligrosas y por ende a los niños que son en última instancia los que mayor contacto tienen por los cuidados parentales.

En cuanto a los materiales de los cuales están construidas las viviendas (tabla 1) en la zona de estudio, los techos de las casas son de palma, las paredes de bloque sin repellar o bahareque y piso de tierra; se puede decir que es un factor clave a la

hora de determinar potenciales riesgos a la salud de los niños que allí viven, por ser de materiales permeables posibilitan la adherencia de los plaguicidas a estas superficies que llegan a los hogares por acción del viento, aumentando el tiempo de exposición. El suelo por ejemplo se contamina con los plaguicidas que se aplican en los campos vecinos o se vierten en los lugares cercanos a las viviendas cuando se realiza la limpieza de los equipos de fumigación (PHANUMA, 2014) y es el lugar donde van a parar gran parte de los desechos sólidos y líquidos de cualquier actividad humana, aunque los plaguicidas se degradan rápidamente en el suelo y sus residuos desaparecen en un corto plazo de tiempo, pero esto va a depender de la naturaleza del plaguicida (Ramires- Torres, 2017). Los más pequeños del hogar por estar en contacto con el polvo suspendido en el aire y pueden recibir mayores dosis que los adultos. Además, juegan más cerca del suelo debido a su actividad manoboca donde los plaguicidas se encuentran a mayores concentraciones, así mismo, también chupan y se llevan los juguetes u otros elementos a la boca por lo que reciben también objetos contaminados con estas sustancias. Otro factor que puede influir directamente en la exposición de estos tóxicos es que los niños de las zonas rurales tradicionalmente durante la época de lluvias se bañan en estas, sobre todo en los chorros de los canales que recogen las aguas que caen de los techos de sus viviendas y pueden arrastrar los materiales que allí están almacenados.

A diferencia del control la muestra no cuanta con agua potable (tabla 5), los plaguicidas pueden contaminar aguas superficiales y profundas, ya que, regularmente la preparación y el lavado de los equipos se hace cerca de una fuente de agua como canales de riego, posos subterráneos, caños entre otros y por escorrentía estas sustancias se depositarán y contaminarán este recurso hídrico, siendo en última instancia los niños por su tendencia a beber esta agua los más expuestos.

## **8.2 HÁBITOS Y PERCEPCIÓN DEL RIESGO PARA LA SALUD RESPECTO AL**

## USO DE LOS PLAGUICIDAS

Entre las familias agrícolas los padres o responsable del cuidado de los niños el 93.3% trabajan con plaguicidas (tabla 6) hecho aumenta el riesgo al que se encuentran expuestos los infantes, sabiendo que ya están en alto peligro de contaminación por vivir en la zona de cultivos. La presencia de un agricultor en la casa, especialmente un fumigador, podría contribuir sumando residuos tóxicos que lleva desde el cultivo a la casa. Aunque estos residuos no son probables a causar intoxicación, pueden contribuir a exposición a largo plazo (Wilbur, 2011) del mismo modo otro posible riesgo al que pueden estar los hijos de los fumigadores es que muchos de estos no conocer el tiempo post aplicación de 24 horas que recomienda la FAO y pueden permanecer en los predios tratados con plaguicidas y llevar estos residuos también a casa aumentando el riesgo a la exposición ya que los padres traen residuos de los plaguicidas a la casa en la ropa que usan durante la fumigación y manipulación de estas sustancias (FAO, 2008).

El 90% de los agricultores coinciden en no guardar los plaguicidas dentro de la casa porque consideran que los niños están expuestos a estas sustancias y son peligrosas para la salud, sin embargo, el 10% si lo hacen, además, el 33.3% de los niños ayudan con las labores agrícolas como cosechando, llevando suministros agrícolas entre otros (Tabla 6). los niños de los trabajadores agrícolas participan en actividades que los pueden exponer a altas concentraciones de pesticidas, ya que por la cercanía de estos con sus casas pueden jugar en los campos agrícolas o cerca de ellos después de que se han hecho aplicaciones de pesticidas (PAN, 2016). Los niños son más vulnerables que los adultos a los efectos dañinos por distintos motivos, la tasa de respiración de los niños casi duplica a la de un adulto, lo cual significa que los niños inhalan cerca del doble de los pesticidas que se dispersan en el aire o que se usan en su hogar (Miller *et al*, 2002). Al mismo tiempo, los mecanismos biológicos de defensa de los niños no se han desarrollado plenamente, el hígado y los riñones (los principales órganos de desintoxicación del cuerpo) no

están totalmente desarrollados en los niños, lo cual reduce su capacidad para excretar sustancias químicas peligrosas (Furlong *et al*, 2006), por lo anterior, podemos decir, que la muestra se encuentra expuesta a niveles de riesgo altos; tanto por factores de dispersión, falta de concientización de los agricultores en la aplicación de buenas prácticas agrícolas y manejo inadecuado de pesticidas (Jiménez *et al*, 2016).

### **8.3 OTROS FACTORES DE RIESGO PARA LA SALUD Y DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

Las viviendas se encuentran ubicadas muy cerca de los cultivos (tabla 7), el 86.7% entre 1 a 100 metros de distancia resultando obvia la exposición a plaguicidas que están sometidos los niños que viven en este sitio. Así, mismo más del 90% percibe olores a plaguicidas en sus casas cuando son aplicados a los cultivos y esta frecuencia solo va a depender de los requerimientos de cada cosecha. Según Sankoh *et al.*, (2016) a mayor tamaño del predio de cultivo, mayor será el volumen de pesticida requerido; y este depende del poder adquisitivo de los agricultores y el área de la finca. Pese a que a no existe un protocolo estándar que sugiera un umbral prescrito para limitar la dosis a utilizar, esta práctica conlleva a un uso excesivo de pesticidas, alterando gravemente la calidad de salud de la población expuesta directamente y de aquellos que residen en cercanías al lugar de trabajo (Deziel *et la*, 2016). Algunos autores como (Etiennont, A. & Piazza, A. 2010) aportan información sobre la distancia mínima de aspersiones en cuanto a las áreas que se desea proteger, oscilando valores de 100m a 1500m, dentro de límites restringidos para las menores distancias y sugieren seleccionar plaguicidas de menor toxicidad. En cuanto a la legislación colombiana (Decreto 1843) establece franjas de seguridad de 100m para la aplicación aérea y de 10 m para la aplicación terrestre, en relación con “cuerpos o cursos de agua, carreteras troncales, núcleos de población humana o animal, o cualquiera otra área que requiera protección especial”. En el caso de la ubicación de las pistas para operación de aplicación aérea de plaguicidas, la norma

exige “una distancia mínima de cien (100) metros lateralmente al eje central y mil (1000) metros de las cabeceras de éstas, respecto de centros poblados. Por lo anterior la muestra seleccionada de Pelayito se encuentra en un nivel de riesgo extremadamente peligroso por estar dentro de la distancia mínima de fumigación. A diferencia de la muestra control el agua de consumo no es potable y sin ningún tipo de tratamiento para el uso doméstico (tabla 7). Como se mencionó anteriormente las viviendas se encuentran muy cerca de las zonas de cultivo con distancias entre (1m a 500m) y alrededor de ellas se encuentran dos fuentes de agua (canal de drenaje y un caño) que son utilizadas para riego, preparación de productos agrícolas, uso doméstico como (el lavado de artículos del hogar, riego de las casas entre otros) y el agua que llega por tuberías del acueducto municipal pero no es potable, la cual es tomada del Río Sinú que baña todo el municipio de San Pelayo donde se encuentra ubicada la muestra. Por escorrentía los desechos de los plaguicidas pueden terminar acumulándose en estas fuentes de agua y así aumentar la exposición de las personas que viven cerca. En este sentido, la agricultura basada en prácticas no apropiadas dependientes de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas) y fertilizantes tóxicos, es apoyada y promovida en Colombia por políticas nacionales e internacionales, desde la década de 1950. Dichas prácticas han contaminado los ecosistemas acuáticos y terrestres, y los alimentos; causando graves problemas de salud a corto, mediano y largo plazo, alterando la biodiversidad de flora y fauna, desarrollando resistencia de plagas y aparición de enfermedades. Esto hace más costosa la agricultura, más pobres y enfermos a los agricultores; además de un impacto negativo a los ecosistemas (Tobón *et al*, 2011).

