



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

“Estudio de genotoxicidad y su correlación con el deterioro cognitivo en una población rural del noroeste de México, por la exposición directa e indirecta a pesticidas organofosforados”

**TESIS** para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

**Presenta**

Estefanía Rivera Martínez

**Directora de tesis:**

Dra. Aracely Serrano Medina

Tijuana, Baja California, marzo de 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**  
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

**FOLIO No. 069**

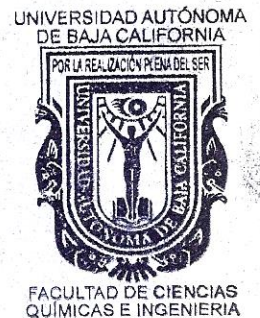
Tijuana, Baja California, a 29 de enero de 2025

**C. ESTEFANIA RIVERA MARTÍNEZ**  
FASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTE:

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la opción de **Tesis** es propuesto por la **Dra. Aracely Serrano Medina** quien será la responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema: "*Estudio de genotoxicidad y su correlación con el deterioro cognitivo en una población rural del noroeste de México, por la exposición directa e indirecta a pesticidas organofosforados*", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

**RESUMEN**

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES
- III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIONES
- VI. TRABAJO A FUTURO
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
- VIII. APÉNDICES



\_\_\_\_\_  
Dra. Aracely Serrano Medina  
**Directora de Tesis**

\_\_\_\_\_  
M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez  
**Director**

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez  
**Subdirectora**

## **Dedicatoria:**

A Dios quien puso a las personas adecuadas en mi camino para que pudiera iniciar este trabajo, así como los recursos durante el camino y me fortaleció para poder terminarlo, quiero dedicar no solamente la tesis, también mis futuros trabajos académicos y profesionales.

A mis papás José Luis Rivera Rivas y María Teresa Martínez Salcedo quienes me criaron con amor, paciencia y apoyo, buscando mi felicidad y mi éxito, enfrentando juntos a la vida por ellos y su familia, enseñándome lo que es la perseverancia y el amor. Por siempre creer en mí y apoyarme en cada una de las metas que me proponía, por procurar mi salud y bienestar, por acompañarme y dejarme crecer en mis proyectos, gracias, mis logros son por y para ustedes.

A toda mi familia, mi hermana Teresa Rivera Martínez, que siempre tiene muestras de afecto y apoyo, mis tías y tíos, mis primos, los amigos de la familia que se volvieron familia, pero especialmente a mi hermano, José Luis Rivera Martínez, por ser además de mi hermano, mi amigo, mi confidente para mis proyectos y mi segunda opinión siempre que busco claridad.

A mis mejores amigas, Nicole Pérez, Naomi Calendario Andrea Bejarano Duque por ser mi red de apoyo durante mis últimos años universitarios, espero que sigamos creciendo juntas. A Catherine, por ser mi mejor amiga desde la preparatoria, que, siempre estas cuando lo necesito, y siempre eres mi más grande fan. Andrea y Catherine me han visto crecer desde la preparatoria y así como mi cambio y desarrollo durante la universidad culminado en esta tesis con la cual también me vieron constantemente trabajar.

Todos han sido importantes durante mi crecimiento como estudiante y persona en mi estancia universitaria y han sido partícipes de este trabajo por su influencia sobre mí, por ello les agradezco y dedico los frutos presentes en una tesis.

## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco el apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de Baja California a través de los siguientes medios: la 23<sup>a</sup> Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación, por la beca otorgada durante el año 2023. Asimismo, agradezco a la Facultad de Medicina y Psicología por permitirme realizar mi proyecto en sus laboratorios, así como a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por apoyar en el viaje de estudios. Por último, expreso mi gratitud al Rancho Los Pinos en el municipio de San Quintín, Baja California, por permitirnos colaborar en sus jornadas de salud.

## **Agradecimientos personales**

A mi directora de tesis, la doctora Aracely Serrano Medina por toda su paciencia, dedicación y compromiso ya que sin ella esta investigación no hubiera sido posible. Así como a mi equipo de trabajo, QFB Yahaira Anette Hidalgo, Dra. Krysta Carranza Ambriz, y a todos los estudiantes de la facultad de ciencias químicas e ingeniería que apoyaron en los viajes realizados a San Quintín que fueron fundamentales para que este proyecto fuera concretado, así como los docentes que participaron en cada uno de los viajes.

A mi comité de tesis integrado por el Dr. José Manuel Cornejo Bravo, el Dr. Luis Villareal Gómez la Dra Minerva Janini Mejía y la Dra Ayla Carolina Vea Barragán. Todos ustedes han sido partícipes de mi crecimiento como alumna de la carrera, ayudándome a mejorar mi entendimiento de mi trabajo impartíendome clases, ayudando en el viaje de estudio y/o brindándome apoyo extra en forma de tiempo e instrumental para la experimentación.

# Índice de Contenido

Dedicatoria: .....	1
Agradecimientos institucionales .....	2
Agradecimientos personales.....	2
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1 Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>I.2 Antecedentes: .....</b>	<b>11</b>
<b>I.3 Justificación .....</b>	<b>15</b>
<b>I.4 Hipótesis .....</b>	<b>16</b>
<b>I.5 Objetivo general .....</b>	<b>17</b>
<b>I.6 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPITULO II. TEORÍA GENERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>II.1 Pesticidas.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.1 Definición y clasificación de los pesticidas.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2 Características de los pesticidas .....</b>	<b>23</b>
<b>II.1.3 Efectos sobre la salud y toxicidad.....</b>	<b>24</b>
<b>II.1.4 Intoxicación por organofosforados.....</b>	<b>27</b>
<b>II.1.5 Factores de riesgo de exposición durante el uso de pesticidas.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2 Sistema nervioso y cognición .....</b>	<b>32</b>
<b>II.2.1 Sistema nervioso colinérgico y neurotransmisión.....</b>	<b>32</b>
<b>II.2.2 Colinesterasas: Acetil y butirilcolinesterasa.....</b>	<b>37</b>
<b>II.2.3 Colinesterasas como blanco de los pesticidas.....</b>	<b>39</b>
<b>II.2.4 Importancia y función del sistema colinérgico.....</b>	<b>40</b>
<b>II.3 Deterioro cognitivo .....</b>	<b>42</b>
<b>II.3.1 Deterioro cognitivo y sus efectos.....</b>	<b>42</b>
<b>II.3.2 Pruebas diagnósticas.....</b>	<b>43</b>
<b>II.3.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro.....</b>	<b>46</b>
<b>II.4 Genotoxicidad.....</b>	<b>50</b>
<b>II.4.1 Genotoxicidad e impacto clínico.....</b>	<b>50</b>

II.4.2 Pruebas para genotoxicidad.....	52
II.4.3 Ensayo cometa.....	54
II.4.3 Genotoxicidad y su relación con los pesticidas.....	57
<b>CAPÍTULO III. EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>59</b>
III.1.1 Equipo .....	60
III.1.2 Reactivos .....	60
<b>III.2. Metodología.....</b>	<b>61</b>
III.2.1 Declaración ética .....	61
III.2.2 Diseño del estudio.....	61
III.2.3 Recolección de datos sociodemográficos .....	63
III.2.4 Evaluaciones neuropsicológicas .....	63
III.2.5 Tomas de muestras sanguíneas .....	64
III.2.6 Determinación de la actividad enzimática (AChE): .....	65
III.2.7 Determinación de actividad enzimática de la butirilcolinesterasa (BCHE) .....	66
III.2.8 Determinación de la hemoglobina total.....	66
III.2.10 Evaluación del daño genético .....	67
III.2.11 Análisis Estadístico .....	69
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
IV.1 Estudios sociodemográficos.....	71
IV.2 Estudios de actividad de la colinesterasa .....	72
IV.3 Estudios del factor neurotrófico derivado del cerebro .....	74
IV.4 Estudios del deterioro cognitivo.....	76
IV.5 Estudios del daño genético .....	82
IV.6 Análisis de correlación .....	87
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPITULO VI PROYECTOS A FUTURO.....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
<b>CAPÍTULO VIII. ANEXOS .....</b>	<b>110</b>
Anexo 1. Prueba MoCA (Montreal Cognitive Assessment) .....	111

<b>Anexo 2. Prueba TMT (Trial Making Test).....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 3. Datos normativos para TMT con ajuste a la población adulta de México. ....</b>	<b>116</b>
<b>Anexo 4. Kit de análisis de la actividad de la acetilcolinesterasa .....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 5. Kit para determinación de BDNF.....</b>	<b>119</b>
<b>Anexo 6. Kit de Lymphoprep para separación de linfocitos .....</b>	<b>122</b>
<b>Anexo 7. Ejemplos de cometas encontrados en voluntarios de ambos grupos.....</b>	<b>123</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 4.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 5.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 6.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 7.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 8.....</b>	<b>83</b>

## **Índice de Tablas**

<b>Tabla I.1 .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla I.2 .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabla II.1 .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla II.2.....</b>	<b>73</b>
<b>Tabla II.3.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla II.4.....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla II.5.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla II.6.....</b>	<b>79</b>
<b>Tabla II.7.....</b>	<b>82</b>
<b>Tabla II.8.....</b>	<b>85</b>
<b>Tabla II.9.....</b>	<b>88</b>
<b>Tabla II.10.....</b>	<b>91</b>

## **Abreviaturas**

AChE Acetilcolinesterasa

ACh Acetilcolina

BChE Butirilcolinesterasa

ED Exposición directa

EI exposición indirecta

OMS (Organización Mundial de la Salud)

FAO Organización de Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization,)

TMT Trial Making Test

MoCA Montral Cognitive Assessment

MMSE Minimental State Examination

BDNF Factor neurotrófico derivado del cerebro

OPs Organofosforados

SNC Sistema nervioso central

SNP Sistema nervioso periférico

PAP Plaguicidas de Alta Peligrosidad

# **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1 Introducción.**

En México el sector agropecuario es uno de los principales medios de empleo para la población residente de las zonas rurales, promoviendo que la agricultura mantenga su importancia en el medio rural, (SAGARPA & FAO, 2012) . Con una cantidad de 5.4 millones de personas dedicadas a la agricultura y una producción de 268.6 millones de toneladas de productos agrícolas en 2022, México se consolida como uno de los líderes en la producción mundial de alimentos (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022). El uso de plaguicidas tanto a nivel mundial y especialmente a nivel nacional ha tenido un aumento debido a la demanda agroalimentaria, ocasionando como resultado que las consecuencias del uso de estos elementos sean cada vez más presentes lo cual se puede observar en los números de casos de intoxicación por plaguicidas (Esquivel-Valenzuela et al., 2019). Para evitar este tipo de incidentes se han establecido normas como la NOM-003-STPS-1999, o el proyecto de NOM-003-STPS-2016, donde se establecen medidas de cuidado al sector ocupacional que indican condiciones y prácticas laborales así como la concientización al personal sobre el uso y los peligros de los plaguicidas, sin embargo en varios estudios se ha destacado un incumplimiento de varias recomendaciones de estas normas, esto relatado por experiencias de los trabajadores en situaciones como la falta de un equipo de protección o en conductas como almacenamiento de plaguicidas en casa, ingesta de alimento en la zona de aplicación de plaguicidas, etc. (Herrera Moreno et al., 2018).

Los plaguicidas según la FAO son cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga que cause un perjuicio a la producción agrícola, alimenticia, ganadera o de madera, en cualquiera de sus etapas. De este modo son fabricados con una intención toxicológica deseada para la eliminación de plagas, aunque por su naturaleza e interacciones llega a ser un agente tóxico para los seres humanos teniendo múltiples efectos tanto a nivel físico como el cognitivo y

emocional. Ejemplo de los efectos de los organofosforados (OP) son alteraciones genéticas, al sistema nervioso, endócrino, inmune y reproductivo, así como afectación al aprendizaje y la conducta (Prado Flores et al., 2019). Un estudio sobre la deficiencia cognitiva demostró que en trabajadores expuestos a OP era mayor la predisposición a desarrollar Alzheimer debido a la existencia de un alelo no usual en una población no expuesta (Diaz Osorio, 2021). Otro estudio realizado en Chile demostró que la población expuesta a OP tenía mayor porcentaje de individuos con polineuropatía (38%) en comparación a los trabajadores agrícolas no expuestos que presentaron este padecimiento (8%) lo cual demuestra la relación en el deterioro o la insuficiencia nerviosa y los OP (Pizarro et al., 2018). Existen así múltiples estudios que se realizan con el objetivo de investigar y denotar el impacto hacia la salud humana, donde la mayoría tiene un enfoque en las intoxicaciones agudas y sus manifestaciones (Bernardino-Hernández et al., 2019) y las investigaciones que se enfocan en intoxicaciones crónicas suelen realizarse teniendo de base de estudio población en contacto directo en comparación a población con contacto nulo, teniendo muy pocos estudios que hablen de una población indirecta como habitantes de la zona o familiares de los trabajadores expuestos, existiendo más que nada investigaciones hacia la población infantil.

## **I.2 Antecedentes:**

El tema de los plaguicidas y su relación con el deterioro cognitivo es un tema muy complejo pese a lo estudiado que es, ya que si bien existen múltiples estudios que demuestran una relación entre el deterioro cognitivo con la exposición a distintos plaguicidas es difícil identificar con certeza la consecuencia neurológica de cada tipo de plaguicida para poder determinar entonces la relación entre los organofosforados y el deterioro cognitivo, esto se refuerza con disonancias en los resultados entre varios estudios similares.

En 2005, se realizó estudio sobre una población de mexicanos, divididos entre el grupo a analizar, conformado por 17 trabajadores laboralmente expuestos pertenecientes a una industria de fabricación de pesticidas, y dos grupos control compuestos por individuos no expuestos laboralmente e individuos sin aparente exposición directa de la misma industria, con la finalidad de relacionar la exposición crónica a organofosforados y el deterioro cognitivo, así como la neuropatía periférica. Este estudio identificó como resultado una asociación entre el deterioro de las funciones cognitivas con la cantidad de tiempo expuestos a organofosforados, donde quienes obtuvieron resultados positivos al deterioro cognitivo fueron aquellos que se encontraban en contacto directo con insecticidas con un promedio de 15.7 años de antigüedad, este estudio sugiere que existe un daño cognitivo acumulativo a la constante exposición a los organofosforados (De Los Ríos et al., 2005).

Otros estudios más recientes han mostrado resultados similares. En 2017, Wongta y colaboradores hicieron un estudio sobre una provincia principalmente agrícola ubicada en el Norte de Tailandia, donde tras analizar a 98 participantes residentes de la zona entre los 25 y 70 años, se encontró una correlación positiva entre el deterioro cognitivo y la exposición elevada a pesticidas organofosforados, obteniendo que aquellos individuos con una exposición a pesticidas de un 70% de su horario laboral tuvieron 5 veces más posibilidades de presentar deterioro cognitivo que aquellos individuos que tuvieran una exposición de 20% o menor de su horario laboral (Wongta et al., 2023), estos resultados confirman la idea de la relación entre una exposición elevada a pesticidas con una mayor cantidad de casos con deterioro cognitivo, sin embargo al no tomar en cuenta la antigüedad laboral de los trabajadores se desconoce si la diferencia en el desempeño cognitivo se ve afectada por daño acumulativo debido a exposición crónica.

Sin embargo, existen estudios con resultados que sugieren que no existe una diferencia significativa entre el deterioro cognitivo y la intensidad de exposición a los organofosforados. Otro estudio en Asia, realizado entre 2015 y 2017 sobre una población de 169 trabajadores relacionados a la agricultura o agronegocios de la provincia de Gangwon-do en Corea del Sur, donde a dichos trabajadores se les clasificó entre aquellos que tuvieron mayores niveles de intensidad e índice de exposición acumulativa como exposición directa y aquellos con menores como exposición indirecta, y si bien el grupo que tenía una mayor exposición a pesticidas tuvo una tendencia a una mayor frecuencia de casos de deterioro cognitivo no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los casos de deterioro cognitivo y los niveles de intensidad, el índice de exposición acumulativa ni entre la exposición directa, nula e indirecta, existiendo solamente una diferencia significativa entre si eran agricultores o no y si usaban pesticidas o no. Estos resultados más la diferencia estadística del deterioro cognitivo en relación con la edad sugirieron como una posible conclusión, la hipótesis de que la exposición crónica a pesticidas incrementa el deterioro cognitivo conforme aumenta la edad de los individuos (Kim et al., 2019).

Por otro lado, existen diversos estudios que demuestran daño genotóxico causado a células, principalmente sanguíneas, causado por distintos plaguicidas, dentro de este tipo de daño los principales marcadores para distintos estudios han sido los ensayos cometas, estudios de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, que si bien pueden hacerse en cualquier célula sanguínea han existido estudios que demuestran que el principal daño genético ocurre en los linfocitos. Esto se puede observar tanto dentro de estudios in vitro sobre linfocitos de ratas expuestas a pesticidas organofosforados donde el resultado fueron linfocitos con ADN dañado debido a la oxidación de purinas (Ojha & Srivastava, 2014), como en estudios enfocados al efecto sobre humanos por uso ocupacional de pesticidas organofosforados.