Para la muestra estudiada el 83% (tabla 7) usa como método de cocina la leña comparándola con el control que usa gas natural. La Organización Mundial de Salud (OMS) estima que aproximadamente la mitad de la población mundial (tres mil millones de personas) queman leña, estiércol, carbón y otros combustibles tradicionales dentro de sus hogares para preparar alimentos, calentar agua

y para calefacción. Se estima que, a diario, las mujeres y sus hijos pequeños inhalan cantidades de humo equivalentes al consumo de dos paquetes de cigarrillos por día. Este es un serio problema de salud pública que recibe poca atención en la mayoría de los países. El humo de las cocinas es uno de los principales problemas de salud de las zonas pobres, junto con la falta de acceso a agua y letrinas sanitarias (Naranjo, 2010). Los niños de esta zona se encuentran expuestos al humo generado por la cocción de los alimentos, lo que puede contribuir con algunos resultados evaluados en micronúcleos en epitelio oral y ensayo cometa

#### **8.4 BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGENÉTICOS Y DE EXPOSICIÓN EVALUADOS EN LA MUESTRA EVALUADAS**

El efecto genotóxico fue evaluado mediante dos biomarcadores de daño citogenético: El ensayo Cometa(EC) de células en sangre periférica y ensayo de Micronucleos (MN) en células de mucosa oral, también se usó un biomarcador de exposición que fue la Atrazina en orina y sus metabolitos, Desisopropil-atrazine (ADI) y Desitil- desisopropil-atrazina (ADDI) por ser uno de los plaguicidas más usados en la zona de estudio, los valores positivos en orina de dos metabolitos (ADI y ADDI) demuestran que los niños están expuestos a este plaguicidas y los resultados del ensayo Cometa en cuanto al ID en ADN, Longitud de la cola , % de ADN en cola (tabla 9), para la muestra de Palayito reportaron diferencias significativas comparándolos con el control; así mismo, la frecuencia de aparición de MN y yemas nucleares fueron valores más altos también para la muestra expuesta. Los datos obtenidos nos sugieren que la exposición a plaguicidas (ADI y ADDI) a la que los niños se encuentran está causando grave daño en el ADN y por ende pone en riesgo la salud de ellos que son los más vulnerables a estos contaminantes; sumado a eso, la cercanía de los hogares a los cultivos y las fuentes de agua a que tienen acceso pueden estar contaminadas con plaguicidas aumentando la exposición. Hay poca información disponible sobre los efectos de atrazina en niños, sin embargo, al ser la Atrazina un plaguicida que ha sido

detectado en cuerpos de agua potable, superficial y subterránea de áreas agrícolas y por ser unos de los plaguicidas más usados a nivel mundial ( Rinsky *et al*, 2012, Villanueva *et al*, 2005 ), por escorrentía desde los campos agrícolas las reservas de agua se pueden contaminar, volviéndose una preocupación y un riesgo a la salud de las personas cuando son fuentes de agua para consumo humano sin ningún tratamiento con es el caso de la muestra estudiada. Los altos niveles de Atrazinas en aguas contaminadas se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama (Villanueva *et al*, 2015) y existe evidencia de que esta asociados con resultados adversos al nacimiento como bajo peso y parto prematuro (Stayner *et al*, 2017 y Rinsky *et al*, 2012) es un disruptor endocrino que causa daños a las estructuras reproductivas (Gammon *et al*, 2015) defectos cardíacos, urinarios y de las extremidades en humanos. Se ha demostrado también desacelera el desarrollo de fetos en animales y la exposición a altos niveles de atrazina durante el embarazo causa reducción de la supervivencia de los fetos. No está claro si a qué nivel de exposición esto podría ocurrir en humanos, no se sabe si la atrazina o sus metabolitos puede ser transferido de una madre embarazada al desarrollo del feto a través de la placenta o de una madre lactante a su descendencia a través de la leche materna (ATSDR, 2003). Solo se conoce que en la muestra estudiada se encuentra en alto riesgo por los resultados positivos de metabolitos de Atrazina encontrados en orina. Otro trabajo publicado en el año 2018 por la universidad de Kentucky, con el propósito de evaluar la asociación entre las posibles exposiciones ambientales a la atrazina en los sistemas de agua y las tasas de prevalencia de defectos de nacimiento en el estado de Kentucky, los resultados de este estudio respaldan la mayoría de las investigaciones previas que informan alguna asociación mixta entre atrazina y defectos congénitos. Los condados con una exposición media alta a la atrazina tuvieron tasas más altas de todos los defectos congénitos y defectos congénitos genitales que los condados con una exposición media baja a la atrazina (politis, 2018). Aunque las propiedades tóxicas de la atrazina son bien conocidas, los datos sobre los efectos genotóxicos en el ser humanos y sobre todo en niños son bastante escasos.

## **8.5 CORRELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES DE DAÑO CITOGÉNÉTICOS CON LOS BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS QUE PRESENTAN RIESGO DE EXPOSICIÓN**

En este estudio se evidencio frecuencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de ADI y ADDI y los biomarcadores de daño citogénéticos (MN y EC) evaluados (tabla.9). Los estudios relacionados con la evaluación de daño citogénético por exposición a plaguicidas en niños usando ensayo de MN y EChan reportado una correlación positiva comparándolos con los datos de la muestra control (tabla. 9). Reafirmando lo reportado por Benites-Leite, 2010, donde participaron 48 niños expuestos a pesticidas y 46 niños no expuestos, registrando un promedio mayor de micronúcleos en los niños expuestos. otro estudio realizado en el 2014 en la que estudiaron cincuenta niños que habitan la localidad de Marcos Juárez (Córdoba, Argentina), ubicados a diferentes distancias de exposición a la aplicación de plaguicidas encontrando diferencia significativa en la presencia de micronúcleos entre los expuestos a menos de quinientos metros con respecto al grupo de niños no expuestos, así mismo reportaron que el 40% de los individuos expuestos sufren algún tipo de afección persistente, que se podría asociar a la exposición crónica a plaguicidas. Así, mismo en un estudio exploratorio realizado en México en 2015 por González, los hallazgos sugieren la existencia de daño citogénético en los niños expuestos a plaguicidas y los niños presentan vario factores de riesgo genotóxicos asociados a padres que trabajan con plaguicidas, Hashim *et al*, 2016, reportaron mayor frecuencia de MN en mucosa oral en niños que viven con padres que manipulan plaguicidas, así mismo encontraron correlación significativa a mayor número MN con aumento de personas en el hogar que se dedican a la agricultura, distancias más cortas de campos de cultivos y mayor ruptura cromosómica a exposición temprana. El único reporte para Colombia sobre evaluación de daño citogénético en poblaciones de niños asociados a zonas agrícolas del Departamento de Córdoba fue realizado por Ruiz-Guzmán en el 2016,

donde mostro una tendencia creciente en la frecuencia de daño citogenético (MN, brotes nucleares y células apoptóticas) comparándolas con el control.

En relación con los resultados del ensayo cometa en donde los niños expuestos registran frecuencias mayores en cuanto a los parámetros evaluados (IDA ADN, longitud de la cola y % de ADN en cola) comparándolos con los del grupo control, son datos que concuerdan con los registrados por Herrera -Portugal en el 2005, donde evaluó daño citogenético a 30 niños residentes de áreas rociadas con DDT en Chiapas, México, los resultados fueron comparados con 30 controles comparables en edad y sexo, quienes vivían en áreas con menos exposición al DDT. Se encontró diferencia significativa en los valores medios de la cola del cometa y momento de cometa, así mismo, tuvieron una concentración sanguínea media de DDT y DDE significativamente más alta que los controles; otro estudio usando EC y MN en niños expuestos a bajas concentraciones ambientales de plaguicidas, se detectaron daño significativo al ADN (Kapka-Skrzypczak *et al*, 2013). Los estudios que evalúan los efectos genotóxicos en poblaciones de niños expuestos a plaguicidas a través de ensayos de MN y anomalías nucleares, así como, EC son escasos, por su parte los trabajos realizados en adultos son más numerosos y han demostrado una relación en la exposición a plaguicidas o mezclas complejas de estos con un incremento en el daño del material genético de los individuos estudiados, así como el grupo familiar al que se encuentran vinculado o los hogares que se encuentran cerca de campos pulverizados con plaguicidas, así lo demuestran una revisión de 49 publicaciones realizadas en diferentes partes del mundo en el período 1987-2012 (Aiassa *et al*, 2012) de los cuales se encontraron 30 estudios con diferencias significativas en comparación con los controles. América Latina también ha sido objeto de revisiones similares. Una de ellas, realizada entre 1985-2013, reporta 24 estudios que utilizaron el ensayo de MN; 14 en linfocitos en sangre periférica y 10 en células del epitelio bucal (Gómez *et al*, 2013), Así mismo, en otra revisión de cien trabajos publicados en distintas partes del mundo, 73 trabajos informan un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas,

micronúcleos, daño al ADN (cuantificado por el ensayo cometa) y/o ICH en linfocitos de sangre periférica o células de la mucosa bucal de los individuos expuestos laboral o no laboral a plaguicidas (Aiassa *et al*, 2012). Por lo anterior, los contaminantes ambientales como los plaguicidas o mezclas de estos pueden plantear un riesgo mayor para los niños que para los adultos, debido a que los niños tienen una mayor esperanza de vida para desarrollar enfermedades con periodos de latencia larga. Por ejemplo, si un adulto de 70 años de edad y un niño de 5 años de edad están expuestos a un agente carcinógeno con un período de latencia de 40 años, el niño tiene un mayor riesgo de por vida de desarrollar enfermedades crónicas provocadas por exposiciones tempranas (Zuñiga-Vanegas, 2009). La mayoría de los estudios descritos anteriormente registraron una tendencia creciente en la frecuencia de daño citogenética en personas y niños comparándolos con el grupo control no expuesto.

Pocos son los estudios llevados a cabo en el país y a nivel internacional para establecer el impacto de la Atrazina y sus metabolitos (ADI y ADDI) sobre la salud de los niños. El departamento de Córdoba, es una zona altamente vulnerable, debido a la alta actividad agrícola que se desarrolla como fuente de sostenimiento para los campesinos que viven en el sitio de estudio y utilizan plaguicidas en grandes cantidades y sin ninguna protección, causando problemas de salud que aún no están documentada. Estos datos serían utilizados como marco de referencia en la evaluación de impactos en la salud de los niños a causa de la exposición a metabolitos de Atrazina (ADI y ADDI).

En general los resultados obtenidos en este estudio utilizando los biomarcadores genotóxicos (EC y MN) son pruebas adecuadas para evaluar los riesgos ambientales y los daños relativos en el AND; constituyéndose en evidencia que apoyan el hecho de que la exposición a plaguicidas causa daño genotóxico y con ello pueden permite establecer las bases científicas para que las autoridades correspondientes a la toma de decisiones referentes al cuidado y riesgo que estas

sustancias cusan sobre la salud de los niños (Gómez-Arroyo, 2013).

## **9. CONCLUSIONES**

- El 90% de los niños de Pelayito viven en la zona agrícola desde su nacimiento, hecho que los coloca en una situación de alto riesgo a los efectos dañinos de los plaguicidas

- Las viviendas en la zona de estudio están construidas con materiales permeables que posibilitan la adherencia de los plaguicidas a estas superficies que llegan a los hogares por acción del viento, aumentando el tiempo de exposición a la que están sometidos los niños que viven en ellas.
- A diferencia de la muestra control el agua de consumo no es potable y sin ningún tipo de tratamiento antes de su consumo. alrededor de ellas se encuentra dos fuentes de agua un canal de drenaje y un caño que son utilizadas para riego, preparación de productos agrícolas, uso doméstico y el agua que llega por tuberías del acueducto municipal pero no es potable, la cual es tomada del Río Sinú que baña todo el municipio de San Pelayo donde se encuentra ubicada la muestra de estudio
- Las viviendas se encuentran ubicadas muy cerca de los cultivos, el 86.7% está entre 1 a 100 metros de distancia resultando muy obvia en cuanto a la exposición a plaguicidas que están sometidos los niños
- El biomarcador de exposición Atrazina en orina y sus metabolitos Desisopropil-atrazina (ADI) y Desitil- desisopropil-atrazina (ADDI), demuestran que los niños están expuestos a este plaguicida poniendo en riesgo la salud de ellos que son los más vulnerables a estos contaminantes
- Los resultados del ensayo Cometa en cuanto al ID en ADN, Longitud de la cola, % de ADN en cola, reportaron diferencias significativas comparándolos con el control y la frecuencia de aparición de MN y yemas nucleares fueron valores más altos para la muestra expuesta, lo que puede informar sobre el efecto genotóxicos que está causando este plaguicida en la salud de los niños que viven en esta zona agrícola
- Los resultados pueden ser útiles en la implementación de políticas de

protección de salud pública y comunidades científicas. Siendo este el primer estudio de daño al ADN en niños y evaluación de la mutagenicidad en niños de san Pelayo asociados a una zona agrícola

## **10. RECOMENDACIONES**

- Implementar programas de vigilancia, realizando monitoreo en tiempos establecidos con el objetivo de conocer la dinámica de estos contaminantes en estos grupos de niños.

- Formular proyectos donde se aumente la utilización de la gama de batería de biomarcadores moleculares.
- Realizar periódicamente biomonitoreo ambiental teniendo en cuenta parámetros biológicos (sangre, orina o aire exhalado) en otras regiones agrícolas para comparar los datos y que las autoridades pertinentes adopten medidas de mitigación y protección para esta población vulnerables a los plaguicidas

## **11. ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN**

El aporte principal de este proyecto fue conocer los potenciales efectos en la salud que presentan los niños en edades de 5 a 15 años en una zona agrícola del municipio de San Pelayo, en el departamento de Córdoba. Debido a la exposición

continúa a contaminantes ambientales, en especial a plaguicidas, asociados a las actividades agrícolas que se desarrollan en este sitio, utilizando biomarcadores de exposición (Atrazina y metabolitos Desisopropil-atrazina (ADI) y Desitil-desisopropil-atrazina (ADDI), en orina) y de efecto (ensayo cometa y micronúcleo en epitelio oral). La información obtenida será útil para diseñar y aplicar estrategias de salud pública que disminuyan los riesgos asociados a este tipo de agentes químicos. De igual manera este estudio es pionero para el comienzo de un monitoreo epidemiológico a corto, mediano y largo plazo que permita disminuir el riesgo en salud pública en el área de estudio.

Se aplicaron estrategias de comunicación como (folletos, participación en eventos), con el fin de informar a la comunidad sobre los riesgos de los efectos genotóxicos, y generar herramientas para comprender los efectos generados por la exposición a plaguicidas en niños. Por otra parte, la información científica colectada está disponible para consultas en las bases de datos de Colciencias y en el Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad de Córdoba.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abell, A. Juul, S. Bonde, JP. 2000. Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scand. J. Work Environ.* -136.

Adgate, J. Barr, D. Clayton, A. Eberly, L. Freeman, N. Liou, P. 2001. Measurement of Children's Exposure to Pesticides: Analysis of Urinary Metabolite Levels in a Probability-Based Sample. *Environ Health*: 583-590

Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2003. Resúmenes de salud pública: piretrinas y piretroides.

Aiassa D, Mañas F, Bosch B, Gentile N, Bernardi N, Gorla N. 2012. Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta biol. Colombia* 17: 485 – 510

Albertini, R. J. 2001. Validated biomarker responses influence medical surveillance of individuals exposed to genotoxic agents. *Radiat Prot Dosimetry*. 97: 47-54.

Albertini, R. J. 2001. Developing sustainable studies on environmental health. *Mutat Res.* 480-481: 317-331.

Albertini, R. J. 2004. Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. *IARC Sci Publ.* 153-177.

Albertini, R. 1994. Why use somatic mutations for human biomonitoring. *Environ. Mol.* 18-22.

Álvarez, M. Santerre, L. Zúñiga, G. Torres, B. Padilla, C. Fera, V. 2001. Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulfonate, and N-nitroso diethylamine in Tradescantia. *Salud Publica Mex.* 43:563-569.

Allen, R. Gottlieb, M. Clute, E. Pongiri, M, y Col. 1997. Breast cancer and pesticides in Hawaii: the need for further study. *Environ. Health Perspect.*: 679-683.

Andalucía. 2003. Consejería de Salud. Respuesta ante las intoxicaciones agudas por los plaguicidas. Manual para el sanitario.

Antonucci, G. Colus, I. 2000. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 20(2):265-272.

Anwar, W. 1994. Assessment of cytogenetic changes in human populations at risk in Egypt. *Mutat. Res.*

Apra, C. Strambi, M. Novelli, M. Lunghini, L. Bozzi, N. 2000. Biologic monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children.

Aris, A and Samuel, L. 2011. Maternal and Fetal Exposure to Pesticides Associated to Genetically Modified Foods in Eastern Townships of Quebec, Canada.

Arbuckle, T. Sever, L.E. 1998. Pesticide exposures and fetal death: a review of the epidemiologic literature. *Crit. Rev.* 229-270

Asociación Argentina de Especialidades en Estudios del Trabajo. 2005. ASET. Intoxicaciones con plaguicidas en niños: impacto en la salud y preparación temprana para el desarrollo de actividades laborales.

Ascarrunz, M. Tirado, N. González, A. Cuti, M. Cervantes, R. Huichi, O. y Jors, E. 2006. Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. Cuadernos Hosp. Clin.

Atrazine and Breast Cancer: A Framework Assessment of the Toxicological and Epidemiological Evidence *Toxicol Sci.* Oct; 123(2): 441–459.

ATSDR, 2003. Agencia para la Sustancias Toxicas y el Registro de Enfermedades. Resumen de salud pública en español. Atrazina.