Algunos estudios evidencian la importancia del enfoque sobre los linfocitos para la investigación de daño genotóxico, como el estudio de Rosales de 2015 que se enfocó en los tres marcadores genotoxicológicos mencionados anteriormente en una población de 59 agricultores con un grupo control de 50 personas no expuestas, donde se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de individuos en las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos de los linfocitos aislados y preparados, mientras que no existió una diferencia significativa entre ambos grupos en los resultados de los ensayos cometas realizados sobre una muestra general de sangre (Rosales, 2015). Este estudio demuestra una principal afectación a los linfocitos, lo cual se refuerza por otros estudios donde se realizaron ensayos cometas a linfocitos encontrando diferencias significativas como en el caso del estudio realizado en Bolivia por Larrea y colaboradores en 2010 sobre una población de 118 agricultores y 80 participantes del grupo control donde se analizó el daño genotóxico a linfocitos por medio de un ensayo cometa para demostrar la relación de este daño con la exposición a pesticidas, donde más de un 70% de los participantes habían sido expuestos a pesticidas de tipo organofosforado. Se obtuvieron como resultados, además de una correlación estadísticamente significativa entre la genotoxicidad en agricultores expuestos en relación con los controles, que los individuos expuestos a organofosforados o mezclas de estos tuvieron un daño genotóxico significativamente superior, tanto por medio del estudio cometa como análisis de micronúcleos, a diferencia de quienes estuvieron expuestos a otro tipo de plaguicidas. Este estudio también demostró que los trabajadores con una antigüedad de exposición superior tuvieron mayor daño genotóxico, observando valores significativos elevados en aquellos que tuvieran más de 20 años trabajando con plaguicidas (Larrea Poma et al., 2010), corroborando la idea de un daño crónico acumulativo.

### **I.3 Justificación**

Es conocido que los pesticidas son hechos con una intención toxicológica para detener o eliminar plagas, y pensados con un nivel de toxicidad no tan elevado para permitir la manipulación de estos con un debido cuidado, y del mismo modo se ha demostrado la importancia del uso de estos para permitir una producción incrementada en el sector agropecuarios para cumplir tanto con las demandas económicas como las necesidades de la población, generando una amplia variedad de empleos, empleos que tendrán cierta relación con los pesticidas, lo cual desemboca en un uso común que conlleva numerosos casos de intoxicación tanto aguda por un mal manejo de los pesticidas, como crónica por un manejo más constante de estos.

Los pesticidas como los organofosforados pueden generar intoxicación aguda, caracterizada por los síntomas del síndrome colinérgico, intoxicación intermedia o síndrome intermedio, caracterizado por aparición de síntomas tardíos a una exposición en comparación a la intoxicación aguda, e intoxicación tardía o neurotoxicidad tardía caracterizada por un conjunto de síntomas que como su nombre lo indican afectan principalmente al sistema nervioso. Si bien los síntomas más claros de la neurotoxicidad tardía son aquellos físicos como manifestaciones sensoriales o del sistema motor, existe evidencia de múltiples estudios para asociar una exposición crónica con síntomas y enfermedades psiquiátricas e incluso alteración o inicios de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas.

México basa una gran parte de su economía en actividades del sector agropecuario, el área del noroeste es una de las áreas ejemplo donde se llevan a cabo bastantes actividades agrícolas donde se hace uso de pesticidas, y si bien es de esperar un uso responsable y cuidados adecuados por parte de las empresas que manejan estas actividades, hay varias investigaciones que señalan lo contrario, donde no hay suficiente capacitación del personal, no existen instalaciones para cuidado

de la higiene de estos, e incluso no se les brinda equipo de protección o para el manejo de pesticidas, generando diferentes situaciones que son factores de riesgo para intoxicaciones ocasionadas por plaguicidas.

Por estas razones es necesario realizar más estudios que denoten las diferentes consecuencias negativas del uso de pesticidas sobre personas que entren en contacto con ellos, tanto a población que tuvo contacto de corto como largo plazo, así como en poblaciones que tienen diferente tipo de contacto, tanto directo como indirecto, con enfoque a diferentes edades o sistemas/órganos o parámetros biológicos afectados. Con la finalidad de juntar suficiente evidencia para promover un cuidado más rigurosas en el uso de pesticidas, como generar conciencia en toda la población y cuidar especialmente a los sectores de la población rural que son los más vulnerables.

Este estudio se suma a esta necesidad colectiva de recolectar información sobre la exposición crónica en una población bastante estudiada como lo es la directa, con una población poco estudiada como la indirecta, donde además se hace un enfoque poco común que es la correlación del desempeño cognitivo con el daño genotóxico, y en un área donde hacen falta mayor cantidad de investigaciones, como lo es México, específicamente al área noroeste.

## **I.4 Hipótesis**

La exposición crónica directa e indirecta a pesticidas organofosforados sin un adecuado cuidado genera consecuencias a nivel molecular y celular ocasionando daño genético, inhibición de actividad enzimática de las colinesterasas y niveles anormales del factor neurotrófico, lo cual se ve reflejado a nivel desempeño cognitivo.

## **I.5 Objetivo general**

El objetivo de este estudio es determinar los impactos cognitivos y genéticos por la exposición a pesticidas en individuos expuestos directa (es decir, trabajadores agrícolas) e indirectamente (es decir, residentes de áreas agrícolas). Para ello, se realizarán evaluaciones cognitivas de memoria, atención, función ejecutiva, lenguaje y praxis de construcción visual en dos grupos con diferentes grados de exposición a plaguicidas: directa e indirecta, así como detectar el daño al ADN por medio de estudios cometas a estos mismos grupos. También se realizarán correlaciones de los resultados de cognición con la actividad enzimática de las colinesterasas sanguínea y plasmática, considerándolos como biomarcadores para el impacto de pesticidas.

## **I.6 Objetivos específicos**

- Determinar el grado de deterioro cognitivo mediante instrumentos neuropsicológicos en voluntarios de poblaciones rurales y poblaciones urbanas de Baja California.
- Determinar el factor neurotrópico derivado del cerebro; por la probable correlación de estos biomarcadores en el deterioro cognitivo.
- Determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa para determinar el grado de inhibición mediante kit comercial en voluntarios de poblaciones rurales de Baja California.
- Determinar la serie roja de cada paciente mediante citometría de flujo para determinar la actividad específica de la acetilcolinesterasa.
- Determinar la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa mediante un ensayo colorimétrico para determinar el grado de contaminación de los voluntarios.
- Determinar el grado de daño al ADN mediante el Estudio Cometa sobre linfocitos para determinar la genotoxicidad en voluntarios de poblaciones rurales de Baja California que han estado en contacto directo e indirecto con plaguicidas organofosforados.

- Realización de análisis estadísticos correlacionando el impacto ambiental entre los dos grupos poblacionales mediante la correlación de los resultados de las evaluaciones de cognición con la actividad enzimática de las colinesterasas junto con los valores de la bioquímica clínica de los agricultores y la serie roja.
- Realizar análisis estadísticos correlacionando el impacto ambiental entre los dos grupos poblacionales mediante la correlación de los resultados de las evaluaciones de cognición con la genotoxicidad observada en células linfocitos de los voluntarios observados.

## **CAPITULO II. TEORÍA GENERAL**

## **II.1 Pesticidas**

### **II.1.1 Definición y clasificación de los pesticidas**

Los pesticidas son definidos según la Organización de Alimentación y Agricultura, o FAO (food and agriculture organization) como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias de ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga, o regular el crecimiento de las plantas” (FAO,OMS, 2019), mientras que a una plaga la Organización Mundial para la Salud, OMS, le define como cualquier “especie, variedad o biotipo vegetal, animal o agente patógeno dañino para las plantas y productos, materiales o entornos vegetales” (OMS & FAO, 2014).

Existen además definiciones específicas adoptadas tanto por la FAO como la OMS para los plaguicidas que cuenten con recomendaciones y/o restricciones de uso, como los son los Plaguicidas de Alta Peligrosidad, PAP, los cuales son todos aquellos a los cuales se les reconozca que representan peligros agudos o crónicos elevados o bien que ocasionen un daño grave o irreversible para la salud o el medio ambiente, estos pesticidas generalmente son productos sin protección de patentes, disponibles a bajo costo y aunque suelen estar retirado de la venta en los países de ingresos altos, a menudo quedan registrados y siendo vendidos en países de ingresos bajos y medios (FAO,OMS, 2019). Los Plaguicidas de uso muy Restringido, son aquellos a los cuales como medida para proteger la salud o el medio ambiente se les ha sido prohibidos prácticamente en su totalidad pero que se sigan autorizando usos específicos incluyendo productos que hayan sido retirados del mercado. Y por último están los Plaguicidas Prohibidos los cuales son aquellos a los cuales sus usos han sido prohibidos en su totalidad como una medida para proteger la salud o el medio ambiente, incluyendo aquellos que no hayan sido aprobados o los que hayan sido retirados del mercado (OMS & FAO, 2014).

Existen diversas maneras de clasificar a los pesticidas ya sea por su uso o tipo de plaga contra el que se usa, por su estructura química, por su toxicidad o su peligro, por su estado físico, por su comportamiento en la planta, por su modo de acción, etc.

Por su vida media se pueden clasificar en permanentes los cuales son productos hechos a partir de mercurio, plomo o arsénicos; persistentes, con una vida media de varios meses hasta 20 años, como el DDT; moderadamente persistentes cuya vida media es de 1 a 18 meses como el paratión, y no persistentes cuya vida media es de menos de 12 semanas, como el malatión (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Por su uso principal se pueden clasificar en fungicidas, insecticidas, o herbicidas (Bedman, 2011), siendo estos los más comunes, aunque también existen los larvicidas, repelentes, nematocidas, reguladores del crecimiento de la planta, acaricidas, reguladores del crecimiento de insectos, moluscicidas, etc. (WHO, 2009).

Por su estructura química se pueden clasificar en compuestos arsénicos (AS), carbamatos (C), compuestos de cobre (CU), compuestos de mercurio (HG), organofosforados (OP), derivados de triazinas (T), tiocarbamatos (TC), organoclorados (OC), piretroides (PY), derivados del ácido fenoxiacético (PAA), etc (WHO, 2009).

Por su toxicidad existen dos maneras de clasificarlos, por un lado esta la clasificación dada por la OMS para los pesticidas según su peligrosidad, *tabla 1.1* la cual es una actualización de la clasificación propuesta en 1975, y por otro lado está la clasificación en categorías según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS), *tabla 1.2*, donde clasifica a los pesticidas según su riesgo de toxicidad aguda. Ambas clasificaciones no son excluyentes, si no complementarias, por ejemplo, existen pesticidas de diferente riesgo

toxicológico según la GHS que pertenecen a la clasificación de extremadamente peligrosos, Ia, según la clasificación de la OMS.

Clasificación		DL <sub>50</sub> en ratas (mg/kg peso corporal)			
		Oral		Dermica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
<i>Ia</i>	Extremadamente peligrosos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
<i>Ib</i>	Altamente peligroso	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
<i>II</i>	Moderadamente peligroso	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
<i>III</i>	Ligeramente peligroso	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

*Tabla I.1* Clasificación de los pesticidas según su peligrosidad establecida por la OMS (WHO, 2009).

Categoría	Clasificación de los criterios			
	Oral		Dérmico	
	DL <sub>50</sub> (mg/kg peso corporal)	Declaración de peligrosidad	DL <sub>50</sub> (mg/kg peso corporal)	Declaración de peligrosidad
Categoría 1	< 5	Fatal si es ingerido	< 50	Fatal en contacto con la piel
Categoría 2	5 – 50	Fatal si es ingerido	50 – 200	Fatal en contacto con la piel
Categoría 3	50 – 300	Toxico si es ingerido	200 – 1000	Toxico en contacto con la piel.
Categoría 4	300 – 2000	Dañino si es ingerido	1000 – 2000	Peligroso en contacto con la piel
Categoría 5	2000 - 5000	Puede ser dañino si es ingerido	2000 - 5000	Puede ser dañino en contacto con la piel

*Tabla I.2* Clasificación de los pesticidas por el Riesgo de Toxicidad Aguda según los criterios de la GHS (WHO, 2009).

Una adecuada identificación de los pesticidas ofrece información completa sobre su peligro, toxicidad, composición química, letalidad, etc., como en el caso de la Clasificación Recomendada por la OMS de plaguicidas según su peligrosidad y Directrices para la Clasificación de 2009, donde se separa a los pesticidas según su peligrosidad en distintas tablas, donde se ofrece información del pesticida tal como su nombre, la categoría a la que pertenece según la GHS, su uso principal, su número de registro CAS, su número de Recomendación de las Naciones Unidas sobre el

Transporte de Mercancías Peligrosas, su estado físico, su clasificación según su composición química y DL50, *figura 1*.

**Table 2. Highly hazardous (Class Ib) technical grade active ingredients in pesticides**

Common name	CAS no	UN no	Chem type	Phys state	Main use	GHS	LD <sub>50</sub> mg/kg	Remarks
Acrolein [C]	107-02-8	1092		L	H	2	29	EHC 127; HSG 67; IARC 63; ICSC 90

**Figura 1.** Ejemplo de un pesticida (Acrolein [C]) en la Clasificación Recomendada por la OMS de plaguicidas según su peligrosidad de 2009, donde se observa información sobre su estado físico (L-Líquido), uso principal (H-herbicida, y su categoría (GHS-2) (OMS, 2009). ción Recomendada por la OMS de plaguicidas según su peligrosidad de 2009, donde se observa información sobre su estado físico (L-Líquido), uso principal (H-herbicida, y su categoría (GHS-2) (OMS, 2009).

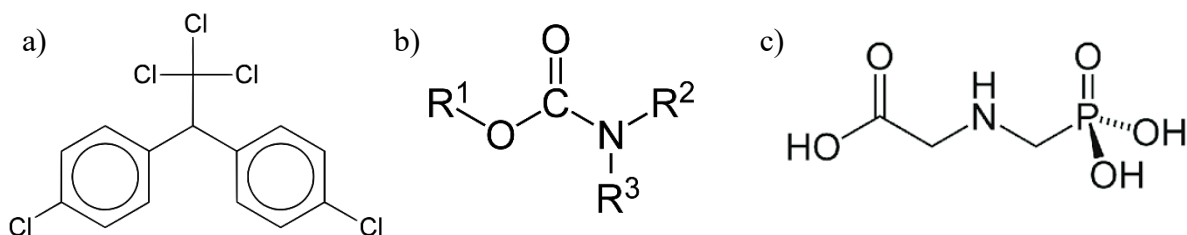
## II.1.2 Características de los pesticidas

Los pesticidas suelen ser una mezcla de sustancias químicas con un solo principio activo, aunque existen también productos comerciales que incluyen más de un principio activo, siendo estos dos y raramente tres, con la finalidad de combinar los efectos de dichos principios. Se componen además por ingredientes denominados como inertes por su ausencia de acción biocida y que funcionan como excipientes con diferentes funciones que en combinación con el o los principios activos logran una mejor efectividad, las características de los pesticidas entonces varían según su composición, por un lado, y la presentación o formulaciones de estos, si son concentrados emulsionables, soluciones, polvos, etc. (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Por un lado, los pesticidas OC, formados por átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno, *figura 2 (a)*, son muy estables en el ambiente con una alta estabilidad física y química, son insolubles en agua pero altamente solubles en disolventes orgánicos y son no volátiles, tienen una eliminación difícil tanto en el ambiente, especialmente el suelo, como en el cuerpo humano, de manera que su estructura química les facilita su persistencia ambiental y lenta biodegradabilidad siendo de los pesticidas con mayor riesgo de contaminación de los suelos, y por su alta lipofiliidad

suelen acumularse en el tejido subcutáneo de la piel (Puerto et al., 2014; Ramírez & Lacasaña, 2001).

Los pesticidas C, con un origen que los puede clasificar en derivados de esteres cabamatados, derivados del ácido tiocarbámico, o tal cual carbamatos, figura 2 (b), son compuestos relativamente inestables y con cierta selectividad, en el cuerpo humano tienen una degradación por oxidación con metabolitos finales hidrosolubles que pueden excretarse por la orina y heces (Ramírez & Lacasaña, 2001) en el ambiente debido a la degradación microbiana se generan residuos con un tiempo corto de persistencia ambiental (Puerto et al., 2014).



**Figura 2.** Ejemplos de la estructura de tres tipos de pesticidas diferentes. a) Estructura del organoclorado dicloro difenil tricloroetano conocido como DDT. b) Estructura base de todos los pesticidas carbamatos c) Estructura del organofosforado glifosato. ctura de tres tipos de pesticidas diferentes.

Por último, los pesticidas OP son ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico, fosfónico y fosfortoico, figura 2 (c), se caracterizan por una degradación por oxidación e hidrólisis, una descomposición de relativa facilidad, y con metabolitos finales solubles en agua, poco acumulables en el cuerpo humano, y menos persistentes y en el ambiente en comparación con los OC, aunque también son más tóxicos que estos (Puerto et al., 2014; Ramírez & Lacasaña, 2001).