Vineis, P. 2001. A multicenter case-control study in Italy on hematology neoplasms and occupation. *Epidemiology*, 12: 78-87.

A. 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup. Environ. Med.* 60:e11

Barbosa, A. y Bonin A. 1994. Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales, Australia. *Occup. Environ. Medicine.*

Benedetti, D. Nunez, E. Sarmiento, M. Porto, C. Iochims dos Santos, C. Ferraz, J. y da Silva, J. 2013. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micro-nucleus cytome assays. *Mutat. Res*

Benítez, S. Macchi, L. Fernández, V. Franco, D. Ferro, A. Mojoli, A. Cuevas, F. Alfonso, J. Sales, L. 2010. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas.

Bhalli, A. Khan, M. Haq, A. Khalid, M. y Nasim, A. 2006. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis.*

Blair, A. Grauman, J. Lubin, H. Fraumeni, F. 1983. Lung cancer and other causes of death among licensed pesticide applicators. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71: 31-37.

Blair, A. Cantor, P. Zahm, H. 1998. Non-Hodgkin's lymphoma and agricultural use of the insecticide lindane. *Am. J. Ind. Med.* 33:82-87.

Blasiak, J. Jaloszynski, P. Trzeciak, A. Szyfter, K. 1999. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.* 445(2):275-283.

Bradman, A. Whitaker, D. Quiros, L. Castorina, R. Henn, B. 2007. Pesticides and their Metabolites in the Homes and Urine of Farmworker Children Living in the Salinas Valley. *CA J Exp Sci Environ Epidemiol*; 17: 331-349.

Bolognesi, C. Parrini, M. Bonassi, S. Lanello, G. y Salanito, A. 1993. Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutat. Res.*

Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 543(3):251-272

Bolognesi, C. Landini, E. Perrone, E. y Roggieri, P. 2004. Cytogenetic biomonitoring of a Àgriculturist population in Italy: micronucleus analysis by Àuorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutat. Res*

Bolognesi, C. Carrasquilla, G. Volpi, S. Solomon, R. y Marshall, E. 2009. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from çve Colombian re-gions: association to occupational exposure to glypho-sate. *J. Toxicol. Environ. Health.*

Bolognesi, C. Creus, A. Ostrosky, P. y Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure.

Bortoli, G. Barbieri de Azevedo, M. Basso da Silva, L. 2009. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers.

B. Brown, M. Lillemoe, D. Schoenberg, B. Pottern, M. Schwartz, G, Hoover, N. 2001. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am. J. Ind. Med.*, 39 92-99.

Calderón-Segura, E. Gómez-Arroyo, S. Cortés-Eslava, J. Martínez-Valenzuela, C. Mojica-Vázquez, L. Sosa-López, M. Flores-Ramírez, D. Romero-Velázquez, Z. 2017. Citotoxicidad in vitro y genotoxicidad de los insecticidas piretroides Furia 180 SC (zeta-cipermetrina) y Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina) en linfocitos de sangre periférica humana.

Calvert, M. Talaska, G. Mueller, A. Ammenheuser, M. Fleming, E. Briggie, T. y Ward, E. 1998. Geno-toxicity in workers exposed to methyl bromide. *Mutat. Res.* 417, 115-128

Carrano, V. Natarajan, T. 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *International Commission for Protection against environmental mutagens and carcinogens. Mut Res*; 204: 378-406.

Casadinho, J. S. 2005. Intoxicaciones con plaguicidas en niños: impacto en la salud y preparación temprana para el desarrollo de actividades laborales.

Castellanos, J. 2009. Mucosa Bucal. *Revista de la Asociación dental mexicana.*

Castillo, J. Tenorio, E. Quintana, I. García, M. Ramírez, E. y Madrigal, E. 2006. Determination of DNA damage in Àoriculturists exposed to mixtures of pes-ticides. J. Biomed.

Casarett & Doull's toxicology. 2005. The Basic Science Of Posison. Sixth Edition.

Cejudo, E. 2012. Exposición a plaguicidas organoclorados en niños indígenas de potam, sonora, México. Instituto Tecnológico de Sonora. Obregón, Sonora, México

Colombia. 2007. Ministerio De Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial, uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2004-2007, Bogotá D.C.

Colombia. 2013. Ministro de Salud y Protección Social, IQEN Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, volumen 18 número 20- Bogota, D.C.

Corchado, J. biomonitorio Citogenético de Trabajadores del DBQ Mediante el Ensayo de Micronucleos. Santa Clara-Cuba. 2015.

Costa, C. Texeira, P. Silva, S. Roma, J. Coehlo, P. Gaspar, J. Alves, M. Laffon, B. Rueff, J. y Mayan, O. 2006. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 21, 343-350.

Costantini, S. Miligi, L. Kriebel, D. Ramazzotti, V. Rodella, S. Scarpi, E. Stagnaro, E. Tumino, R. Fontana, A. Masala, G. Vigano, C. Vindigni, C. Crosignani, P. Benvenuti,

Daston, G. Elaine, F. Gary, G. Penny, F. Stephen, O. Babasaheb, S. 2003 A Framework for Assessing Risks to Childrenfrom Exposure to Environmental Agents.

Davies, W. Kennedy, M. Teschke, K. Quintana, J. 1998. Cytogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. *Mutat. Res.* 416(1):101-113

Da Silva, J. Moraes, R. Heuser, D. Andrade, M. Silva, R. Kvitko, K. Emmel, V. Rohr,

De Cock, J. Westveer, K. Heederik, D. te Velde, E. van Kooij, R. 1994. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in The Netherlands.

Decisión 436 de 1998. Registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícolas. Lima – Peru.

De Roos, J. Zahm, H. Cantor, P. Weisenburger, D. Holmes, F. Burmeister, F. Blair, Deziel N, Beane L, Graubard B, Jones R, Hoppin J, Thomas K. 2016. Relative Contributions of Agricultural Drift, Para Occupational, and Residential Use Exposure Pathways to House Dust Pesticide Concentrations.

Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Universidad de Antioquia. Guías de manejo de pacientes Intoxicados 2005.

Du, G. Shen, O. Sun, H. Fei, J. Lu, C. Song, L. Xia, Y Wang, S. Wang, X. 2010. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays.

Eil, C. Nisula, C. 1990. "The binding properties of the pyrethroid to the androgen receptor of human skin fibroblasts and sex hormone binding globulin *Steroid Biochem J* ;35 (304):409-14.

Etiennot, A. & Piazza, A. 2010. Buenas Practicas de aplicacion de cultivos planos extensivos. Distancias a zonas urbanas. Criterios y soluciones.

FAO. Prácticas recomendadas para el manejo integrado del cultivo. Argentina. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 2008.

Falck, M. Hirvonen, A. Scarpato, R. Sirkku, T. Saa-rikoski, S. Migliore, L. y Norppa, Faustam, M. 2000. Mechanisms underlying Children's susceptibility to environmental toxicants. *Environ Health Perspect*; 108(Suppl 1): 13-21.

Fenech, M. Morley, A. 1985. Measurement of micronuclei in Lymphocytes. *Mutation Research*.: (147) 29-36.

Fenech, M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* 392: 11-18.

Fernández, D. Mancipe, L. Fernández, D. 2010. Intoxicación por Organofosforados. *Revista med. Universidad militar nueva granada Colombia*.

Fest, C. y Schmidt, J. 1973. The chemistry of organo-phosphorus pesticides. Springer-Verlag. pp. 122-135, Nueva York.

Fenech, M. Morley, A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*; 147: 29-36.

Furlong, Clement E, Nina Holland, Rebecca J Richter, Asa Bradman, Alan Ho, and Brenda Eskenazi. 2006. PON1 Status of Farmworker Mothers and Children as a Predictor of Organophosphate Sensitivity.

Gammon, W. Aldous, N. Carr, J. Sanborn, R. Pfeifer, F. 2005. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag Sci.* ;61(4):331-55

Garaj, V. Zeljezic, D. 1999. Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in workers employed in pesticides production. *Biologia*. 54:707-712.

Garaj, V. y Zeljezic D. 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat. Res.* 469, 279-285.

Garaj, V. y Zeljezic D. 2001 Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*

Garaj, V. y Zeljezic, D. 2002. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J. Appl. Toxicol.* 22, 249-255.

Glazer, R. Perkins, I. Young, L. Schlag, D. Campleman, L. Wright, E. 1999. Cancer among Hispanic children in California, 1988–1994: comparison with non-Hispanic white children. *Cancer.*;86:1070–1079

Gómez S, Martínez C, Calvo S, Villalobos R, Waliszewski S, Calderon M, et al. Assessing the genotoxic risk for Mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications. *Rev Int Contam Ambie* 2013; 29: 217-225.

Gore, A. Chappell, S. Fenton, J. Flaws, A. Nadal, G. 2015. The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals.

Giri, S. Giri, A. Sharma, G. Prasad, S. 2002. Mutagenic effects of carbofuran, a carbamate pesticide. *Mutat. Res.* 519, 75-82.

Gómez, S. Martínez, C. Carbajal, Y Martínez, A. Calderón, M. Villalobos, R. Waliszewsk, S, 2013. Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América latina. Rev. Int. Contam. Ambie. 29 (Número especial sobre plaguicidas) 159-180.

Gómez, S. Díaz, Y Meneses, A. Villalobos, R. Deleón, D. 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. Mutat. Res. 466:117-124

Gonsebatt, M. Vega, L. Salazar, A. Montero, R. Guzmán, P. Blas, J. 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. Mutat Res; 386: 219-228.

Grover, P. Danadevi, K . Mahboob,M. Rozati R. Saleha. Banu B. y Rahman, MF. 2006. Evaluación de daños genéticos en los trabajadores empleados en la producción de plaguicidas utilizando el ensayo de cometa.

González, A. y Mora, E. 2013. Micronúcleos En Mucosa Oral En Individuos Con Aparatología Ortodóncica En La Universidad De Cartagena.

González. G. 2009- 2020. Intoxicaciones por Plaguicidas. Casuística del hospital universitario del caribe y de la clínica universitaria san juan de dios de Cartagena. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia

Hanna, M. Lobo, R. 2006. Problemas de salud producidos por plaguicidas en cultivadores del departamento de Córdoba. I Congreso internacional y del Caribe en salud ambiental y ocupacional: salud, trabajo y ambiente.

Hashim, Z, How, V. Ismail, P. Omar, D. Said, S. 2016. Assessing the Genotoxic Damage among Farming Community: Identifying and Prioritizing the Associated Risk Factors. Asia Pacific Environmental and Occupational Health Journal, 2(2):1-

7,

Harrison, 2012. Principios de Medicina Interna. McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A. de C.V. Edición 18. Volumen 1.

Herrera-Portugal, C. Ochoa-Díaz, H. Franco-Sánchez, G. Díaz-Barriga, F. 2015. DNA damage in children exposed to DDT in a malarious area of Chipas-Mexico.

Holland, N. Duramad, P. Rothman, N. Figgs, W. Blair, A. Hubbard, A. y Smith T. 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 521, 165-178

Holland. 1999. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 441, 225- 237.

Hoyos, S. Carvajal, S. Solano, L. Rodríguez, J. Orozco, L. y López, V. 1996. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environ. Health Perspect.* 104, (Suppl. 3), 535-538.

IARC. 1991. International Agency for Research on Cancer Monographs. Occupational Exposures in Insecticide Application and Some Pesticides. 53:45-93.

INMA. INFANCIA Y MEDIO AMBIENTE, 2014:

<http://www.proyectoinma.org/presentacion-inma/> Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicology Letters.* 193: 124-130.

Instituto Nacional de Salud. Informe epidemiológico de las Intoxicaciones por sustancias químicas, Recuperado el 01 de marzo de 2011, de Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Subdirección de Prevención, Vigilancia y Control en Salud pública, Grupo Factores de Riesgo Ambiental, 2015.

James, A. Swenberg, N. Weiss, D. Brusick, J. Charles, E. James, T. Stevens, R. Handa, C. Hovey, Tony M. Plant, Timothy P. Pastoor, and Charles, B. 2011.

Jiménez-quintero, C. Pantoja-Estrada, A. Femey-Leonel, H. 2016. Riesgos en la salud de agricultores por uso y manejo de plaguicidas, microcuenca "La Pila". Hbana Cuba.

Ji, T. Silverman, T. Stewart, A. Blair, A. Swanson, M. Baris, D. Greenberg, S. Hayes, Jiménez, M. Rivas, A. Olea, F. Olea, N. 2004. Pesticidas organoclorados en suero y tejido adiposo de mujeres del sureste español Ecosistemas, vol. XIII, núm. 3, septiembre diciembre. Asociación Española de Ecología Terrestre España

Joksić, G. Vidakovic, A. y Spasojevic, V. 1997. Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. Environ. Res. 75, 113-118

Kapka-Skrzypczak, L. Posobkiewicz, M. Holownia, P. Niedzwiecka, J. Sawicki, K. Cyranka, M. Kruszewski, M. 2013. Assessing DNA damage in children environmentally exposed to pesticides through using the comet assay and the micronucleus test: Piotr Holownia. European Journal of Public Health, Volume 23, Issue suppl\_1, 1 October 2013, ckt124.057.

Kehdy, G. Cerqueira, M. Bonjardim, B. Camelo, M. y Castro L. 2007. Study of the cytogenetic effects of occupational exposure of pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. Gen. Mol. Res. 6, 581-593.

Kirsch, M. Elhajouji, A. Cundari, E. Van Hummelen, P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. Mutat. Res, 392: 19-30.

Kishi, M. Hirschhorn, N. Djajadisastra, M. Satterlee, N. Strowman, S. Dilts, R. (1995). Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers, *Scand.J. Work Environ. Health*. 211:24–133.

Kishi, M. y Ladou, J. 2001. International pesticide use. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7, 259-265.

Koifman, S. Koifman, J. Meyer. 2002. A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 18: 435-445.

Kushi, L. Doyle, C. McCullough, M. Rock, C. Demark- Wahnefried, W. Bandera, E. 2012. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention.

Kvitko, K. Bandinelli, E. Henriquez, P. Heuser, D. Rohr, P. da Silva, R. Balzan, Schneider, N. Fernandes, S. Ancines, C. y da Silva J. 2012. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Gen. Mol. Biol.* 35, 1060-1068

Laffon, B. Pérez, B. Méndez, J. 2004. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. Departamento de biología celular y molecular. Universidad de Curuña.

Lans, E. 2012 "Residuos de pesticidas organoclorados presentes en leche cruda comercializada en el departamento de Córdoba, Colombia". En: *Colombia Acta Agronomica ISSN: 0120-2812 ed: Editorial Feriva v.61 fasc.1 p.10 – 16.*

Larrea, M. 2007. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay, la Paz – Bolivia.

Lebailly, P. Vigreux, C. Lechevrel, C. Ledemeney, D. Godard, T. SICHEL, F. Letalaer, Y. HENRY, M. Gauduchon, P. 1998. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: modifications of DNA damage levels after a one-day field spraying period with selected pesticides. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(10):929-940.

Lee, T. Allison, R. O'Brien, K. Naves, J. Karlsson, U. y Wiley, L. 2002. Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.* 157, 678–684

Lock EA, Bonventre JV. Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology* 2008

Lockwood, A., Welker-Hood, K., Rauch, M. y Gottlieb, B. (2009) El Impacto del Carbón sobre la Salud Humana

López, F. Obiols, J. Subias, J. 1998. Plaguicidas agrícolas y salud. In: I. Morell, L. Cande la (Eds.), *Plaguicidas, Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*, Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, pp. 273–295

Márquez, C. Villalobos, C. Poblete, S. Villalobos, E. García, A. y Duk, S. 2005. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 1-7

Machado A, Ruíz M, Sastre M, Butinof M, et al. 2012. Exposición a plaguicidas, cuidado de la salud y subjetividad. España y Portugal: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe.

Marrugo, J. 2010. Plaguicidas en suelos agrícolas del valle del Sinú Medio y Bajo, departamento de Córdoba. Informe final. Montería: Oficina de Investigaciones,

Universidad de Córdoba; 121p.

Mañas, F. 2010. Evaluación de Estrés Oxidativo y Genotoxicidad del Glifosato. Tesis doctoral. Tesis doctoral.

Martínez, C. Gómez, S., Villalobos, R. Waliszewski, S. Calderón, E. Félix, R. y Álvarez, A. 2009. Geno-toxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa state, Mexico. *Environ. Int.* 35, 1155-1159.

Merhi, M. Raynal, H. Cahuzac, E. Vinson, F. Cravedi, P. Gamet, L. 2007. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control.* 18(10):1209-1226.

Mester, B. Nieters, A. Deeg, E. Elsner, G. Becker, N. Seidler, A. 2006. Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany. *Occup. Environ. Med.* 63:17-26.

Miller, Mark D, Melanie A Marty, Amy Arcus, Joseph Brown, David Morry, and Martha Sandy. 2002. Differences between Children and Adults: Implications for Risk Assessment at California.

Moutschen, J. Moutschen, H. y De-graeve, N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants* (M. Kirsch-Volders, Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp.127-203.

Moretti, M. Villarini, M. Sforzolini, S. y Pasquini, R. 2002. Pesticide-induced primary DNA damage in peripheral blood leukocytes of farm workers evaluated by the computerized 'comet' assay.