### II.1.3 Efectos sobre la salud y toxicidad

El momento en que un plaguicida tiene un efecto tóxico sobre el cuerpo humano afectando a la salud, es cuando se superan los grados de exposición considerados como seguros, los cuales varían de la vía y sistemas expuestos, por ejemplo, la toxicidad dérmica requiere de dosis mayores que la

toxicidad aguda (Puerto et al., 2014), además de la vía de exposición la variación en los efectos negativos y la gravedad de estos, dependen de otros factores como el tiempo de exposición, la cantidad de exposiciones, el tipo de exposición, o bien el tipo de pesticida al que se expongan y la protección o medidas de seguridad que se tome cuando se expongan a estos, sin embargo por el uso extendido de pesticidas a lo largo del mundo y la contaminación y persistencia ambiental que esto conlleva, que no existe ningún segmento de la población que no haya sido expuesta a los pesticidas y a sus efectos sobre la salud (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Los plaguicidas pueden entrar al cuerpo humano 3 vías dependiendo de la presentación en que se encuentren o la dispersión de estos en el ambiente: pueden encontrarse en el aire inhalado y entrar por la vía respiratoria, pueden encontrarse en la comida o en el agua que se ingiere e ingresar por la vía digestiva, al igual que al encontrarse en estos productos pueden tener contacto piel e ingresar vía dérmica, contando también a la población que utilicen pesticidas en cualquiera de sus presentaciones (soluciones, polvos, espray, nebulizadores, etc.) sin una debida protección y generando el ingreso por las mismas vías anteriormente mencionadas (Puerto et al., 2014).

Existen varias clasificaciones de los patrones de exposición reconocibles, por un lado, se encuentra la exposición directa (ED) e indirecta (EI); la Exposición ocupacional y ambiental; y por último la exposición aguda y crónica. Estos patrones de exposición no son excluyentes entre sí, más bien pueden usarse para tener una descripción más completa de la causa de la intoxicación que sufra una población. Por ejemplo, respecto a exposición ocupacional, se hace referencia a la población que entra en contacto debido a razones de trabajo, ya sean trabajadores de la industria química que fabrican plaguicidas (mezcladores, transportistas, manufactureros, almacenistas, etc.), o los trabajadores del campo (fumigadores y quienes recogen los cultivos que fueron previamente tratados con pesticidas), este tipo de población tiene también una exposición directa, y suelen tener

una mayor probabilidad de exposición e intoxicación aguda que otros grupos de exposición, debido al contacto continuo, intenso y repetitivo durante la jornada laboral (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Por otro lado, la exposición ambiental es una fuente primordial para la exposición a plaguicidas de una población. Depende de la contaminación ambiental por pesticidas que puedan permanecer en el agua, suelo o viento a partir de la actividad agrícola, sabiendo que de los pesticidas aplicados en la industria agrícola un 47% se deposita en el suelo y agua o se dispersa en la atmósfera (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Aunque la exposición ocupacional suele vincularse a la exposición directa, también hay quienes tienen una exposición ocupacional indirecta, como lo pueden ser trabajadores en la industria química de fabricación de plaguicidas que trabajen en el área de recursos humanos, administración o sistemas, que no tienen un contacto directo pero al encontrarse en la misma área pueden tener un contacto indirecto, o bien aquellos trabajadores del campo que no tienen contacto con los cultivos, ni pesticidas, como los cuidadores de las guarderías propias de la industria agrícola (Puerto et al., 2014).

La exposición crónica es aquella exposición a bajas dosis de pesticidas por periodos de tiempo prolongado, desde distintas fuentes y por distintas vías, este tipo de exposición es la que afecta a la población general (Ramírez & Lacasaña, 2001) y tiene como consecuencia la intoxicación crónica, la cual se ve caracterizada por enfermedades o manifestaciones no localizadas y de distinto índole, generalmente degenerativo. Por su parte la exposición aguda es una exposición durante un corto periodo de tiempo y de manera más directa a los pesticidas, lo cual genera una alta ingesta o contacto con los pesticidas, provocando intoxicaciones agudas, las cuales son aquellas que tienen efectos sistémicos o localizados de manera casi inmediata a la exposición directa que ha sido dada sin una adecuada protección o por algún accidente (Puerto et al., 2014). La exposición aguda a

bajos niveles puede tener síntomas como fatiga, dolor de cabeza o de extremidades, mientras que algunos otros síntomas dependen de la vía, por ejemplo la intoxicación por vía oral suele presentar síntomas como náuseas, vómitos o diarrea, por su parte una exposición por vía respiratoria puede causar problemas directos sobre los pulmones y en casos extremos, pueden llegar a fallar órganos como el corazón, los pulmones y los riñones, llegando incluso a la muerte (Fundación Heinrich Böll et al., 2023).

La toxicidad crónica, se ve mayormente relacionada a trastornos como el cáncer, problemas reproductivos, o alteraciones del sistema neurológico, endócrino, e inmunológico (Puerto et al., 2014), existiendo múltiples estudios que aportan pruebas sobre la relación de la exposición crónica a pesticidas y el riesgo de enfermedades como el Parkinson, la leucemia, el cáncer de hígado y de mama, la diabetes tipo 2, el asma, las alergias, la obesidad y trastornos hormonales, además de que en caso de contacto con pesticidas durante embarazos se han observado anomalía congénitas y nacimientos prematuros (Fundación Heinrich Böll et al., 2023).

#### **II.1.4 Intoxicación por organofosforados.**

En el caso específico de los pesticidas OP la intoxicación se ve relacionada por el metabolismo de sus compuestos durante el cual se provoca la inhibición de enzimas, principalmente la acetilcolinesterasa (AChE) la cual se logra por una unión irreversible a las AChE encontrada en sangre, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), generando síntomas que pueden durar hasta que se regenere la enzima aproximadamente en 3 meses, aunque también pueden inhibir a la esterasa neurotóxica NTE encontrada en el cerebro, médula espinal, SNP, corazón, bazo y linfocitos provocando una intoxicación conocida como polineuropatía retardada (Pino Vázquez & Brezmes Raposo, 2021).

Los OPs actúan directamente sobre la AChE por la fosforilación del grupo hidroxilo presente en el sitio activo de la enzima, los OP pierden un grupo sulfuro, el cual es reemplazado por oxígeno formando así unión estable que puede hacerse irreversible inhabilitando de este modo a la enzima, las cuales se encuentran presentes en el sistema nervioso central, periférico, la unión neuromuscular y los eritrocitos (Saborío Cervantes et al., 2019), provocando así un efecto sobre estos debido a que la acetilcolina al no metabolizarse se acumula en las uniones colinérgicas neuroefectora, teniendo efectos muscarínicos como visión borrosa, broncoespasmo, diaforesis, náuseas, vomito, cólico abdominal, bradicardia, diaforesis etc.; en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos, teniendo efectos nicotínicos como calambres, debilidad, hiperglicemia, vasoconstricción periférica; o bien en el SNC provocando efectos sobre este mismo, como ansiedad, confusión, irritabilidad, depresión respiratoria, convulsiones, entre otros (Fernández A et al., 2010) .

Por su tiempo de efecto tras la exposición varios autores clasifican los efectos tóxicos de los OP en tres principales: crisis colinérgica inicial, síndrome intermedio y polineuropatía tardía.

En la crisis colinérgica inicial, los síntomas aparecen de minutos a horas, por una sobreestimulación de los receptores nicóticos y muscarínicos del SNC y SNP teniendo por ende síntomas muscarínicos, nicóticos y del SNC y ocasionando vómitos si es ingerida, sudoración si entro en contacto con la piel, y síntomas respiratorios u oculares si es aspirada (Saborío Cervantes et al., 2019).

El síndrome intermedio, el cual ocurre en pacientes con inhibición prolongada de la AChE (Fernández A et al., 2010) ocurre entre las 24 y 96 horas, aunque algunos autores consideran que pueden aparecer síntomas hasta el 6to día tras la exposición y puede persistir durante varios días. Se caracteriza por ausencia de síntomas colinérgicos, y presencia de debilidad y parálisis de los

músculos respiratorios como los intercostales y el diafragma pudiendo producir insuficiencia respiratoria (Pino Vázquez & Brezmes Raposo, 2021). Este síndrome es la principal causa de mortalidad por OP, esto puede deberse a que de los pacientes que sufren intoxicación por OP de un 10-40% sufren de este síndrome, y aunque las alteraciones pueden resolverse transcurridas dos o tres semanas es necesario un soporte ventilatorio adecuado durante 7 a 21 días y un tratamiento farmacológico (Saborío Cervantes et al., 2019).

Por último, la neuropatía retardada, presentada principalmente en los compuestos que contienen flúor, se produce tras 7 días o hasta 4 semanas tras la exposición al pesticida, debido a la inhibición de la NTE y al incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular por alteración de la enzima calcio-calmodulina quinasa, generando una degeneración axonal que culmina en síntomas principalmente motores, aunque también existen manifestaciones sensoriales que afecten a los músculos distales provocando debilidad, hipotrofia muscular, calambres, dolor neuropático, hipoestesia, etc., pudiendo tener una recuperación total o parcial con una adecuada rehabilitación tras 6 a 12 meses (Fernández A et al., 2010).

Vinculado a los OP se encuentra también alteraciones neurológicas crónicas inespecíficas, hepatitis, pancreatitis, insuficiencia renal aguda, acidosis metabólica, hipocalcemia, leucocitosis, (Pino Vázquez & Brezmes Raposo, 2021), lesión miocárdica que puede darse tras varios días tras la exposición debido a inflamación intersticial, miocarditis o pericarditis, y se ve manifestado en arritmia, insuficiencia cardíaca, shock cardiogénico y muerte súbita, aunque no es una causa importante de mortalidad asociada a OP, la lesión al miocardio puede venir en conjunto con disritmias ventriculares, prolongación del periodo QTc y Torsade de Pointes (Orias-Vásquez, 2020). Además, existen varios estudios que muestran evidencia para asociar la exposición crónica a OP con enfermedades psiquiátricas y síntomas extrapiramidales como psicosis, ansiedad,

alucinaciones, agresividad, trastornos del desarrollo psicomotor en niños (Fernández A et al., 2010).

### **II.1.5 Factores de riesgo de exposición durante el uso de pesticidas.**

Existen diversos factores de riesgo de exposición durante el manejo y uso de pesticidas, los cuales pueden variar según el país, pues en países de ingresos altos no solo es menor el porcentaje de población trabajando en la agricultura a comparación de los países de ingresos bajos donde la población dedicada a la actividad agrícola suele ser superior, si no que la educación limitada, la pobreza, la poca capacidad institucional para formar a los agricultores y la poca exigencia para hacer cumplir la legislación sobre plaguicidas suelen ser los factores que más se observan en los países de bajos ingresos lo cual suele crear situaciones donde la población trabajadora se expone a mayores riesgos al momento de realizar actividades relacionadas a los pesticidas (FAO,OMS, 2019) , estos problemas se magnifican al considerar que la población expuesta a mayores niveles de pesticidas ambiental y ocupacionalmente en los países de recursos bajos o medios, como lo puede ser México, suelen ser en gran parte grupos vulnerables de bajos recursos o con educación limitada los cuales necesitan de una adecuada capacitación sobre el uso de compuestos químicos y especialmente sobre la prevención de accidentes laborales (Herrera Moreno et al., 2018b).

Por otro lado, los países de bajos ingresos tienen mayor dificultad para adquirir equipos de protección personal especialmente el equipo usado para los PAP, esto debido a los altos costos o que no se encuentran disponibles en los países, por ellos se suelen adquirir equipo de protección de baja calidad o no apropiados para los plaguicidas que se utilizan. Algo similar ocurre en el caso de los equipos de aplicación que suelen ser menos sofisticados en los países de ingresos bajos y medios o no están regulados, lo cual puede afectar la calidad de estos. El costo de ambos tipos de equipo (de protección y aplicación), puede generar situaciones como impedir el reemplazo

oportuno equipo dañado, un mantenimiento nulo o inadecuado y un almacenamiento no apropiado para la seguridad, propiciando así un equipo en mal estado con fugas o mala calibración en el caso de los equipos de aplicación (FAO,OMS, 2019).

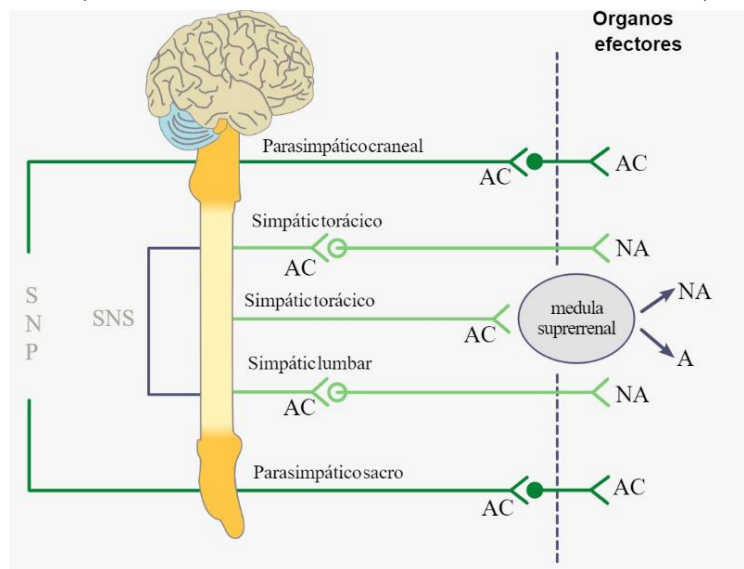
Si bien existen legislaciones que hacen responsables a las empresas que contratan a los trabajadores agrícolas expuestos a los pesticidas a brindar capacitación, instalaciones apropiadas para la higiene, material de trabajo y protección con un mantenimiento pertinente, diversos estudios evidencian la falta de cumplimiento de muchas empresas a sus responsabilidades con los trabajadores en distintas áreas de México. Por ejemplo, un estudio realizado en 2019 en los Altos de Chiapas encontró que no se dio capacitación formal sobre el manejo de plaguicidas a los trabajadores los cuales tienen conocimiento sobre el uso de pesticidas a partir de familiares, conocidos o por observación, desconociendo una gran parte de los usuarios el significado de los colores de las etiquetas de los productos (Bernardino-Hernández et al., 2019) mientras que en otro estudio realizado en 2019 en la Comarca Lagunera, también en México, denotó que menos de la mitad de los trabajadores que participaron en el estudio habían recibido capacitación sobre el uso de agroquímicos (Esquivel-Valenzuela et al., 2019), y respecto a la protección en ambos estudios se demostró que el equipo usado no era adecuado, siendo que en el estudio de Chiapas la mayoría de trabajadores no portan ninguna clase de protección usando ropa cotidiana y quienes si lo hacen utilizan bolsas de plástico en sus manos y espalda, algunos pocos usan pañuelos para cubrir su boca, o botas de plástico, mientras que las mujeres en el área de SPH utilizan falda de lana y sandalias de plástico siendo ocasionalmente alguna la que utilice botas de plástico, mientras que en el estudio de la Comarca lagunera solo el 25% de los trabajadores cuentan con equipo de protección personal, sin embargo el 100% aplica pesticidas sin dicho equipo debido a la incomodidad que estos le proporcionan (Bernardino-Hernández et al., 2019; Esquivel-Valenzuela

et al., 2019). Finalmente, respecto hábitos se encontraron algunos saludables como lavarse las manos después de preparar y/o aplicar plaguicidas, cambiar su ropa y bañarse después de la jornada de trabajo eran habituales al mismo tiempo que lo era el consumo de los alimentos cerca de la parcela, que algunos trabajadores laven su ropa de trabajo sucia una o dos veces por semana, y otros duerman con su ropa de trabajo si se quedaban en las parcelas siendo estos hábitos, encontrados en ambos estudios, los que exponen mayormente a los plaguicidas aumentando el riesgo de intoxicación. El resultado de estas prácticas es evidente cuando se encontró que al menos 3 de cada 10 agricultores de la Comarca lagunera han tenido una intoxicación por plaguicidas, y el 50% de floricultores y 20% de agricultores de los Altos de Chiapas han experimentado al menos cuatro síntomas de intoxicación aguda por pesticidas (Bernardino-Hernández et al., 2019; Esquivel-Valenzuela et al., 2019).

## II.2 Sistema nervioso y cognición

### II.2.1 Sistema nervioso colinérgico y neurotransmisión

El termino colinérgico se relaciona directamente con la acetilcolina, de manera que el sistema colinérgico hace referencia a todas las estructuras que participan en la síntesis, secreción y eliminación y reabsorción de la acetilcolina, entre los cuales se encuentran la acetilcolina, la



**Figura 3.** Distribución de las neuronas colinérgicas (AC) y adrenérgicas (NA) en el Sistema nervioso parasimpático (SNP) y sistema nervioso simpático (SNS). (Costa, 2005).

enzima acetiltransferasa de la colina o acetilcolintransferasa (AChT), la enzima acetilcolinesterasa o esterasa de acetilcolina (AChE), los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR), así como las estructuras celulares que contienen estas enzimas y receptores. La acetilcolina (ACh) es uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso autónomo, y es el principal neurotransmisor excitatorio de la porción no esfinteriana del Sistema Nervioso Enterérico, entre las actividades relacionadas a la ACh esta la contracción muscular donde se incluye el peristaltismo, la secreción de agua y electrolitos y el estímulo de las células gástricas (Costa, 2005).

Forman parte del sistema colinérgico el sistema nervioso parasimpático por completo, las uniones neuromusculares, las neuronas preganglionares tanto del sistema nervioso simpático como parasimpático, *figura 3*, (Costa, 2005) y ciertos componentes del cerebro como neuronas colinérgicas y vías cerebrales, y de la médula espinal, como neuronas. Las neuronas colinérgicas son muy variadas tanto en distribución como en morfología, existen como interneuronas (neuronas de axones cortos) en el estriado donde establecen relación funcional con las neuronas dopaminérgicas (relacionadas con la dopamina, neurotransmisor adrenérgico), en los núcleos de los pares craneales y en la médula espinal. Existen múltiples vías cerebrales colinérgicas, *figura 4*, algunas más difusas que otras, como las de axones largos. Una de las vías que tiene mayor importancia, pues influye en el sistema de recompensa, sale de la base del cerebro anterior, con cuerpos celulares que se encuentran en el septum, la banda diagonal de Broca, pallidum ventral y núcleo basal de Meynert, se extiende hasta el bulbo olfativo, corteza e hipocampo, y una afectación sobre esta vía puede provocar disfunciones cerebrales como demencia, alguna variante de Parkinson, y Alzheimer. Otra segunda vía cerebral de la cual se discute la relevancia en enfermedades neurodegenerativas, tiene sus cuerpos neuronales ubicados en la zona del

mesencéfalo y del núcleo tegmental lateral, los axones de esta vía inervan el tálamo hipotálamo y todos los núcleos del cerebro medio, la habénula (Flores Soto, 2005).

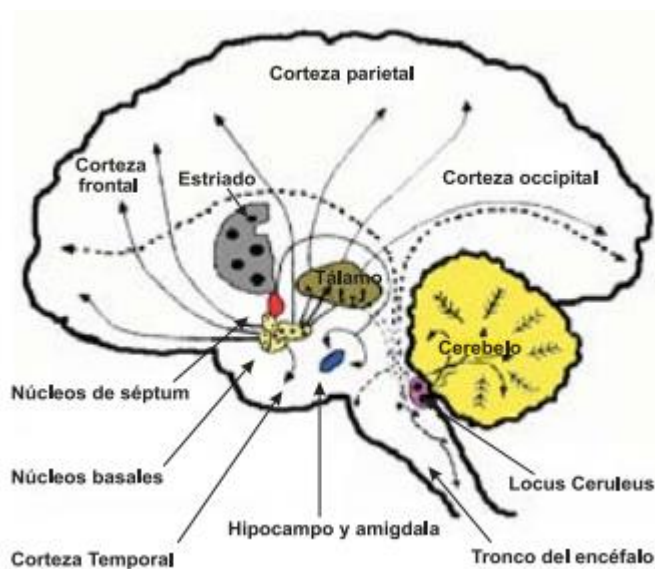
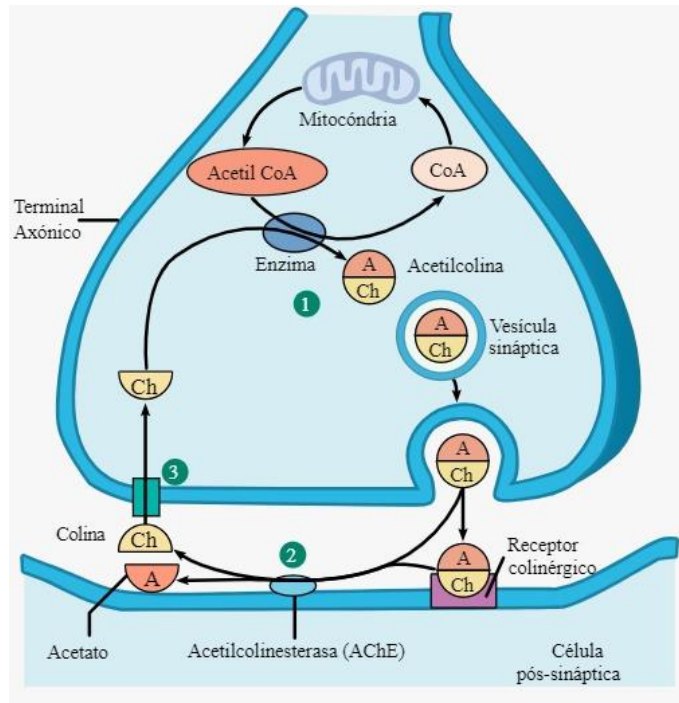


Figura 4. Distribución de las distintas vías cerebrales colinérgicas. (Flores Soto, 2005).

La síntesis de la acetilcolina ocurre en la terminación presináptica, mediante la acetilación de la colina con acetil-coenzima A (acetil-CoA), dicha ocurre gracias a la enzima AChT. Esta reacción se da en su mayor parte en el axoplasma, y posterior a la síntesis, la ACh es transportada a las vesículas donde se almacena hasta su liberación al espacio sináptico, donde puede actuar sobre sus receptores, lo cual permite la inducción cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica según el receptor y la forma en que se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción, o puede ser eliminada por medio de una hidrólisis catalizada por la enzima acetilcolinesterasa AChE, la cual se encuentra presente en la hendidura sináptica, generando iones de acetato y colina,. Esta colina es transportada en su mayor parte hacia el interior de la neurona presináptica mediante

transporte activo para ser reutilizada para sintetizar más ACh, *figura 5*, aunque una parte mínima se difunde hacia líquidos vecinos y plasma donde se metaboliza por una colina esterasa plasmática conocida como pseudo-colinesterasa (Costa, 2005; Flores Soto, 2005).



**Figura 5.** (1) Síntesis de la ACh a partir de colina y acetil-CoA. (2) Hidrólisis de la ACh por medio de la AChE. (3) Reutilización de la colina (Ramón Vielma-Guevara et al., 2022).

Los receptores de ACh que se encuentran en la membrana postsináptica se pueden dividir en dos tipo: los receptores nicotínicos o canales operados por ligando, encontrados en uniones sinápticas de neuronas pre y postgangliares tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático, los cuales permiten la apertura de canales iónicos al unirse el neurotransmisor, su actividad consiste en dejar entrar a una gran cantidad de iones lo cual genera un cambio en el potencial de membrana generando una respuesta celular inmediata, cuando estos receptores son estimulados se producen respuestas excitatorias de ambos sistemas en donde se encuentra (simpático y parasimpático) aunque predomina el efecto simpático como hipertensión y taquicardia por la liberación de adrenalina y noradrenalina de la médula suprarrenal; y los receptores tipo muscarínicos, encontrados en neuronas postgangliares del sistema nervioso parasimpático del corazón y del músculo liso de todo el organismos los cuales interactúan con las proteínas unidas a nucleótidos de guanina, es decir, proteínas G, este tipo de receptores tienen una gran variedad de acciones intracelulares según el tipo de proteína G con la que estén acoplados como activación/inhibición de diversas vías de mensajeros intracelulares o segundos mensajeros, la estimulación de estos

receptores produce bradicardia, broncoconstricción, miosis, salivación, hipermotilidad gastrointestinal junto a un aumento de secreción de ácido gástrico entre otras cosas (Costa, 2005; Flores Soto, 2005).

## **II.2.2 Colinesterasas: Acetil y butirilcolinesterasa**

Las colinesterasas son enzimas tipo esterasas que se encargan de hidrolizar las uniones ésteres de la acetilcolina con la finalidad de evitar una posible desensibilización del receptor por una presencia mantenida. Existen dos tipos de colinesterasas en el cuerpo: la acetilcolinesterasa AChE que se encuentra en las sinapsis colinérgicas (ganglios, placas neuromotoras) a nivel presináptico y postsináptico además de en eritrocitos, por otro lado, la butirilcolinesterasa BChE, principal colinesterasa en células gliales cercanas a la sinapsis, conocida también como pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa tipo S (Fernández Prieto et al., 2011; Sanabria et al., 2017).

La AChE se sintetiza en el músculo bajo la placa terminal y se segrega desde el músculo permaneciendo unida por filamentos de colágeno a la membrana basal, puede encontrarse como forma simple (monómeros, dímeros y tetrámeros) unidas a la membrana plasmática de la placa motora, mientras que las formas complejas (tres tetrámeros unidos por un filamento) se encuentra en la lámina basal externa de la sinapsis (Fernández Prieto et al., 2011). Tiene una alta actividad catalítica siendo capaz de degradar aproximadamente 25 mil moléculas de ACh por segundo, un proceso que se divide en dos etapas, primero se forma un intermediario acil-enzima por una unión covalente entre el grupo acilo y la serina del centro activo, luego se libera el grupo acilo (López-Durán et al., 2018).

Además del papel de la AChE de inactivar a la ACh para finalizar los impulsos de la neurotransmisión y facilitar el control temporal de la contracción muscular se ha encontrado que esta enzima tiene influencia en diversas funciones celulares, como la apoptosis o la regulación

celular (López-Durán et al., 2018). Park y compañía en 2004 y 2008 con sus experimentos sobre la apoptosis encontraron que la regulación positiva de la AChE es observable en la apoptosis, donde la AChE tras la interacción con la caveolina-1 interacciona con el citocromo C para la formación del apoptosoma, observando que en células donde no se haya formado la interacción AChE-caveolina-1 no se formó apoptosoma y que durante la apoptosis los niveles de AChE se ven incrementados (Park et al., 2008); En 2008 Xiang y compañía estudiando la proliferación celular del células del intestino encontraron que durante la fase del ciclo celular M la AChE se ve regulada positivamente, brindando evidencia de la relación entre la expresión de esta enzima con la diferenciación celular así como la importancia de su actividad enzimática observando que la AChE puede mejorar la proliferación por su sobreestimulación en los receptores colinérgicos (Xiang et al., 2008).

La BChE se sintetiza en exceso los hepatocitos y está presente en la mayoría de tejidos exceptuando los eritrocitos, tiene una vida media de 3 a 16 días, tiene un peso molecular mayor al de la AChE, y cada subunidad de la enzima está formada por 574 aminoácidos y 9 cadenas de carbohidratos, y se ve incluida en el metabolismo de distintos fármacos (Fernández Prieto et al., 2011). Esta enzima se encarga de catalizar esteres de colina como la butirilcolina, la succinilcolina y como se ha mencionado anteriormente, la acetilcolina, aunque la hidrólisis de esta se realiza con menor eficacia que la AChE, en una situación en la que la actividad de la AChE se vea deficiente la BChE puede compensar algunas de sus funciones relacionadas con el sistema colinérgico. Si bien pueden existir personas que tengan variantes de BChE que sean incapaces de catalizar los esteres de colina, estos no muestran alteraciones fisiológicas, por lo cual se llegó a pensar en un pasado que la enzima no tenía un papel biológico establecido, aunque en la actualidad se sabe que en un paciente que exprese la BChE de manera regular, si se inhibe esta enzima ocurre un aumento

en los niveles de acetilcolina, por lo cual se considera que tiene ciertas funciones de filtro, colaborando con la eliminación del exceso de ACh en las uniones nerviosas. Se considera también que la BChE puede hidrolizar algunos compuestos con capacidad anticolinesterásica, evitando que estos lleguen a la AChE de sitios fisiológicos de mayor importancia, preservando así la integridad de la AChE (López-Durán et al., 2018).

### **II.2.3 Colinesterasas como blanco de los pesticidas.**

Los plaguicidas OP y carbamatos funcionan por la inhibición de las colinesterasas en las terminaciones nerviosas, lo cual genera una acumulación de la ACh en la hendidura sináptica produciendo una sobreestimulación de los receptores colinérgicos alterando la función nerviosa del individuo afectado (Carlock et al., 1999).

Debido a este efecto directo de los pesticidas sobre la AChE se ha considerado la actividad de esta enzima como el principal biomarcador sanguíneo del efecto de los pesticidas, esto debido a que no existe un biomarcador de exposición que se pueda determinar en sangre pues los compuestos de los pesticidas son hidrolizados rápidamente y el valor diagnóstico de la determinación en orina no ofrece información sobre la magnitud de la exposición, de manera que para la exposición crónica y a bajas dosis se mide la actividad de la AChE eritrocitaria y para la exposición aguda se prefiere la medición de la BChE en suero o plasma (Medina et al., 2015).

Debido a la gran cantidad de estudios que se han hecho sobre la intoxicación por pesticidas y la actividad de las colinesterasas, se ha establecido una relación entre la inhibición de la AChE y los efectos de la salud, por ejemplo, una inhibición del 50-60% de la actividad se asocia a síntomas ligeros, debilidad, dolor de cabeza, náusea, asociado a un patrón dosis-respuesta, mientras que una inhibición del 60-90% produce síntomas más agresivos como vómito, sudoración, diarrea, temblores, dolor en peso y cianosis en distintas membranas mucosas, mientras que una inhibición

del 90-100% de la AChE produce una falla cardiaca o respiratoria que lleva a la muerte (López-Durán et al., 2018).

#### **II.2.4 Importancia y función del sistema colinérgico**

La actividad colinérgica es fundamental para las funciones cognitivas, esto puede relacionarse con la presencia de neuronas colinérgicas en distintas áreas del cerebro, ya que estas neuronas forman un sistema ascendente con origen en el tronco cerebral y que intercepta hasta distintas áreas de la corteza cerebral. Es sabido, además que la acetilcolina interviene en la memoria y la percepción del dolor (Sanabria et al., 2017).

Se ha encontrado también que el sistema colinérgico tiene relación con el sistema de aprendizaje por refuerzos. Los núcleos colinérgicos del tronco encefálico (núcleo pedunculopontino y núcleo tegmental laterodorsal), asociados típicamente uno a funciones motoras y de excitación y el otro con el sistema de recompensa y transmisión límbica, tienen efectos en subconjuntos de neuronas del área tegmental ventral (ATV) debido a que ambos núcleos se proyectan ampliamente a lo largo de esta área. Esto es relevante pues en el ATV existen neuronas dopaminérgicas que tienen relación con las conductas dirigidas a objetivos y aprendizaje de refuerzo (con el cambio en el modo de disparo de las neuronas dopaminérgicas se desencadena el impulso excitatorio fundamental para la conducta orientada a recompensas), y se ha encontrado que las dos vías colinérgicas del ATV cuando se estimulan se produce una modulación lenta de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas y dicha modulación cambia el comportamiento de ráfaga de las neuronas dopaminérgicas según la vía colinérgica que sea estimulada, siendo que ambas vías transmiten una señal de refuerzo pero tienen funciones opuestas en la locomoción, dichas diferencias pueden ser la base neuronal de la prominencia y recompensa a nivel de las neuronas colinérgicas, esto demuestra la importancia de las neuronas colinérgicas para la modulación de la

función de las neuronas dopaminérgicas y por ende para los circuitos de recompensa y el aprendizaje por recompensa (Dautan et al., 2016).

Existe también cierta relación entre el sistema colinérgico y el sistema visual, esto principalmente por la intervención de la ACh para el procesamiento de la información visual, regulando algunas funciones como la percepción visual o la sensibilidad al contraste. Por un lado, la plasticidad de la corteza visual se ve influenciada especialmente por los receptores nicotínicos de la acetilcolina y de proteínas reguladoras de estos receptores, así como varias áreas extraestriadas reciben información colinérgica para la reestructuración de circuitos nerviosos en la plasticidad visual (Durán-Cristiano, 2022). Por otro lado, la ACh puede disminuir el tamaño del campo receptivo excitatorio y por ende, la propagación de la excitación en la corteza visual en animales, y estudios como el de Silver y compañía, muestran que cuando en un humano se aumentan los niveles de ACh en humanos la propagación espacial de las respuestas excitatorias en la corteza visual se ven disminuidas al igual que en los animales, aunque aún no se conoce de manera específica los efectos de la integración espacial cortical visual reducida por ACh sobre la percepción visual se puede predecir por datos fisiológicos que la reducción en las proyecciones intracorticales laterales en la corteza visual debe perjudicar el rendimiento en tareas dependientes de la integración a través del espacio visual, como la percepción de texturas o la agrupación perceptiva (Silver et al., 2008).

Recordando la importancia de la implicación de la AChE para la regulación del ciclo celular y la proliferación, el sistema colinérgico en general tiene influencia sobre el proceso de eritropoyesis. Este proceso se ve principalmente influenciado por la nicotina y los nAChRs: se ha mostrado, tanto en modelos de ratones como modelos in vitro, que existe un efecto promotor en la formación de hemangioblastos durante las primeras etapas de desarrollo de los embriones provocado por la nicotina, aunque después del parto el número de células madre hematopoyéticas en la médula ósea

disminuye en los fetos expuestos a nicotina a comparación de fetos no expuestos, lo cual sugiere una colonización deficiente de la médula ósea fetal en células madre hematopoyéticas. Por último, se encontró que la estimulación de los nAChR interfiere en la producción de citocina afectando el sistema (Serobyán et al., 2007).