Monrroy, C. Cortez, A. Sicard, D. Groot, H. 2005. Cytotoxicity and Genotoxicity of humans cells exposed *in vitro* to glyphosate. *Biomedica* 25: 335-45.

Muchut, S. Simoniello, M. Scagnetti, J. Poletta G. L. Kleinsorge, E. 2011. Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

Muñiz, J. McCauley, L. Scherer, J. Lasarev, M. Koshy, M. Kow, Y. 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*; 227: 97-107.

Muñoz, F. 2009. Evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y Àoricultores. *Actualidad y Divulgación*.

NARANJO, F. Consultor Sistema de Gestión. 2010. La problemática de la salud, en relación con las cocinas de leña en áreas rurales a nivel mundial.

Neri, M. Ugolini, D. Bonassi, S. Fucic, A. Holland, N. Knudsen, E. 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage II. Results of a comprehensive literature search and metaanalysis. *Mutat Res*; 612: 14-18

Perry A.S., Yamamoto T., Ishaaya I. y Perry R.Y. (1998). *Applied agriculture. Insecticides in agriculture and environment. Retrospects and prospects*. Springer-Verlag, Nueva York, 261 p.

P. Bordin, L. An-dreazza, C. Salvador, M. Henriques, A. y Erdtmann, B. 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes.

Portal de alcaldes y gobernadores de Colombia, 2016: <http://www.sanpelayo->

[cordoba.gov.co/informacionmembros.html?&area=1](http://cordoba.gov.co/informacionmembros.html?&area=1)

Ramires-Torres, L. 2017. Destino de los plaguicidas.

Rahman, F. Mahboob, M. Danadevi, K. Banu, S. Grover, P. 2002. Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutat. Res.* 516(1):139-147.

Ramírez, V. y Cuenca, P. 2002. Daño del ADN en trabajadoras expuestas a plaguicidas en Limón, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*

Remor, L. Caprini, C. Alves, D. Pimentel, G. Dahlström, V. y Boeira, M. 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxic-ity. *Environ. Int.* 35, 273-278.

RAPALMIRA, Colombia. 2000. Mujeres y Plaguicidas: Una Mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. Estudio de casos en Palmira Colombia

Reynolds, P, Von Behren, J, Elkin, EP. 2002. Birth characteristics and leukemia in young children.

Rinsky, Jessica L. MPH, Claudia Hopenhayn, PhD, MPH, Vijay Golla, PhD, MPH, Steve Browning, PhD, and Heather M. Bush, PhD. 2012. Atrazine Exposure in Public Drinking Water and Preterm Birth

Rodríguez-Rey *et al* 2016. Principio de Relevancia del Ensayo Cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica.* ;35(2):184-194

Rohr, P. da Silva, J. Erdtmann, B. Saf, J. Nikolova, T. Pegas, A. y Kvitko, K. 2011. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and

modulation of DNA damage due to pesticide exposure. *Environ. Mol. Mutagen.*

Rojas E, Lopez M, Valverde M. 1999 Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications *J. Chrom B.*

Rull R, Gunier R, Von Behren J, Hertz A, Crouse V, Buffler Pa, Reynolds P. 2009. Residential proximity to agricultural pesticide applications and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Res.*;109(7):891-899.

Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, Danadevi K, Hussain SA, Grover P 2006. Evaluación genotóxica de los trabajadores empleados en la producción de plaguicidas

Sankoh A, Whittle R, Semple K, Jones K, Sweetman A. 2016 An assessment of the impacts of pesticide use on the environment and health of rice farmers in Sierra Leone.

Safi, M. 2002. Association between chronic exposure to pesticides and recorded cases of human malignancy in Gaza Governorates (1990-1999). *Sci. Total Environ.*

Scarpato, R. Migliore, L. Angotzi, G. Fedi, A. Miligi, L. y Loprieno, N. 1996. Cytogenetic monitoring of a group of Italian Agriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticides exposure. *Mutat. Res.* 367, 73-82.

Shaw, GM. Wasserman, R. O'Malley, V. Jackson, J. 1999. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. *Epidemiology*, 10: 60-66.

Shealy, D. Bonin, M. Wooten, J. Ashley, D. Needham, L. Bond, A. 1996. Application of an improved method for the analysis of pesticides and their metabolites in the

urine of farmer applicators and their families. *Environ Int* 22(6): 661-675

Simoniello, F. Kleinsorge, C. y Carballo, A. 2010. Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (Buenos Aires)* 70, 489-498.

Singh, N. McCoy, M. Tice, R. Schneider, A. 1988. simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res*; 175: 184-191.

SIVIGILA. 2013. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Protocolo de vigilancia y control de Intoxicación aguda por plaguicidas.

Soderlund, M. Clark, M. Sheets, mP. Mullin, S. Picirillo, J. Sargent, D. Stevens, T. and Weiner, L. 2002. Mechanisms of pyrethroids neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*.

Solans, X. Hernández, R. 2000. Control biológico de la exposición a genotóxicos: Técnicas Citogenéticas. En: NTP 354 del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Slutsky, M. Levin, L. Levy, S. 1999. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 5 116-122

Stich, H, Curtis, J, Parida, B. 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers.

Stich H. y Rosin M.P. (1984). Micronuclei in exfoliated human cells as tool for studies in cancer risk and cáncer intervention. *Cancer Lett.* 22, 241–253.

Stubbs, H. Harris, J. Spear, C. 1984. A proportionate mortality analysis of California agricultural workers 1978-1979. *Am. J. Ind. Med.*, 6: 305-320

Spiewak, R. 2001. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann Agric Environ Med.* ; 8 (1): 1-5.

Sorgob, A. Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215-228.

Sulbato, L. 1994. Mammalian toxicology of organo-phosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43, 271-189

Surrallés, J. Xamena, N. Creus, A. Marcos, R. 1995a The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res.*, 342: 43-59.

Surrallés, J. Natarajan, A. 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey.

Stayner, L. Almborg, K. Jones, R. Graber, J. Pedersen, M. Turyk, M. 2016. Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states.

Tisch, M. Schmezer, P. Faulde, M. Groh, A. Maier, H. 2002. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 259(3):150-153.

Titenko, N. Wiindham, G. Kolachana, P. Reinisch, F. Parvatham, S. Osorio, M. y Smith, M. 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion- exposed workers. *Mutat. Res.* 388, 85-95.

Tobón, f. López, I. 2011. Genotoxicidad del agua contaminada por plaguicidas en un área de Antioquia.

Torres, o. & ramos, m. 2013. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Int. J. Morphol.*, 31(2):650-657.

Tope, A. Bebe, N. y Panemangalore, M. 2006. Micro-nuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 843-853.

Torres, D. y Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: Uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental.

OMS, Organización Mundial de la Salud: OPS, Organización Panamericana de la Salud: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 2007. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS;

Orsi, L. Troussard, X. Monnereau, A. Berthou, C. Fenaux, P. Marit, G. Soubeyran, P. Huguet, F. Milpied, N. Leporrier, M. Hemon, D. Clavel, J. 2007. Occupation and lymphoid malignancies: results from a French case-control study. *J. Occup. Environ. Med.* 49(12):1339-50.

PAN, Pesticide Action Network Nort America 2016. Los niños frente al peligro. La amenaza de los pesticidas a la salud de los niños en las zonas rurales.

Pasquini, R. Scassellati, G. Angeli, G. Fatigoni, C. Monarca, S. Beneventi, L. DiGiulio, M. y Bauleo, F. 1996. Cytogenetic biomonitoring of pesticide-exposed farmers in central Italy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15, 29-39.

Pastor, S. 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Universidad Autònoma de Barcelona. Facultad de Ciències Departamento de Genètica y de Microbiologia. Grup de Mutagènesi.

Pastor, S. Creus, A. Parrón, T. Cebulska, A. Siffel, C. Piperakis, S. y Marcos, R. 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18, 249-258

Paz y Miño, C. Arévalo, M. Sánchez, E. y Leone, E. 2004. Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphisms for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutat. Res.* 562, 77-89.

Paz y Miño, C. Sánchez, E. Arévalo, M. Muñoz, J. Witte, T. Oleas, G. y Leone, E. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Gen. Mol. Biol.* 30, 456-460.

Penagos, G. 2002. Contact dermatitis caused by pesticides among banana plantation workers in Panama. *Int J Occup Environ Health.* Jan-Mar;8(1):14-8.

Peralta, L. Mañas, F. Gentile, N. Bosch, B. Méndez, A. y Aiassa, D. 2011. Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio de un caso en Córdoba, Argentina. *Diálogos-Universidad Nacional de San Luis-Facultad de Ciencias Humanas* 2, 7-26.