Con respecto al desarrollo cognitivo, el sistema colinérgico tiene gran influencia en diferentes aspectos, como la memoria, neurogénesis hipocámpal, fuerza sináptica y la plasticidad mediante vías no solo neuronales, si no también inmunológicas. La ACh puede actuar a través de vías antiinflamatorias periféricas o centrales suprimiendo la sobre activación de los macrófagos periféricos o la microglía central, sabiendo que la sobre activación de la microglía produce un exceso de citocinas inflamatorias y que esto es adverso a la memoria, prevenir esta sobreestimulación ayuda a prevenir el deterioro de la memoria inducido por inflamación. Por otro lado, la plasticidad se modula por la ACh a través del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual se ve regulado positivamente por la exposición crónica a la nicotina y disminuido con la pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, aunque existe cierta evidencia que demuestra que el BDNF también se ve modulado por la microglía y la unión de esta con ACh. Este tipo de procesos afectan a gran escala no solo la neuroplasticidad, si no que la memoria, y pueden ayudar a comprender los procesos de deterioro de la memoria relacionado a la edad o trastornos neurodegenerativos (Maurer & Williams, 2017).

## **II.3 Deterioro cognitivo**

### **II.3.1 Deterioro cognitivo y sus efectos**

El concepto de deterioro cognitivo es un concepto ambiguo y algo obsoleto considerándole por mucho tiempo como la condición en la que se ve afectado al menos uno de los dominios cerebrales de un individuo (funciones ejecutivas, atención, lenguaje, memoria y habilidades visual espaciales)

con un grado mayor al adecuado para su edad sin comprometer su incorporación y desarrollo de actividades básicas de la vida diaria, cosa contrario a la demencia, donde este tipo de actividades si se ven afectadas (Rojas, 2019), aunque con el avance en los estudios conceptos que tocan el deterioro cognitivo y la demencia se estandarizarían y definirían de mejor manera clasificando este tipo de trastornos en dos: el trastorno neurocognitivo mayor, antiguamente conocido como demencia, siendo este un deterioro cognitivo significativo en los dominios, donde se interfiere con la independencia de los individuos en actividades cotidianas; y el trastorno neurocognitivo menor, antiguamente conocido como deterioro cognitivo leve, el cual es un deterioro cognitivo leve o moderado a los dominios en los cuales no hay interferencia en la independencia de las actividades cotidianas pese a que estas requieran de mayor esfuerzo, tiempo, y estrategias compensatorias (Choreño-Parra et al., 2020).

### **II.3.2 Pruebas diagnósticas**

Para determinar que un individuo tiene un trastorno con deterioro cognitivo debe existir una documentación hecha a través de una evaluación neuropsicológica objetiva, entre las cuales existen varias de distintos tiempos y con diferentes niveles de sensibilidad y especificidad, siendo el minimal state examination (MMSE) la prueba más usada por su sencillez de aplicación, corto tiempo de realización y alta sensibilidad, pudiéndose realizar en un consultorio general a diferencia de otras pruebas que requieren de un especialista en neuropsicología (Choreño-Parra et al., 2020). Si bien la Sociedad Americana de Neurología está de acuerdo con la utilización de pruebas psicométricas breves como la anterior mencionada como una práctica clínica cuando se sospecha de un deterioro cognitivo es necesario recordar que se obtiene un diagnóstico de sospecha en conjunto a una historia clínica y que los resultados no pueden afirmar o excluir completamente la presencia de deterioro cognitivo leve o grave debido a la sensibilidad y especificidad de cada

prueba (Benítez Del Rosario, 2002), siendo importante hacer uso de más de una prueba para confirmar o dudar de los diagnósticos y tener evaluaciones más completas de los individuos y los distintos dominios que podrían o no, verse afectados, así como hacer evaluaciones de seguimiento tanto para pacientes diagnosticados como para pacientes no diagnosticados que insistan en sospechas de un padecimiento que afecta la cognición (López Trigo et al., 2014).

Dentro de los exámenes que se pueden realizar están las pruebas muy rápidas como: el Test del reloj, con una sensibilidad que oscila entre 67-97% y una especificidad entre 69-94%; el mini-cog, test de aproximadamente 2 minutos, con una sensibilidad de entre 76-99% y una especificidad de 85-96%; el test de fluidez verbal, que se enfoca en la habilidad de nombrar objetos por categoría o con una determinada letra (Rojas, 2019). Estas pruebas son especialmente útiles para tener una aproximación secuencial (López Trigo et al., 2014).

Dentro de las pruebas cognitivas rápidas se encuentran el MMSE, el cual se puede completar en 8 minutos, recomendado para personas con una educación de al menos 8 años, y como se mencionó con anterioridad es de las pruebas más utilizadas. Por su parte el Montreal Cognitive Assessment (MoCA) al poder realizarse en 10 minutos puede encasillarse dentro de estas pruebas (López Trigo et al., 2014; Rojas, 2019), pero se diferencia al MMSE en parte porque esta prueba debe ser aplicada por un neuropsicólogo y por su capacidad para evaluar distintos dominios cognitivo de forma separada por su secciones de corta duración donde cada una se utiliza para evaluar la memoria, orientación, lenguaje, atención, funcionamiento ejecutivo, y habilidades visoespaciales tiene la sensibilidad suficiente para diagnosticar la demencia en sus fases iniciales por lo cual es recomendado también para paciente con sospecha de deterioro neurocognitivo menor (Choreño-Parra et al., 2020).

Existen también las baterías neuropsicológicas, entre las que se encuentra el examen cognitivo de Cambridge (CAMCOG), que incluye 8 áreas a evaluar y tiene una sensibilidad de 82% y una especificidad del 96%, y una duración de aproximadamente de 30 minutos puede valorar a los pacientes con deterioro cognitivo leve y superior, aunque esta evaluación no se encuentra validada para el español. Por su parte la revisión cognitiva de Addenbrooke incluye 5 dominios y tiene una sensibilidad de 95% con una especificidad de 89% (López Trigo et al., 2014; Rojas, 2019).

Por su parte, el Trail Making Test (TMT) es un instrumento que cae dentro de las pruebas cognitivas muy rápidas, y funciona para evaluar la atención, la función ejecutiva, y las habilidades visoespaciales por el escaneo visual y la velocidad grafomotora, diseñada inicialmente como una prueba de atención dividida consta de dos partes, la A donde se mide la atención sostenida y la B que mide el funcionamiento ejecutivo (Meneses-Meneses et al., 2023). Este test ha demostrado sensibilidad para detectar el deterioro cognitivo, sin embargo, existen antecedentes de diferencias entre los datos normativos de diferentes países incluso si se estandarizan por edad o educación pudiendo generar errores de diagnóstico, debido a esto existen diversos estudios que determinan sus promedios referenciales para diagnóstico por medio del TMT según el género, la edad y nacionalidad de los participantes, llegando incluso a tener diferentes baremos para un mismo país según la zona, y actualizándolos de manera constante para tener resultados confiables (Margulis et al., 2018). Si bien existen estudios como el de Margulis, Squillace y Ferreres para ciertas áreas de Argentina, el de Meneses, Flores Paredes y Victoria Poenitz en 2023 para Ecuador, entre otros muchos estudios, existe uno que destaca por ser el primer análisis que creó normativas para el TMT en más de un país Latinoamérica consiguiendo casi 4 mil individuos de México, Perú, Paraguay, Honduras, Cuba, Puerto Rico, Bolivia, El Salvador, Chile, Argentina y Guatemala creando normativas para cada país con ajustes según el nivel de educación y la edad, consiguiendo

además de estas normativas, modelos de regresión lineal que explicaron la varianza del para ambas partes (Arango-Lasprilla et al., 2015).

### **II.3.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro**

Las neurotrofinas o factores neurotróficos son una familia de proteínas de carácter básico con un tamaño molecular que les impide atravesar la barrera hematoencefálica. Formados principalmente por 5 factores los cuales son el nerve growth factor (NGF) conocido en español como el factor de crecimiento nervioso el cual fue el primero en ser aislado y caracterizado, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que al aislarse y clonarse se encontró una gran similitud estructural con el NGF dando pie al concepto de la familia de las neurotrofinas, y las neurotrofinas NT-3, NT-4 y NT-5 (Zazpe & Río, 1997).

La importancia de los factores neurotróficos radica en su papel en la supervivencia de neuronas en el sistema nervioso en desarrollo, así como la promoción de la supervivencia de neuronas tras una lesión, encontrando incluso en modelos animales que protegen a las neuronas de enfermedades causadas por toxinas considerando el uso de estas proteínas para tratar enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la NGF que ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento contra el Alzheimer, así como al modificar la estructura de los factores neurotróficos facilitando su transporte y otorgando la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica logran ser útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, por ejemplo, el BDNF ha demostrado en un modelo animal al ser conjugado con un anticuerpo antitransferrina puede otorgar neuroprotección en la isquemia cerebral transitoria focal (Skaper, 2017).

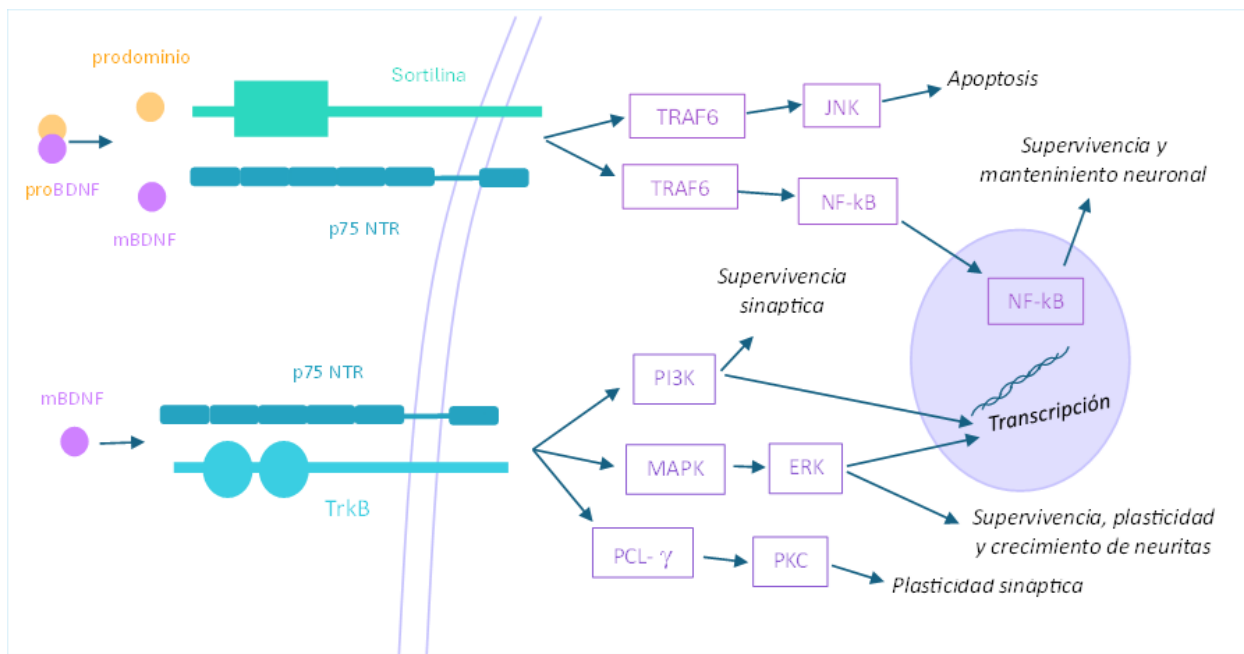
El BDNF se ha encontrado en varias partes del cerebro, incluyendo el hipocampo, la corteza, el hipotálamo, el mesencéfalo, prosencéfalo basal y la medula espinal, siendo sintetizado como su forma precursora (pro-BDNF) en el retículo endoplasmático, moviéndose a través del sistema de

Golgi y de la red trans-Golgi (Bathina & Das, 2015), madurando a su forma activa biológicamente (m-BDNF) intracelularmente gracias a la furina o a enzimas proconvertasas, o secretándose por medio de vesículas en su forma pro-BDNF la cual puede interactuar con el receptor pan-neurotrofinas p75 NTR o bien madurar extracelularmente gracias a la proteasa plasmina (Noble et al., 2011). Al contar con diversas etapas, este proceso de síntesis y maduración genera diversas isoformas del precursor que interactúan con varios receptores generan la activación de diversas vías de señalización que participan en procesos como la plasticidad sináptica, la protección y regeneración tras una lesión y el desarrollo cerebral, entre otras funciones, *figura 6* (Colucci-D'amato et al., 2020).

La unión de pro-BDNF a receptores específicos genera vías de señalización que promueven la apoptosis o supervivencia neuronal razón por la cual es capaz de mediar la poda sináptica del cerebro prenatal. Cuando el dominio maduro se une a p75 NTR se inicia la vía mediada por serina/treonina-proteína quinasa 2 (RIP2) y el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6) activando el factor nuclear kappa B (NF-kB), la activación de este última promueve la supervivencia y el mantenimiento neuronal. Por otro lado, el pro-dominio puede interactuar con el receptor de sortilina formando el complejo pro-BDNF-p75 NTR-sortilina, iniciando cascadas de señalización que conducen a la activación de la quinasa amino terminal c-Jun (JNK) la cual está involucrada en la apoptosis neuronal (Colucci-D'amato et al., 2020).

El m-BDNF se une activando al receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB), encontrado en terminales pre y post sinápticas, esta activación lleva a la dimerización del TrkB y a su posterior autofosforilación, iniciando 3 principales cascadas de vías de señalización siendo estas la fosfolipasa C (PLC- $\gamma$ ), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) parte de la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), (Cunha

et al., 2010; Rodríguez Serrano, 2016). Cada vía de señalización activada está relacionada a alguna función, por ejemplo la vía con PLC- $\gamma$  activa la proteína quinasa C (PKC) la cual se ve relacionada con la mejora de la plasticidad sináptica; la vía relacionada a PI3K mejora el crecimiento y la ramificación dendríticas, además que tiene una actividad pro supervivencia modulando la plasticidad sináptica dependiente del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA); por último la cascada relacionada a la MAPK regula la síntesis de proteínas durante la diferenciación neuronal, además de ser crucial para la síntesis de proteínas del citoesqueleto, y teniendo una acción similar a la vía PI3K (Colucci-D'amato et al., 2020).



**Figura 6.** Vías de señalización, simplificadas, desencadenadas por la BDNF y su importancia neurológica. El mBDNF activa por medio de la enzima TrkB 3 principales rutas de señalización que promueven la supervivencia de la neurona, la plasticidad sináptica y la transcripción de proteínas para el citoesqueleto. El proBDNF puede activar dos rutas de señalización por medio de la enzima p75 NTR y el complejo con sortilina, una ruta induce a la supervivencia y mantenimiento neuronal mientras la otra induce a la apoptosis.

Por estas vías de señalización es que se explica la implicación del BDNF en la plasticidad sináptica y la neurogénesis, cosa que se ha demostrado en estudios in vivo donde tras la aplicación de BDNF en modelos de trauma del sistema nervioso central se observaba supervivencia neuronal y

neurogénesis del hipocampo, así como otro estudio en ratos demostró que la aplicación de BDNF a secciones del hipocampo fue capaz de restablecer la polimerización de actina espinal, además se ha encontrado BDNF en otros tejidos como el cardíaco donde tiene funciones similares y con estudios en modelos murinos se ha encontrado que el BDNF es capaz de promover la neovascularización terapéutica, la apoptosis de células endoteliales y músculos lisos vasculares, y contribuir a la relajación vascular. También se han encontrado relaciones entre el BDNF y la regulación metabólica, encontrando una correlación entre el colesterol de baja densidad, los triglicéridos, el colesterol total (Bathina & Das, 2015).

Los niveles de BDNF se pueden ver afectados por diferentes causas. Se ha encontrado que las dietas altas en grasas han disminuido los niveles de DBNF hipotalámico en ratas, aunque no los de TrkB, así como una dieta alta en calorías aumentó los niveles de TrkB, pero no los de DBNF. Por otro lado, tanto los niveles de BDNF como los de su receptor se ven afectados por la edad, encontrando en modelos murinos que tras el nacimiento se lleva a un pico máximo y se mantiene con niveles elevados hasta que va disminuyendo con la edad, teniendo reducciones extremas en las últimas etapas de vida de los ratones, aunque se ha encontrado que el declive relacionado con la edad puede prevenirse o ralentizarse en ambientes enriquecidos que permitan una continua exploración así como actividad física, en el caso de los ratones siendo un entorno abierto con juguetes (Noble et al., 2011). Por último, se ha visto que, en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar o enfermedad de Huntington existe una disminución significativa de la expresión del BDNF (Bathina & Das, 2015).

## **II.4 Genotoxicidad**

### **II.4.1 Genotoxicidad e impacto clínico**

El término de genotoxicidad es bastante amplio, al referirse a cualquier efecto o cambio nocivo en el material genético sin tomar en cuenta el mecanismo o factor que produzca dicho cambio (Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios CEMAR, 2024), los factores que generan dichos cambios son conocidos como sustancias/factores/agentes genotóxicos, los cuales actúan alterando la estructura del ADN, el contenido de información o la segregación cromosómica por diferentes mecanismos. Existen dos tipos de agentes genotóxicos, los reactivos a ADN que por medio de uniones covalentes al ADN causan daño a este, y los agentes no reactivos al ADN los cuales activan mecanismos que generan daño indirectamente, el daño inducido por cualquiera de los agentes genotóxicos debe repararse a tiempo para evitar que al replicarse el ADN se generen mutaciones (Menz et al., 2023).