Perry, J. 2003. Children's agricultural health: traumatic injuries and hazardous inorganic exposures. *Rural Health Summer;* 19(3): 269-78.

Pilipchuk, R. Iakuba, I. 1991. The indices of free-radical oxidation in persons in contact with synthetic pyrethroids". *Vrach Delo.*(7):69-71.

PISSQ. 1993. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Atrazina: Guía para la salud y la seguridad.

Preussman, R. Schneider, H. y Epple, F. 1969. Untersuchungen sur wachweis alkylierender agentien. *Arzneimittel Forschung* 19, 1059-1073

Politis, M. "Exposición ambiental a la atrazina y defectos de nacimiento: un estudio ecológico en Kentucky, 2005-2014" (2018). *Tesis y Disertaciones - Salud Pública (MPH y Dr.PH)*

Puumala, E. Soler, T. Johnson, J. Spector, G. 2008. Birth characteristics and Wilms tumor in Minnesota. *Int J Cancer*. 122:1368–1373. PNUMA, 2004. Intoxicación por plaguicidas en niños. Información para la gestión y la acción.

Vale, A. 1998. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorous Insecticide Poisoning. *Toxicology Letters*. 102:649-52.1,2.

Vaglenov A., Laltchev S., Petkova V., Pavlova S. y Marcos R. (2001). Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ. Health Perspect.* 109, 295–298.

Varona, M. Cárdenas, O. Crane, C. Rocha, S. Cuervo, G. Vargas, J. 2003. Cytogenetic alterations in field workers routinely exposed to pesticides in Bogotá flowers farms. *Biomédica*. 23(2):141-152.

Venegas, W. Zapata, I. Carbonell, E. y Marcos, R. 1998. Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepcion, Chile. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 18, 123-129.

Vergara, V. 2009. Evaluación Ambiental del Acuífero Morroa por Aplicación de Agroquímicos en su Área de Recarga. [Trabajo de grado de maestría]. Sucre-Colombia: Universidad de Sucre;

Viel, F. Challier, B. Pitard, A. Pobel, D. 1998. Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Arch. Environ. Health.* 53:65-70.

Villanueva C, Durand G, Coutté M, Chevrier C, Cordier S. 2015. Atrazina en agua potable municipal y riesgo de bajo peso al nacer, parto prematuro y estado de edad para la gestación pequeña.

Vlastos, D. Demisia, G. y Matthopoulos, D. 2006. Evaluation of genetic damage in tobacco-growing farmers occupationally exposed to a mixture of malathion and imidacloprid. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84, 183-191

Weselak, M. Arbuckle, T. Foster, W. 2007. Pesticide Exposures and Developmental Outcomes: The Epidemiological Evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B.*10:41-80.2.

Wilbur, A. 2011. Riesgo de exposición a los plaguicidas en las familias con niños menores de 6 años de Azapa y Lluta, Chile.

Wilkinson, D. Fleming, E. MacKinnon, J. 2001. Lymphoma and lymphoid leukemia incidence in Florida children: ethnic and racial distribution. *Cancer.* ;91:1402–1408

Zeljezic, D. y GARAJ, V. 2001. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis.* 16(4):359-363

Zhang, W. Jiang, F. y Feng Ou J. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci. 1, 125-144.

Zuluaga, J. Mujeres y Plaguicidas. Una mirada a la situación actual, tendencia y riesgo de los plaguicidas. Estudio de caso en Palmira, Colombia. 2000.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Encuesta



UNIVERSIDAD DE CORDOBA  
FORMATO  
ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

*Universidad de  
Córdoba,  
comprometida  
con el desarrollo  
regional.*

**Proyecto: DAÑO CITOGÉNICO EN POBLACIONES INFANTILES EXPUESTAS A  
PLAGUICIDAS EN ZONAS AGRICOLAS DEL NORTE DE COLOMBIA.**

Esta encuesta es voluntaria. Toda la información que Ud. proporcione será confidencial y será utilizada solo con fines científicos.

Localidad: Expediente:

No. de muestra:

Hora de toma:

Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: M F

Edad: \_\_\_\_\_ años.

Peso \_\_\_\_ kg. Talla \_\_\_\_ cm.

Nombre de la Madre o tutor: \_\_\_\_\_

Domicilio \_\_\_\_\_ Mpio: \_\_\_\_\_

Cerca de (Referencias): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Tiempo de residencia: \_\_\_\_\_ Años.

Residencia anterior: \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES:

Cual de las siguientes enfermedades has padecido:

Sarampión, Rubéola, Varicela, etc. ( ) Infecciones Gastrointestinales ( ) Paperas ( )

Infecciones Vías respiratorias ( ) Alergias ( ) Cáncer ( )

Has padecido alguna de ellas en el ultimo mes: (S) (N) Cuales? \_\_\_\_\_

Si recibió medicamento para alguna de ellas, indique Cual: \_\_\_\_\_

Recibe actualmente algún tratamiento medico: (S) (N) Cual? \_\_\_\_\_

Con que finalidad? \_\_\_\_\_ Desde hace cuanto tiempo? \_\_\_\_\_

Vacunas mas recientes: \_\_\_\_\_ Cuando? \_\_\_\_\_

Desparasitante más reciente: \_\_\_\_\_

Cuando? \_\_\_\_\_

Estudios de Rayos X en el ultimo año: (S) (N) Cuando? \_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD DE CORDOBA  
 FORMATO  
 ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

*Universidad de  
 Córdoba,  
 comprometida  
 con el desarrollo  
 regional.*

Proyecto: DAÑO CITOGÉNÉTICO EN POBLACIONES INFANTILES EXPUESTAS A  
 PLAGUICIDAS EN ZONAS AGRICOLAS DEL NORTE DE COLOMBIA.

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES:

Familiar	Presión alta	Diabetes	Cáncer	malformaciones
Abuelo paterno				
Abuela paterna				
Abuelo materno				
Abuela materna				
Padre				
Madre				
Hermano(a) 1				
Hermano(a) 2				
Hermano(a) 3				
Tio(a)1				
Tio(a) 2				
Tio(a) 3				
Primo (a) 1				
Primo (a) 2				
Primo (a) 3				

\*Numerar a los hermanos de mayor a menor.

**ESTILOS DE VIDA:**

Actividad del Padre: \_\_\_\_\_ Fuma: (S) (N) Trabaja con plaguicidas: (S) (N)

Actividad de la Madre: \_\_\_\_\_ Fuma: (S) (N) Trabaja con plaguicidas: (S) (N)

Sabe cuales plaguicidas? \_\_\_\_\_

Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces al mes/año

Utiliza ropas especiales? (S) (N) Los guarda dentro de la casa? (S) (N)

El donador ha manejado plaguicidas? (S) (N) En los últimos 6 meses? (S) (N)

Cuántas veces? \_\_\_\_\_

Utilizó ropas especiales? (S) (N)

Algún tipo de protección? (S) (N) Cual? \_\_\_\_\_

El donador participa en labores agrícolas? (S) (N)

Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana



UNIVERSIDAD DE CORDOBA  
FORMATO  
ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

*Universidad de  
Córdoba,  
comprometida  
con el desarrollo  
regional.*

**Proyecto: DAÑO CITOGÉNICO EN POBLACIONES INFANTILES EXPUESTAS A  
PLAGUICIDAS EN ZONAS AGRICOLAS DEL NORTE DE COLOMBIA.**

Vive cerca de un campo agrícola? (S) (N)

A que distancia? \_\_\_\_\_mts.

Se fumiga en el? (S) (N) Frecuencia? \_\_\_\_\_

En casa para controlar el mosquito se utiliza: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M)

(S) Dentro/ Fuera

En casa para controlar la hormiga se utiliza: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M) (S) Dentro/ Fuera

Otro insecticida que utilice en casa: \_\_\_\_\_ Intensidad (L) (M) (S)

**(L) Leve=Menos de una vez por mes**

**(M) Moderado=Menos de una vez por semana**

**(S) Severo=mas de una vez por semana**

Vive cerca de una instalación petrolera? S N A que distancia? \_\_\_\_\_ mt.

Tipo de instalación: \_\_\_\_\_

Detecta olores raros o desagradables en el hogar? (S) (N)

Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana

Detecta olores raros o desagradables en el la escuela? ? (S) (N)

Con que frecuencia? \_\_\_\_\_ veces/semana

El agua que toma es de: (Pozo) (Rio) (Llave) (Garrafón)

Detecta algún sabor raro o desagradable en el agua que toma? (S) (N)

En casa la estufa es de: (Leña) (Gas) (Petróleo) Dentro/Fuera

**OBSERVACIONES:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Encuestó: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

Manifiesto que he ido enterado de las características generales del estudio, así como de los procedimientos que van a ser utilizados para la toma de muestras, estando de conformidad con ello doy mi consentimiento para que mi hijo participe en el estudio.

Nombre y firma del tutor

## ANEXO 2. Evidencias de estrategias de comunicación



La Universidad de Córdoba, Universidad de Cartagena y Universidad de Sucre con el apoyo de Colciencias realizan el proyecto: DAÑO CITOGENÉTICO EN POBLACIONES INFANTILES EXPUESTAS A PLAGUICIDAS EN ZONAS AGRICOLAS DEL NORTE DE



### ¿CUÁN ES EL OBJETIVO DEL ESTUDIO?

Evaluar el daño citogenético en poblaciones infantiles expuestas a plaguicidas en zonas agrícolas del Norte de Colombia (Valle Medio del Río Sinu, Departamentos de Córdoba y la Región de la Mojana, Departamento de Sucre), mediante el uso de una batería

### ¿PORQUÉ SE TRABAJARÁ CON LOS NIÑOS?

Porque los niños son más sensibles y corren mayores peligros que los adultos a causa de los plaguicidas y necesitan más

### ¿QUÉ PLAGUICIDAS SE VAN A EVALUAR EN EL PROYECTO?

Plaguicidas organoclorados, piretroides sintéticos, organofosforados, carbamatos y triazínicos.

### ¿CÓMO PUEDES PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Inicialmente realizaremos una encuesta para conocer aspectos relacionados con tu salud, hábitos y prácticas en el uso de plaguicidas o tu relación con estos productos. Luego te realizaremos pruebas de sangre y orina tomaremos

### ¿QUIERES SABER MÁS?

Infórmate en: Universidad de Córdoba, Grupo de Aguas Química Aplicada y Ambiental. Investigador Principal: José Luis Marrugo Negrete, E-mail: [jlmarrugon@hotmail.com](mailto:jlmarrugon@hotmail.com), [pamelagoc@hotmail.com](mailto:pamelagoc@hotmail.com), [javierr\\_ruiz@hotmail.com](mailto:javierr_ruiz@hotmail.com)

Por la prevención en salud para tus hijos, Participa!

### **ANEXO 3. formato de consentimiento informado del proyecto.**



*Universidad de  
Córdoba,  
comprometida  
con el desarrollo  
regional.*

**Proyecto: DAÑO CITOGÉNICO EN POBLACIONES INFANTILES  
EXPUESTAS A PLAGUICIDAS EN ZONAS AGRÍCOLAS DEL NORTE DE  
COLOMBIA.**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

(Este formato será aplicado a los adultos responsables de los niños participantes.)

#### **Descripción y Propósito del Proyecto**

El objetivo de este estudio es evaluar el daño citogenético en poblaciones infantiles generado por la exposición a plaguicidas en zonas agrícolas del Norte de Colombia (Departamentos de Córdoba y Sucre), mediante el uso de una batería de biomarcadores de efectos y marcadores de exposición, para obtener información relevante sobre el impacto de los plaguicidas en la salud de los infantes, conducentes a proteger la vida y calidad de vida de la población expuesta.

Se le pedirá responder a preguntas que ayudarán al investigador/a a lograr los objetivos de este estudio. Sus respuestas a esta entrevista serán recogidas por el investigador/a en la forma de tomar notas, si usted lo autoriza.

Todas las notas de las entrevistas serán utilizadas exclusivamente para los fines de este estudio. Esta entrevista o cuestionario (según sea el caso), tendrá una

duración de aproximadamente 15 minutos, dependiendo de sus respuestas.

### **Evaluación de Riesgos y Beneficios**

Este estudio está diseñado para representar un riesgo mínimo para sus participantes. Las preguntas están diseñadas para no requerir divulgar cualquier información que pueda ser perjudicial para usted.

### **Procedimientos del estudio**

Si usted y su hijo aceptan participar, se le tomarán una muestra de 10mL de sangre al niño en el antebrazo, distribuidos en dos tubos vacutainer adicionado con heparina para el análisis de los biomarcadores de efecto (EC, MN, IM, CPC, ICH, ).

Las muestras de orina serán colectadas a primera hora del día (primera orina de la mañana), por los participantes en recipientes plásticos (polietileno de alta densidad) estériles, previas instrucciones para su toma y conservación, posteriormente se transportarán con hielo al laboratorio para su procesamiento

### **Beneficios**

Además de beneficiarse conociendo el estado de salud del niño/a, usted y su hijo/a estarán capacitados para tomar las medidas correctivas y preventivas para mejorar las condiciones que garanticen un mejor desarrollo del niño/a, así mismo usted colaborará con el desarrollo de estrategias que vigilen la exposición a contaminantes ambientales en la zona.

### **Terminación del estudio**

Usted entiende que su participación y la del niño/a en el estudio es

**VOLUNTARIA**. En cualquier momento usted y/o el niño/a puede retirar su consentimiento a participar en el estudio. Su médico también podrá detener el estudio por razones médicas u otras razones.

### **Riesgos**

El niño/a puede sentir un poco de molestia, y en raras ocasiones, ardor e inflamación en el sitio donde se le tome la muestra de sangre. Pero esto es algo pasajero y en poco tiempo desaparecerá. Para reducir la posibilidad de infección, se aplicará una técnica de limpieza y desinfección en el área donde se toma la muestra. Todos los procedimientos los realizarán personal entrenado, mediante el uso de material estéril y la cantidad total de sangre necesitada no representa un riesgo importante para la salud.

### **Personas a contactar**

Si tiene cualquier pregunta acerca de este estudio o acerca de lo que debe hacer en caso de que sienta alguna molestia durante el estudio, puede comunicarse con el investigador responsable:

Nombre del Investigador: José Luis Marrugo Negrete Dirección: Carrera 6 # 76-103 Universidad de Córdoba.

Telefax: 7860300 Ext. 310. Laboratorio de Toxicología y Gestión ambiental.

### **Terminación del estudio**

Yo \_\_\_\_\_ identificado con documento de identidad número \_\_\_\_\_, autorizo el almacenamiento y uso de las muestras restantes en investigaciones futuras, pero solamente las relacionadas con el tema de investigación actual.

**Aceptación**

SU FIRMA INDICA QUE USTED HA DECIDIDO QUE EL NIÑO/A PUEDE PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN ESTE ESTUDIO DESPUÉS DE HABER LEIDO LA INFORMACIÓN ANTERIOR.

Firma del Participante: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre/Firma del Investigador Testigo: \_\_\_\_\_

**ANEXO 4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk) para las variables respuesta involucradas en los análisis de comparación entre grupos.**

**Pruebas de normalidad**

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	n	Sig.	Estadístico	n	p
Índice de daño al ADN	Control	,209	25	,006	,856	25	,002
	Pelayito	,135	30	,172	,953	30	,207
% ADN en cabeza	Control	,163	25	,083	,935	25	,115
	Pelayito	,143	30	,121	,889	30	,004
Longitud cola	Control	,144	25	,192	,934	25	,105
	Pelayito	,297	30	,000	,745	30	,000
% ADN en cola	Control	,149	25	,157	,879	25	,006
	Pelayito	,170	30	,028	,912	30	,017
Micronúcleos	Control	,245	25	,000	,850	25	,002
	Pelayito	,193	30	,006	,814	30	,000
Yemas nucleares	Control	,354	25	,000	,710	25	,000
	Pelayito	,137	30	,158	,933	30	,060
Células en cariólisis	Control	,146	25	,178	,966	25	,539
	Pelayito	,128	30	,200*	,829	30	,000
Células en cariorrexis	Control	,207	25	,007	,871	25	,005
	Pelayito	,448	30	,000	,258	30	,000
Células en picnosis	Control	,129	25	,200*	,918	25	,046
	Pelayito	,125	30	,200*	,956	30	,240
Células binucleados	Control	,420	25	,000	,593	25	,000
	Pelayito	,256	30	,000	,795	30	,000
Edad	Control	,246	25	,000	,879	25	,007
	Pelayito	,114	30	,200*	,954	30	,220
Sexo	Control	,388	25	,000	,625	25	,000
	Pelayito	,354	30	,000	,637	30	,000
Índice Masa Corporal	Control	,135	25	,200*	,963	25	,484
	Pelayito	,155	30	,063	,935	30	,066

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**ANEXO 5.** Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk) para las variables involucradas en los análisis de correlación en el grupo de Pelayito.

**Pruebas de normalidad**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	n	p
Distancia casa-cultivo	,421	23	,000	,519	23	,000
Frecuencia fumigación cultivos	,323	23	,000	,809	23	,001
Frecuencia olor plaguicidas en casa	,470	23	,000	,577	23	,000
El niño participa en labores agrícolas?	,437	23	,000	,582	23	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

**ANEXO 6. Registros fotográficos. cercanía de los cultivos a las viviendas**