Si bien todas las células pueden pasar por mutaciones espontáneas, estas mutaciones son de tipo puntuales al alterarse una sola base de la cadena de ADN lo cual puede generar resultados beneficiosos, indiferentes o perjudiciales dependiendo de la posición de la base que se vea afectada (Capó & Frejo, 2007). En el caso de las mutaciones no espontáneas, es decir, aquellas generadas por la influencia de algún agente genotóxico, se pueden clasificar según en: mutaciones genéticas, como cambios de bases individuales, pequeños reordenamientos o inserciones/eliminaciones de nucleótidos en la secuencia; aberraciones cromosómicas estructurales, las cuales implican clastogenicidad, es decir, el reordenamiento, rotura o pérdida de segmentos cromosómicos; y, por último, las aberraciones cromosómicas numéricas, siendo estas las que impliquen la aneugenicidad, es decir, la ganancia o pérdida de un cromosoma completo, afectando así la cantidad de cromosomas finales (Menz et al., 2023). Las mutaciones además de generar las

anormalidades antes mencionadas pueden provocar la formación de micronúcleos, el intercambio de cromátidas hermanas, la rotura no solo de cadenas individuales de ADN, si no de cadenas dobles (Srivastava et al., 2016) así como pueden conducir a la muerte celular, o el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer (Castillo Ordoñez & Velasco Reyes, 2023).

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones pueden no tener consecuencias fenotípicas, así como tener consecuencias positivas o negativas, esto dependerá además de lo anteriormente mencionado, como el tipo de mutación, de los antecedentes genéticos, el tipo de célula a la que se afecte, el tejido al que pertenezca, o la etapa en la que se afecte, por ejemplo, en las células germinales una sola mutación puede afectar negativamente a la descendencia y posteriores generaciones (Menz et al., 2023). Por otro lado, es posible evitar la expresión de mutaciones genotóxicas por medio de mecanismos de reparación de ADN o por inducción de apoptosis, sin embargo, estos mecanismos pueden no siempre modificar o reparar el daño pudiendo facilitar la mutagénesis y en consecuencia que aparezcan enfermedades de mayor gravedad (Srivastava et al., 2016), y se ha visto que existen poblaciones más o menos susceptibles al riesgo de estas enfermedades debido a la alteración de genes involucrados en los procesos para reparar el ADN o la apoptosis (Castillo Ordoñez & Velasco Reyes, 2023).

Como se mencionó anteriormente, la genotoxicidad puede provocar la aparición de diversas enfermedades de gravedad, como lo son las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o enfermedades como el cáncer, entre otras afecciones (Srivastava et al., 2016).

Dentro de los 20000 genes del genoma humano, se le conoce a 200 de ellos como “genes impulsores del cáncer” los cuales son genes que en caso de ser afectados por mutaciones pueden provocar el desarrollo de cáncer, y aunque en la mayoría de los casos se requieren de tres mutaciones en un subconjunto de genes para que una células normal pueda progresar a cáncer

avanzado, existen ejemplos donde una sola mutación puede convertir una célula normal en una célula tumoral, como lo es el caso de la leucemia mieloide crónica (Menz et al., 2023). Tanto los agentes genotóxicos reactivos al ADN como los agentes no reactivos al ADN pueden provocar cáncer, aunque estos últimos solo pueden ser carcinogénicos a altos niveles de toxicidad, afectando a las topoisomerasas generando aberraciones cromosómicas (Choudhuri et al., 2021).

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos del desarrollo neurológicos se encuentran relacionadas al estrés genotóxico, debido a la relación de la integridad del genoma con el buen funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso. De modo que cuando se daña el ADN y se generan anomalías en los mecanismos de reparación de este, se genera el estrés genotóxico que afecta y se asocia los síndromes neurodegenerativos antes mencionados. Existen varias evidencias que sugieren que agentes genotóxicos como los metales pesados, logran estimular la activación microglial, la neuroinflamación, la disfunción cerebro vascular, generando modificaciones en la barrera hematoencefálica lo cual da pie a trastornos al sistema nervioso central (Srivastava et al., 2016).

Se ha encontrado gracias a avances en la genómica que la mutación de ciertos genes puede causar infertilidad, por medio de la alteración a los procesos de espermatogénesis y ovogénesis, así como afección a las propiedades sexuales primarias y secundarias que se pueden observar en forma de trastornos hormonales, atrofia testicular, pérdida folicular por daño, bajo recuento de espermatozoides y crecimiento retardado de espermatozoides (Choudhuri et al., 2021).

#### **II.4.2 Pruebas para genotoxicidad**

Existen una gran variedad de pruebas que detectan diversos criterios para valorar si un compuesto es potencialmente genotóxico o si una población expuesta a dicho cierto agente tiene efectos de

genotoxicidad, aunque ninguna de estas pruebas es capaz de detectar todos los criterios de valoración genotóxicos, por lo en el caso de investigar la posible genotoxicidad de alguna sustancia el uso de baterías de pruebas en la que se incluya la evaluación de mutagenicidad en una prueba bacteriana y la evaluación de células in vitro y/o in vivo (Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios CEMAR, 2024). Dentro de las baterías se pueden estudiar biomarcadores de exposición por pruebas de intercambio de cromátidas hermanas y el ensayo cometa, biomarcadores de efecto con pruebas de aberraciones cromosómicas y ensayo de micronúcleos (Castillo Ordoñez & Velasco Reyes, 2023).

La prueba de aberraciones cromosómicas detecta a las sustancias tóxicas que inducen cromosomas anormales, roturas de cromosomas o cromátidas y translocaciones cromosómicas. Las aberraciones se analizan con una tinción y un análisis a microscopio. Se considera un ensayo complementario a la prueba de mutación inversa bacteriana (prueba de Ames) la cual es utilizada para evaluar la capacidad mutagénica de una sustancia química. Cuando se quieren investigar pruebas in vitro, una alternativa adecuada al ensayo de aberraciones cromosómicas es la prueba de micronúcleos debido a los criterios simples de puntuación de esta última (Turkez et al., 2017).

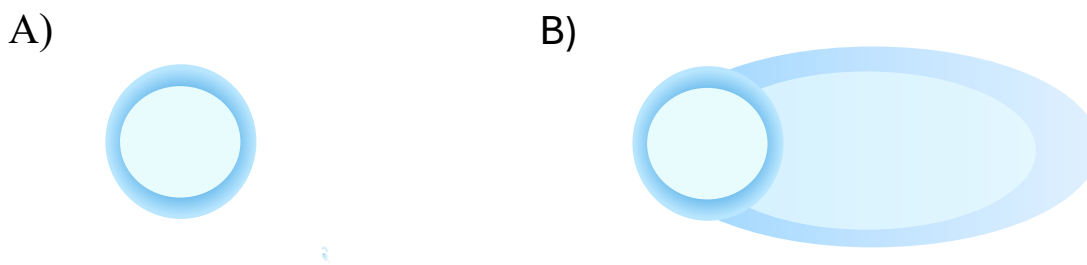
Los micronúcleos son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y aparecen en el citoplasma cerca del núcleo, se producen cuando por errores durante la replicación del ADN se generan roturas cromosómicas que dejen fragmentos cromosómicos acéntricos que al no disponer de centrómeros no se incluyen en los núcleos hijos, se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma visibles al microscopio óptico (Lobo & Bolaños, 2014).

El ensayo cometa es una técnica altamente sensible en la cual por medio de la electroforesis es posible apreciar el daño sobre el ADN. Su principal ventaja, la sensibilidad de la prueba para observar daños mínimos, resulta ser además su principal desventaja, ya que depende de manera

excesiva sobre las condiciones y variables que puedan ocurrir durante la realización del ensayo, así como pequeñas modificaciones en el protocolo pueden generar resultados ampliamente variables (Zuñiga Venegas, 2009).

### II.4.3 Ensayo cometa

La electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa es un método sensible que se utiliza para visualizar y medir el daño sobre el ADN en células individuales mediante microscopía. Funciona por medio de la inmovilización por agarosa de células en un portaobjetos, las cuales son sumergidas en solución de lisis para eliminar los lípidos y proteínas, y se exponen a un campo eléctrico débil para provocar la migración del ADN, atrayendo el ADN roto y cargado negativamente hacia el ánodo, tras lo cual se tiñen con un tinte fluorescente y se observa con un microscopio de fluorescencia (Olive, 2002). Como resultado de las pruebas se puede observar cuando no hay daño sobre el ADN, una forma concentrada de este se puede observar la forma de un cometa cuando el ADN roto migra y deja la figura de una estela o una cola, *figura 7*.



**Figura 7.** Ilustración comparativa aproximada células con y sin daño al ADN tras el ensayo cometa. A) es una célula sin daño al ADN, mientras que B) es una célula con daño al ADN observándose la forma de la cabeza donde se encuentra en el ADN no afectado y la cola como una estela.

El ensayo cometa es un método simple y sensible para evaluar el daño del ADN en células individuales, pudiéndose realizar bajo dos condiciones de pH principales, se considera que la versión óptima para identificar agentes genotóxicos es bajo condiciones alcalinas por su capacidad para detectar roturas tanto de doble cadena como de cadena simple del ADN, además de enlaces

cruzados, sitios álcali lábiles (regiones del ADN susceptibles a lesiones por agentes alcalinos), y sitios de reparación por escisión incompleta (Pu et al., 2015) mientras que bajo condiciones neutras se permite la detección roturas en la doble cadena de ADN independientemente de la presencia de roturas de cadena simple (Olive & Banáth, 2006).

El ensayo cometa se ha utilizado para evaluar el daño al ADN de una gran variedad de muestras, entre las que se incluyen cultivos de células adherente, cultivos células en suspensión, tejido y glóbulos blanco (Pu et al., 2015), y si bien es posible usar muestras de sangre completa la población celular que más utilizada para la realización del ensayo son los linfocitos, los cuales se utilizan de manera rutinaria en estudios de genotoxicidad (Zuñiga Venegas, 2009).

En una gran parte de los estudios de biomonitorización humana no es posible obtener todas las muestras de estudio en un espacio estrecho de tiempo, ya que las tomas de muestras pueden realizarse con periodos de tiempo de meses entre cada una, por lo cual se considera logísticamente apropiado realizar un almacenamiento adecuado para procesarlas y analizarlas juntas, por lo cual existen condiciones que deben de cumplirse para mantener los linfocitos viables para su posterior procesamiento. La condición de mayor relevancia por la prolongación de los periodos de almacenamiento es la temperatura, siendo esta una de congelación de hasta  $-80^{\circ}\text{C}$ , a la cual se llega de manera paulatina, donde algunos autores especifican una velocidad de congelación máxima de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Por otro lado, es necesario la congelación de los linfocitos en medios de congelación ricos en suero bovino fetal y con un 10% de DMSO que preserve la viabilidad de las células. Diversos estudios han demostrado que la criopreservación de los linfocitos no supone un efecto dañino sobre el material genético, como el estudio de Duthie enfocado en evaluar la posible capacidad de daño en el ADN ocasionado por la criopreservación, demostrando incluso que los linfocitos frescos y congelados tenían niveles similares de purinas y pirimidinas. De igual manera

otros estudios han mostrado la utilidad de la criopresevación al demostrar que los linfocitos que pasaron por un periodo de congelación no tienen respuestas significativamente diferentes a los linfocitos frescos frente a agentes genotóxicos, teniendo ambos la capacidad de responder antes estos agentes, esto queda plasmado en estudios como el de Boyle, Duthie y Visvardis (Zuñiga Venegas, 2009).

Los resultados que se pueden obtener para el ensayo cometa tienen diferentes enfoques de análisis. Se puede medir el largo de la cola en una fotomicrografía, sin embargo, la información proporcionada sería limitada ya que el largo de la cola aumenta en los niveles más bajos de daño y pronto llega a su máximo. Por otro lado, se pueden clasificar los cometas en cinco categorías dando una puntuación de 0 a 4 a cada categoría, y se observan 100 cometas, proporcionando una puntuación general por muestra de unidades arbitrarias. Se puede, además, hacer uso de análisis de imágenes por medio de una cámara acoplada al microscopio de observación para hacer uso de un software apropiado sobre las imágenes seleccionadas (Collins et al., 2008). Existen diferentes procedimientos conformados por software y hardware que se utilizan para el procesamiento automático de imágenes de células del ensayo cometas, los cuales funcionan según los algoritmos planteados por los autores, como el creado por Gyori et al en 2014 conocido como OpenComet, una herramienta de licencia libre que filtra el ruido y realiza una corrección global del fondo, identifica cometas obteniendo la cabeza y la cola y por medio de ciertas fórmulas que utilizan los píxeles de las imágenes lanzan parámetros como el área (el número de píxeles que conforman el cometa), el contenido de ADN (la suma de la intensidad de los píxeles dentro de cada área), la intensidad (contenido de ADN dividido entre su área), longitud (longitud en píxeles), porcentaje de ADN (porcentaje del contenido de la región sea cola o cabeza, en razón al contenido del cometa), momento cola (longitud de la cola multiplicado por el porcentaje de ADN de la cola) y

momento olive (porcentaje de ADN de la cola multiplicado por la distancia entre los centroides de la cabeza y cola ((Luna-Gonzalez et al., 2018)).

Respecto al reporte de resultados, se considera esencial presentar el descriptor principal del ensayo cometa (longitud de la cola, momento de la cola, intensidad o porcentaje de ADN en la cola o puntuación visual), la cantidad de cometas analizados por muestra y como se expresa el nivel general la migración del ADN (mediana o media de la puntuación) (Møller et al., 2020).

### **II.4.3 Genotoxicidad y su relación con los pesticidas.**

Varios pesticidas y compuestos de estos han sido probados en una amplia variedad de ensayos para probar su potencial genotóxico por ser considerados como agentes mutágenos, cubriendo los efectos como el daño al ADN, las alteraciones cromosómicas y mutaciones genéticas, dentro de estos ensayos se ha revelado que poseen propiedades mutagénicas que inducen diferentes efectos genéticos (Bolognesi & Morasso, 2000), documentando que una exposición continua a dosis no letales de mezclas complejas de pesticidas puede provocar rotura de cadena simple y doble en el ADN, estrés oxidativo y enlaces cruzados (Kapeleka et al., 2021).

Un estudio llevado a cabo en 2022 documentó los efectos epigenéticos de los pesticidas por el cual se ve afectado el ADN, encontrando un probable efecto de un tipo de pesticida fúngico sobre la metilación del ADN al encontrar una reducción en los procesos de desmetilación sugiriendo una posible inhibición de la ADN glicosilado, además se encontró que los pesticidas piretroides se asociaban a niveles más elevados de estrés oxidativo (Janoš et al., 2023).

Diversos pesticidas han demostrado capacidad para fomentar el estrés oxidativo por diversas rutas. Algunos pesticidas pueden alterar el funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplasmático y mitocondrial, sobre produciendo radicales libres de oxígeno (O<sub>2</sub>) o ROS, otros pesticidas como ciertos herbicidas han demostrado inducir la formación de radicales

libres de oxígeno por medio de autooxidación, así como algunos inhiben las enzimas asociadas a la biosíntesis de antioxidantes, y por último los ROS pueden aumentar como subproductos del funcionamiento de las vías de desintoxicación (Lushchak et al., 2018).

El estrés oxidativo se ha visto relacionado a diversos efectos sobre órganos y tejidos, esto debido a la producción de metabolitos tóxicos dañinos para las células. Los pesticidas OP pueden inducir el estrés oxidativo aumentando los radicales libres de oxígeno ( $O_2$ ) en eritrocitos y otras células (Kapeleka et al., 2021) esto puede a su vez fomentar procesos como la peroxidación lipídica oxidativa, conduciendo a un daño oxidativo al tejido fetal y placentario por peroxidación lipídica y roturas de la cadena de ADN, esto documentado en peces, roedores y humanos (Choudhuri et al., 2021).

## **CAPÍTULO III. EXPERIMENTACIÓN**

## **III.1 Equipos y reactivos**

### **III.1.1 Equipo**

- i. Mindray BS-200
- ii. Zybio de hematología
- iii. Thermo Scientific Fotómetro para microplacas multiskan FC
- iv. Vortex genie 2
- v. Microcentrifuga
- vi. Centrifuga
- vii. Microscopio invertido de fluorescencia modelo Evos
- viii. Cámara de electroforesis
- ix. Fotómetro para microplacas Multiskan FC

### **III.1.2 Reactivos**

- i. Kit comercial acetilcolinesterasa de Sigma Aldrich
- ii. Kit comercial de factor neurotrófico de Sigma Aldrich
- iii. Kit comercial Lymphoprep de Serumwerk Bernburg
- iv. Kit commercial Millipore de Sigma Aldrich
- v. Agua tridestilada
- vi. Solución salina
- vii. Butirilcolinesterasa (Wiener Lab)
- viii. Reactivos Zybio
- ix. Reactivos de hematología marca Zybio
- x. Reactivos de bioquímica clínica marca Pointe Scientific y Wiener Lab.
- xi. Solución de lisis

- xii. Solución para electroforesis alcalina
- xiii. Solución para precipitación del ADN
- xiv. Colorante fluorescente para ácido nucleico.

## **III.2. Metodología**

### **III.2.1 Declaración ética**

El protocolo del estudio fue sometido para su aprobación al Comité de bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la universidad autónoma de Baja California con número 1500/2022-2, y el estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Los participantes que participaron en el estudio fueron voluntarios a los cuales se les proporcionó información relevante sobre los procesos en los que serían partícipes, y el propósito del estudio, de manera clara en el idioma español, para lo cual se les preparó un consentimiento informado escrito, el cual les fue leído y explicado previo a la firma de los voluntarios. En el consentimiento se incluyó información como el propósito de la investigación, la duración esperada de la entrevista y una declaración a los participantes que no correrán ningún riesgo debido al estudio, así como explicarles que al ser participación voluntaria podrán retirarse en cualquier momento del estudio y que no se daría ningún pago por su participación.

### **III.2.2 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio de tipo transversal exploratorio con un muestreo de conveniencia no probabilístico, sobre una población ubicada en el distrito de Venustiano Carranza, una zona rural del municipio de San Quintín. Se recolectó, a lo largo de 3 viajes distintos en mayo de 2023, octubre de 2023 y mayo de 2024, información tanto de la exposición directa como la indirecta a plaguicidas OP y sus consecuencias.

Para este estudio se seleccionaron individuos de género indistinto, que residieran o trabajaran en la zona al menos durante un periodo de 12 meses, que se encontraran entre los 18 y 55 años y que quisieran colaborar con la investigación, a los cuales se les dividió en dos grupos de estudio según el tipo de exposición a plaguicidas que presentaran: por un lado el grupo de exposición directa, conformado por 50 individuos que forman parte de la población trabajadora y que presentan exposición ocupacional constante y directa a plaguicidas OP; y por otro lado el grupo de exposición indirecta formado por 46 individuos que presentan exposición ambiental ya sea por ser residentes que vivan en las proximidades de los campos donde se llevan a cabo actividades agrícolas pese a no llevar a cabo dichas actividades ellos mismos, o bien por ser familiares o convivir con trabajadores expuestos directamente a plaguicidas.

Los criterios de aceptación para voluntarios que desearan participar en el estudio fueron: adultos entre los 18 y 55 años así tener al menos 1 año de contacto diario y manipulación directa con plaguicidas en un contexto laboral, en el caso de voluntarios que fueran seleccionados como grupo directo, o tener al menos 1 año de contacto con las áreas agrícolas donde se usen pesticidas o en su defecto viviendo con alguien que trabaje directamente con pesticidas, en el caso de voluntarios seleccionados como grupo indirecto.

Por su parte los criterios de exclusión incluyen a voluntarios que tengan condiciones que afecten los resultados de los análisis de sangre que se les realizaría como la adicción a las drogas, alcoholismo o alguna enfermedad del hígado, así como condiciones que afecten los resultados de los análisis cognitivos tales como un diagnóstico de alguna enfermedad psicológica o psiquiátrica, trastornos neurodegenerativos o neurológicos, o que se encuentren bajo fármacos que afecten de manera directa o indirecta el sistema nervioso central. Se consideró como estándar una escolaridad mínima de 3 años de educación básica, excluyendo a personas con condición de analfabetismo, y

que no tuvieran una escolaridad superior a 6 años de educación primaria. Como estándar, además, se buscaron personas exclusivamente diestras, excluyendo a voluntarios zurdos para descartar algún sesgo producido por un desarrollo atípico en la asimetría cerebral que pueda ocasionar una variable a los resultados. Por último, se excluyeron a personas que por razones físicas tuvieran dificultades para concluir los test para el análisis cognitivo a su máximo potencial, tales como déficits sensoriales no corregidos de la visión o audición.

Finalmente se consideraron como criterios de eliminación al deseo de no ser puncionado para la obtención de la muestra de sangre, voluntarios que no quieran contestar los instrumentos de evaluación o voluntarios que decidan retirarse durante cualquier etapa del estudio.

### **III.2.3 Recolección de datos sociodemográficos**

Durante los viajes a la zona agrícola de Venustiano Carranza en el municipio de San Quintín, Baja California, México, se realizaron dos cuestionarios distintos, según al grupo de estudio al que perteneciera cada voluntario, con la finalidad de recolectar información relevante para el estudio estos mismos. Estos cuestionarios fueron aplicados por terceras personas, que no cuentan con implicaciones en el estudio que afecten la objetividad de la información recolectada. En los cuestionarios se plantearon preguntas para obtener una imagen general de las condiciones de salud de los voluntarios, su grado de escolaridad, su acercamiento a los plaguicidas y demás información que sirvió para excluirles o dejarles participar en el estudio. Los cuestionarios fueron guardados y la información obtenida de dicha fue ordenada y clasificada para obtener resultados sociodemográficos de la población estudiada con la finalidad de un estudio completo.

### **III.2.4 Evaluaciones neuropsicológicas**

Los voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión fueron evaluados individualmente a través de dos evaluaciones neuropsicológicas que determinaron el estado mental general, la

memoria, la atención, habilidades de concentración, la fluidez verbal, habilidades de visuoconstrucción y la memoria visual. Las pruebas fueron administradas por el mismo evaluador capacitado con experiencia en el área de psicometría.

Las pruebas administradas fueron el MoCA y el TMT, sin interrupciones entre la modalidad A y B (Anexo 1 y 2). En ambas evaluaciones se les dejó a los voluntarios un lápiz sin borrador y se les fueron explicadas las instrucciones para cada una de las partes de la prueba, con los ejemplos de prueba que ambos estudios proporcionan y con la disponibilidad de responder a las dudas que surgieran, tomando en cuenta los tiempos para considerar válidas las pruebas.

Una vez contestadas estas pruebas fueron evaluadas por personas capacitadas, y guardadas con los archivos correspondientes a la información de los pacientes para transferir los resultados a una base de datos para el análisis estadístico. La evaluación de resultados se hizo según los puntajes denotados para el test MoCA y según las métricas de percentil para México realizadas por Arango et Al (Anexo 3) para el TMT (Arango-Lasprilla et al., 2015).

### **III.2.5 Tomas de muestras sanguíneas**

Se identificaron a los voluntarios participantes y se les realizó una punción venosa con ayuda del sistema Vacutainer obteniendo una muestra de mínimo 4ml de sangre periférica en tubos con anticoagulante K2EDTA (lila) los cuales fueron usados para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa, preparando una pequeña porción de esta muestra, para determinar la hemoglobina tomando otra pequeña porción de la muestra, y finalmente, para determinar el daño genético en linfocitos, resguardando el resto de la muestra a 4°C tras la recolección y durante el traslado hacia el laboratorio perteneciente a la Universidad Autónoma de Baja California donde fueron procesadas.

Para los estudios sobre el suero y los parámetros que se obtienen en la química clínica se recolectó, a partir de la misma punción con el sistema Vacutainer, 5ml de sangre periférica en tubos con activador de la coagulación y gel separador (amarillo), los cuales serían procesados tras la coagulación y centrifugación.

### **III.2.6 Determinación de la actividad enzimática (AChE):**

Tras la recolección de las muestras, estas fueron procesadas de manera inmediata para la determinación de la actividad de la colinesterasa, acatando lo indicado por el método modificado de Ellman, esto se logró tomando una pequeña porción de la muestra de sangre obtenida en los tubos con anticoagulante k2EDTA la cual se preparó centrifugando durante 10 min a 3000 rpm, separando el plasma y los eritrocitos, los cuales se lavaron 3 veces en solución salina isotónica fría (0,9%, v/p) y se procedió a hemolizarlos mediante una centrifugación de 10 min a 14.000 rpm. Las muestras hemolizadas fueron almacenadas y llevadas al laboratorio para su análisis final haciendo uso del kit comercial Sigma-Aldrich MAK119 y el protocolo planteado por este (Anexo 4). Del hemolizado se tomaron 6 uL y se diluyeron en 234uL debuffer lo cual es equivalente a una dilución de 40 veces. Finalmente con el uso del espectrofotómetro Thermo Scientific multiskan se leyeron y cuantificaron las absorbancias iniciales y finales, aplicando la siguiente ecuación para determinar la actividad enzimática.

$$\frac{(A_{412})_{final} - (A_{412})_{inicial}}{(A_{412})_{calibrador} - (A_{412})_{blanco}} * n * 200$$

Donde A es la absorbancia.

### **III.2.7 Determinación de actividad enzimática de la butirilcolinesterasa (BCHE)**

Para determinar la BCHE plasmática, se utilizó el equipo de química sanguínea Mindray BS-200 y se utilizó un método colorimétrico (Wiener Lab), logrando cuantificar la actividad enzimática de esta enzima.

### **III.2.8 Determinación de la hemoglobina total**

La determinación de la hemoglobina total (cianometahemoglobina) se realizó con el equipo automatizado de biometrías hemáticas Zybio, y sus respectivos reactivos para su calibración. Se tomó una pequeña muestra de la sangre obtenida en los tubos con K2EDTA en el equipo el cual automáticamente procedió a dar resultados de la biometría hemática en la cual se incluye la hemoglobina.

Los resultados de la biometría hemática fueron adjuntados a los perfiles de las entrevistas para los datos sociodemográficos y a los resultados de las evaluaciones psicométricas.

### **III.2.09 Determinación del factor neurotrófico derivado del cerebro**

La determinación del BDNF de las muestras obtenidas se hizo con el Kit Millipore de Sigma Aldrich y sus respectivos reactivos, en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Baja California según el protocolo especificado en el kit (Anexo 5).

Se utilizó el suero de las muestras obtenidas, el cual fue diluido con el Elemento D1 del kit hasta 50 veces, y los estándares preparados con elementos del kit específicos para suero, con lo cual se hizo un procedimiento Elisa tipo sándwich. Se utilizó una placa de micropocillos donde se colocó la muestra diluida y el estándar a temperatura ambiente durante 2.5 horas de incubación, luego la solución fue descartada y se hicieron 4 lavados con la solución de lavado. Se volvieron a llenar los pocillos con el anticuerpo de detección y se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente

con agitación suave, y al pasar el tiempo de incubación se descartó la solución, y se volvió a lavar de misma manera. Al finalizar los lavados se agregó solución de estreptavidina a cada pocillo, y se dejó en incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, para descartarse y repetirse el ciclo de lavados. Finalmente se agregó reactivo de sustrato de un solo paso a cada pocillo, se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación, se agregó la solución de detección a cada pocillo. Las absorbancias fueron leídas con un espectrofotómetro a 450nm.

### **III.2.10 Evaluación del daño genético**

El efecto genotóxico de los pesticidas fue evaluado a través del ensayo del cometa en linfocitos de sangre periférica, para medir el daño primario del ADN.

- Separación de linfocitos: Las muestras de sangre fueron procesadas usando un Kit específico para la segregación de linfocitos, en el cual se utilizó el agente Lymphoprep, las muestras de sangre y solución salina, según las instrucciones brindadas por el Kit (Anexo 6). Finalmente, los linfocitos que se obtuvieron se suspendieron en medio de criogenia y fueron puestos a  $-80^{\circ}$
- Ensayos cometa: Los linfocitos fueron suspendidos en 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en PBS y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Los portaobjetos con suspensión celular fueron colocados con cubreobjetos y llevados a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min., pasado el tiempo se retiró el cubreobjetos y los portaobjetos se sumergieron en un buffer de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10, 1% Triton X-100 y 10% DMSO), por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad, para permitir la lisis de las células embebidas y el desenrollamiento del DNA. Después de la incubación de las células en la solución de lisis, los portaobjetos

fueron expuestos a buffer alcalino (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH buffer) pH >13 y se dejaron en reposo por 10 horas. Finalmente, los portaobjetos fueron sometidos a electroforesis por 30 min. a 25 V y 300 mA en una cámara de electroforesis con el mismo buffer alcalino, se realizaron dos lavados con agua y fijadas con etanol y finalmente fueron teñidas con bromuro de etidio (10 µg/ml) y tras lavarse una ultima vez con agua fueron resguardadas en oscuridad hasta su vista en el microscopio.

- Análisis de cometas. El análisis de células se realizó por el software OpenComet como un plugin del programa Image J, para ello se utilizó el Microscopio de Inmunofluorescencia modelo Evos Fls para la observación de las muestras de cada participante, se observaron y tomaron fotos con el microscopio a 100 células que contaran con daño en ADN (formación de cometa) o sin daño, estas fueron luego leídas por el software OpenComet con el cual se obtuvieron los valores de la intensidad del cometa, la intensidad de la cola, el largo de la cola, el momento de la cola y el momento Olive, se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar de las 100 células para obtener los parámetros anteriores de cada individuo, así como se clasificaron de manera general en células con daño y sin daño y de manera más específica en 5 tipos dependiendo de la intensidad de la cola, es decir el daño al ADN: tipo 0 células sin daño, tipo 1 células con daño muy leve, tipo 2 células con daño leve, tipo 3 células con daño severo y tipo 4 como células con daño muy severo, finalmente se obtuvieron las unidades arbitrarias ((Olive, 2002), a cada tipo se le asignó una puntuación de 0-4 según el tipo de células y se calcularon las unidades arbitrarias para cada participante según la siguiente fórmula:

$$UA = (n_0 * 0) + (n_1 * 1) + (n_2 * 2) + (n_3 * 3) + (n_4 * 4)$$

Donde

$n_i$  = Cantidad de núcleos encontrados en cada categoría

### **III.2.11 Análisis Estadístico**

Se utilizó el programa SPSS versión 25 para analizar nuestras variables dependientes e independientes, haciendo uso de métodos estadísticos como el chi cuadrado, t student, ANOVA factorial y correlación de Pearson.

El chi cuadrado fue utilizado en la sección de datos sociodemográficos para la comparación de los grupos directos e indirectos según las variables (edad, genero, educación, estado marital, etc.), así como en la sección del deterioro cognitivo. En el caso del t student, este fue utilizado en las secciones de la actividad de las colinesterasas, donde se compararon las medias de la actividad de la AChE, y la hemoglobina, AChE y BChE totales en los grupos expuestos directa e indirectamente a pesticidas. El t student fue utilizado de igual manera para analizar las medias de concentración del BDNF y en la determinación del daño genético. Por último la correlación de Pearson se utilizó para una evaluación entre las variables continuas para identificar la relación del deterioro cognitivo, con la actividad colinesterasa y el daño genético en variables que hayan demostrado anteriormente una diferencia significativa con el análisis de ANOVA factorial.

El uso del programa SPSS nos permitió realizar un análisis detallado y riguroso de nuestras variables, lo que nos llevó a obtener resultados significativos que contribuyen al conocimiento del deterioro cognitivo en el campo.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS**

## IV.1 Estudios sociodemográficos

La recolección de datos sociodemográfico se evaluó usando chi cuadrada para comparar las variables de la población en ambos grupos poblacionales *tabla II.1*, EI y ED. Se encontró que dentro del grupo ED el 90% se dedica a ocupaciones agrícolas, mientras que el 10% está involucrado en actividades industriales, aunque en ambas actividades tienen contacto directo con pesticidas, razón por la cual se clasificaron en ED, mientras que en los participantes pertenecientes al grupo EI, como era de esperarse por las especificaciones de este grupo, ninguno se dedica a las actividades agrícolas.

Dentro de las características poblacionales se puede observar que en ambos grupos la mayoría de los participantes son jóvenes entre las edades de 18-35 años, aunque esta diferencia es más notoria en el grupo ED donde el 74% se encontraban en estas edades y solo el 26% se encontraba entre los 36 y 55 años, mientras que en el grupo EI los jóvenes de 18 a 35 años eran el 56.52% del grupo total.

Con respecto al género, se observa que la mayoría de los participantes del estudio pertenecen al género femenino, tanto del grupo ED donde representan un 68% de la población estudiada como en el grupo EI donde representan el 86.96% de la población estudiada.

No se observó una diferencia significativa en las variables sociodemográficas entre los grupos expuestos directa e indirectamente, con la excepción del género y la ocupación, sin embargo, este último dato es más que nada esperable, considerando que los voluntarios del grupo EI fueron escogidos principalmente por tener una ocupación que no se relacionara al contacto con pesticidas.

Variable		Expuestos		Expuestos		P
		Directamente (n=50)		Indirectamente (n=46)		
		N	%	N	%	
<b>Edad</b>	18-35	37	74	26	56.52	0.072
	36-55	13	26	20	43.48	
<b>Género</b>	Femenino	34	68	40	86.96	0.027
	Masculino	16	32	6	13.04	
<b>Educación</b>	Primaria	20	40	23	50	0.325
	Secundaria	30	60	23	50	
<b>Estado marital</b>	Soltero	7	14	8	17.39	0.587
	Unión libre	30	60	23	50	
	Casado	13	26	13	28.26	
	Divorciado	0	0	1	2.17	
<b>Ocupación</b>	Viudo/a	0	0	1	2.17	0.000
	Agrícola	45	90	0	0	
	Industrial	5	10	46	100	

*Tabla II.1* Variables sociodemográficas de la población estudiada separada por categorías, con datos presentados a manera de frecuencia y porcentaje. Las diferencias observadas entre grupos se realizaron haciendo uso de chi cuadrada. Se identifica como importancia significativa a  $p < 0.015$ .

## IV.2 Estudios de actividad de la colinesterasa

La actividad de la AChE y la BChE, así como los niveles de hemoglobina fueron analizados mediante t student con la finalidad de encontrar alguna importancia significativa en los niveles de estos con los grupos ED y EI, *tabla II.2*.

La media de la actividad de la AChE fue de  $4769.85 \pm 1503.16$  y  $4893.97 \pm 1774.97$  (U/L) en los grupos expuestos directamente y los expuestos indirectamente, respectivamente ( $p=0.708$ ), indicando que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de la AChE entre individuos que han tenido contacto directo e indirecto con pesticidas, si bien esto es concordante con la presencia de la enzima AChE con una media de  $67.21 \pm 36.58$  y  $64.44 \pm 504.5$

(U/L) en el grupo ED y EI respectivamente, no se encuentra una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p=0.351$ ), aunque la hemoglobina si tenga una diferencia significativa con una media de  $13.8 \pm 1.56$  g/dL en el grupo ED y  $12.98 \pm 1.56$  g/dL en el grupo EI.

La diferencia significativa se encuentra en la media de la BChE la cual fue  $8697.14 \pm 1416.80$  (U/l) en el grupo de ED y  $7724.80 \pm 2275.70$  (U/l) en el grupo EI ( $p=0.013$ ), lo cual nos indica que el grupo ED presenta niveles significativamente superiores de BChE a los niveles del grupo EI.

<b>Parámetro</b>	<b>Expuestos Directamente Media <math>\pm</math> (DE)</b>	<b>Expuestos Indirectamente Media <math>\pm</math> (DE)</b>	<b><i>p</i></b>
Hb (g/dL) <sub>total</sub>	13.80 (1.56)	12.98 (1.56)	0.015
AChE (U/g Hb) <sub>total</sub>	67.21 (36.58)	64.44 (504.50)	0.351
Actividad AChE (U/L) <sub>total</sub>	4769.85 (1503.16)	4893.97 (1774.97)	0.708
BChE (U/L) <sub>total</sub>	8697.14 (1416.80)	7724.80 (2275.70)	0.013

*Tabla II.2.* Niveles de actividad y concentración de AChE y BChE en población estudiada, se presentan las medias con las desviaciones estándar obtenidas del análisis efectuado mediante t student. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Estos resultados parecen contradecir los resultados de otros estudios como el de Sapbamrer en 2014, donde al determinar la actividad de la AChE encontró que esta fue menor en el grupo de agricultores expuestos que en el grupo control (Sapbamrer & Nata, 2014), aunque por otro lado resultan similares a los generados por Ortega Freyre y compañía en 2016, donde al estudiar la exposición ocupacional a plaguicidas OP no pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos y no expuestos en la actividad de acetilcolinesterasa (Ortega Freyre et al., 2016), así como los resultados de Rosales al estudiar ambas colinesterasas en un grupo expuesto encontrando que no había diferencia significativa en la AChE con respecto

al grupo control, mientras que si existía una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de BChE en el grupo expuesto y el grupo control (Rosales, 2015a).

### IV.3 Estudios del factor neurotrófico derivado del cerebro

La media obtenida del factor neurotrófico fue de  $66.63 \pm 38.56$  en pacientes expuestos directamente y  $147.15 \pm 73.54$  en pacientes expuestos indirectamente, con una  $p=0.001$  como se observa en la *tabla II.3* lo cual indica que los pacientes que tienen una exposición más directa presentan un nivel de BDNF que es significativamente menor estadísticamente en comparación con los pacientes expuesto directamente.

	<b>Expuestos Directamente</b> <b>Media <math>\pm</math> (DE)</b>	<b>Expuestos Indirectamente</b> <b>Media <math>\pm</math> (DE)</b>	<i>p</i>
BDNF (ng/ml) Total	66.63 (38.56)	147.15 (73.54)	0.001

*Tabla II.3* Concentración de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), se presentan los datos como media con desviación estándar, analizados por medio de t student. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Si bien, los estudios que investigan específicamente los niveles de BDNF con las poblaciones expuestas a pesticidas son realmente limitados, hay otros estudios que han detectado una relación entre los niveles de BDNF con la exposición a pesticidas, considerando al BDNF como un posible biomarcador dichos estudios presentan resultados similares a los obtenidos de una concentración significativamente menor estadísticamente. Esto se ve afirmado en el estudio realizado por Rodríguez Carillo et al, realizado en 2022 donde se investigó una población de adolescentes masculinos a los cuales se les cuantificó los niveles séricos de BDNF y las concentraciones de metabolitos de pesticidas no persistentes urinarios con la finalidad de entender el efecto de estos en la conducta, con lo cual encontraron que en aquellos individuos que presentaban varios

metabolitos de pesticidas OPs combinados tenían menores niveles séricos de BDNF (Rodríguez-Carrillo et al., 2022).

Aunque parece contradecir otros estudios como el de Özdemir et al en 2018 donde al inducir una intoxicación aguda por medio de diferentes tipos de pesticidas (OP, piretroides y neonicotinoides) sobre individuos de la especie de peces cebras encontraron que los niveles de BDNF habían aumentado significativamente en los tejidos cerebrales, así como la transcripción del ARNm de los genes que codifican BDNF (Özdemir et al., 2018), sin embargo, en este estudio dichos niveles aumentaron en consecuencia a la toxicidad aguda como un mecanismo de defensa para la supervivencia neuronal, mientras que en el grupo expuesto indirectamente de este estudio los niveles de BDNF se encontraron significativamente disminuidos debido a que de este grupo se espera una intoxicación crónica, esto se puede reafirmar al utilizar los resultados del experimento de Ardebili et al en 2015 donde se estudiaron los efectos de un OP sobre el BDNF encontrando niveles menores significativamente en el hipocampo de las ratas a las que se les expuso al pesticida malatión a diferencia de aquellas no expuestas (Ardebili Dorri et al., 2015), y mientras que en el experimento de Özdemir et al donde se realizó un solo acercamiento de la especie experimentada para alcanzar la intoxicación, en el experimento de Ardebili et al se les estuvo exponiendo a los sujetos de experimentación constantemente durante 14 días, esta exposición prolongada podría explicar la diferencia de resultados así como la similitud con los resultados de este estudio.

Por otro lado, los niveles de BDNF en el grupo expuesto indirectamente son significativamente mayores, estos resultados podrían significar que el BDNF esté incrementado para actuar como un mecanismo para la supervivencia neuronal debido a que las dosis que este grupo recibe sea suficiente para activar estos mecanismos pero no tanto para generar un estrés oxidativo que implique la disminución de este, sin embargo, esto es una mera especulación ya que se necesita de

un grupo control que no haya sido expuesto y que tenga características sociodemográficas para poder contrastar los resultados del grupo EI y asegurar si estos disminuyen o aumentan significativamente en comparación a un grupo control, lo cual puede dar una mejor aproximación de las consecuencias por la exposición indirecta prolongada a pesticidas medido en los niveles de BDNF.

#### **IV.4 Estudios del deterioro cognitivo**

Los resultados obtenidos por las pruebas de MoCA y el TMT sección A como sección B, fueron analizados por medio de chi cuadrada para observar diferencias entre la cantidad de individuos con deterioro cognitivo en ambas poblaciones estudiadas, *tabla II.4*. Este análisis demostró que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en ninguna de las 3 pruebas, sin embargo, esto lejos de ser tranquilizador resulta alarmante, ya que, al observar los resultados, según las 3 pruebas aplicadas ambas poblaciones tienen una gran cantidad de individuos que califican como individuos con deterioro cognitivo, siendo 90% parte del grupo ED y 87% en el grupo EI con la prueba de MoCA, mientras que en la sección A de la prueba TMT 66% del grupo ED y 63% del grupo EI presentan deterioro cognitivo. Si bien se esperaban resultados similares a los obtenidos en el caso de los participantes expuestos directamente, se anticipaba un menor porcentaje de individuos con deterioro cognitivo en aquellos expuestos de forma indirecta debido al tipo de exposición, y si bien la cantidad de individuos de ambos grupos estudiados con deterioro cognitivo según la evaluación de la sección B de la prueba TMT son menores, siguen siendo valores bastante elevados.

Variable		Expuesto Directamente (n=50)		Expuesto Indirectamente (n=46)		p
		N	%	N	%	
<b>Test MoCA</b>	Normal	5	10	6	13	0.640
	Deterioro Cognitivo	45	90	40	87	
<b>Test TMT A</b>	Normal	17	34	17	37	0.092
	Deterioro Cognitivo	33	66	29	63	
<b>Test TMT B</b>	Normal	28	56	23	50	0.346
	Deterioro cognitivo	22	44	23	50	

*Tabla II.4* Deterioro cognitivo detectado con las pruebas MoCA y el TMT sección A y B. Se presentan los datos como frecuencia y porcentaje señalando resultados que no demuestren un deterioro cognitivo como resultados normales, las diferencias entre los grupos se realizaron por medio de chi cuadrado. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Se pueden observar una tendencia a una mayor proporción de individuos detectados con deterioro cognitivo por la prueba MoCA en ambos grupos expuestos, 90 y 87% respectivamente, mientras que ambas secciones de la prueba TMT determina una proporción menor de individuos con deterioro cognitivo tanto en el grupo ED como EI. La prueba MoCA al ser una prueba que evalúa más dominios que el TMT, al valorar memoria, lenguaje, funcionamiento ejecutivo, habilidades visoespaciales, atención y orientación (Choreño-Parra et al., 2020) a diferencia de la prueba TMT que solamente se enfoca en las áreas de la atención, la función ejecutiva y las habilidades visoespaciales (Meneses-Meneses et al., 2023), se puede considerar que hubieron individuos con poca alteración en lo evaluado por el TMT como para no ser considerados con deterioro cognitivo pero con una mayor afección sobre las área de la memoria, el lenguaje, y la orientación, lo cual al detectarse en el MoCA deduciría mayor cantidad de individuos con deterioro cognitivo. Considerando esto se evaluaron los resultados obtenidos por los participantes en cada sección de la prueba MoCA para entender los dominios en los cuales hubo mayor afectación, así como para

inquirir si existe diferencia en alguno entre ambos grupos evaluados, presentándose en la *tabla II.5*.

<b>Parámetro</b>	<b>Expuestos directamente Media ± (DE)</b>	<b>Expuestos indirectamente Media ± (DE)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Visoespacial</b> (5 puntos)	3.10 (1.19)	3.37 (1.32)	0.138
<b>Identificación</b> (3 puntos)	2.64 (0.67)	2.55 (0.72)	0.382
<b>Memoria</b> (sin puntos)	3.30 (1.29)	3.54 (1.14)	0.179
<b>Atención</b> (6 puntos)	3.58 (1.64)	3.68 (1.58)	0.686
<b>Lenguaje</b> (3 puntos)	1.17 (0.97)	1.21 (0.92)	0.753
<b>Abstracción</b> (2 puntos)	1.50 (0.66)	1.61 (0.68)	0.326
<b>Recuerdo diferido</b> (5 puntos)	2.06 (1.51)	2.11 (1.58)	0.816
<b>Orientación</b> (6 puntos)	5.61 (0.77)	5.55 (0.61)	0.702

*Tabla II.5* Evaluación de las funciones cognitivas obtenido con los resultados de la prueba MoCA. Cada parámetro evaluado son las distintas secciones incluidas en la prueba MoCA, junto al puntaje máximo posible de cada sección. Se presentan las medias y desviaciones estándar de los puntajes obtenidos en cada sección por los individuos de ambos grupos evaluados. Las diferencias entre los grupos se realizaron usando t student. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Estos resultados demuestran que, si bien no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ED y EI en ninguna de las secciones evaluadas de manera independientes por la prueba MoCA, si existen secciones con menor rendimiento en ambos grupos, como se había especulado anteriormente. Donde se demuestra esta mayor afección es en el lenguaje y el recuerdo diferido donde la media de puntaje fue menor a la mitad de los puntos posibles obtenidos tanto en los participantes del grupo ED como EI, seguido por las habilidades visoespaciales y la atención,

donde el puntaje medio es apenas superior a la mitad de puntaje máximo posible. Esto corrobora lo deducido anteriormente, ya que, aunque se puede observar una alteración en la función cognitiva que se relaciona con las habilidades visoespaciales y la atención, ambas examinadas por medio de la prueba TMT, donde se observa un mayor déficit es en las secciones que valoran el lenguaje y el recuerdo diferido, este último siendo una medida de valoración de la memoria, áreas no evaluadas por la prueba TMT. Esto último es relevante además porque la memoria diferida es el dominio más común para diagnosticar pacientes con deterioro cognitivo leve y con enfermedad de Alzheimer temprana, especialmente por la alta sensibilidad del recuerdo diferido como prueba (Kaur et al., 2018; Zhao et al., 2012).

Un déficit en la memoria episódica evaluada por el recuerdo diferido de nueva información es el dominio más común de la función cognitiva que desencadena diagnóstico de DCL

Debido a que la prueba TMT tiene una normativa en que los resultados además de demostrar si existe deterioro cognitivo o no, pueden clasificar el deterioro cognitivo en severo o grave según los resultados, por lo cual, aplicando chi cuadrado se evaluaron estos resultados tanto de la sección A como de la sección B *tabla II.6*.

Variable	Expuesto Directamente (n=50)		Expuesto Indirectamente (n=46)		p	
	N	%	N	%		
<b>Test TMT A</b>	Normal	17	34	17	36.96	0.724
	Daño leve	6	12	8	17.39	
	Daño severo	26	52	21	45.65	
<b>Test TMT B</b>	Normal	28	56	23	50	0.526
	Daño leve	7	14	6	13.04	
	Daño severo	15	30	17	36.96	

*Tabla II.6* Deterioro cognitivo detectado con la prueba TMT sección A y B, se presentan los datos como frecuencia y porcentaje, señalando resultados que no demuestren un deterioro cognitivo como resultados normales y aquellos que presenten deterioro cognitivo divididos según el nivel de deterioro detectado en leve y severo, las diferencias entre los grupos se realizaron por medio de chi cuadrado. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Con estos resultados podemos observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el deterioro, tanto leve como severo, entre ambos grupos encontrados, observando una tendencia en ambos grupos a una mayor cantidad de voluntarios con deterioro cognitivo severo en comparación con la cantidad de voluntarios que presentaban deterioro cognitivo leve. Así mismo se puede observar que la cantidad de voluntarios que presentan deterioro cognitivo en ambos grupos estudiados es menor en la prueba TMT B, teniendo una proporción mayor de voluntarios sin deterioro detectado por la sección B (50 y 56%) a la proporción de voluntarios sin deterioro detectado por la sección A (17 y 34%), esto puede deberse que ambas secciones pese a pertenecer a una misma prueba para detectar los mismos dominios evalúan diferentes aspectos de dichos dominios por una parte la sección A evalúa la coordinación psicomotora, velocidad de procesamiento visual y la atención selectiva, mientras que la B evalúa la flexibilidad cognitiva y el procesamiento (Hasegawa & Annaka, 2022).

Los resultados obtenidos están en alineación con otros estudios como el de Ma'rufi et al en 2023 donde se estudió una población de trabajadores del campo de Indonesia para encontrar una relación entre los pesticidas y el deterioro cognitivo y comportamiento, encontrando con el uso del MoCA que el 70% de los trabajadores expuestos a los pesticidas tenían deterioro cognitivo (Ma'rufi et al., 2023), aunque este estudio tiene la limitación de no tener un grupo control para comparar y establecer una significancia, resulta útil a la hora de observar una tendencia, tanto en ese estudio como en el presente, a una mayor proporción de individuos que tienen deterioro cognitivo cuando estos tienen contacto con pesticidas observando que en ambos estudios más del 50% de los individuos expuestos a pesticidas tenían deterioro cognitivo detectado por la prueba MoCA.

Tomando en cuenta lo anterior los resultados obtenidos por el estudio de Chittrakul et al, complementan los hallazgos encontrados al usar un grupo control plantean una comparación donde

se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos por diversas pruebas neuropsicológicas, entre las que se encuentra el MoCA, teniendo los trabajadores que habían entrado en contacto con los pesticidas OP menor rendimiento en estas pruebas, llegando a detectar en estos deterioro cognitivo, a comparación de los trabajadores que aún no habían entrado en contacto con los OP (Chittrakul et al., 2022), lo cual no solamente habla de proporciones grandes de los grupos expuestos directos , si no que plantea la diferencia significativa al usar un grupo control, en consecuencia a estas afirmaciones los resultados de este experimento se verían enriquecidos en caso de usar un grupo control para hacer la comparativa de los resultados encontrados y observar si existe una diferencia significativa entre los grupos expuestos, con los controles, sin importar si la exposición es directa o indirectamente como se observó en la experimentación de Prado Guzmán et al en 2020 donde al estudiar una población rural de Tolima, Colombia evaluaron el deterioro cognitivo con el uso de varias pruebas neurológicas entre ellas la prueba TMT, encontrando que existe una diferencia significativa en los resultados con un mejor desempeño por parte del grupo no expuesto en comparación con los grupos expuestos tanto indirecta como directamente, en ambas secciones de la prueba TMT, pero especialmente en la sección B, concluyendo en que la mayor exposición a pesticidas se relacionaba con menores puntajes cognitivos, especialmente en la sección TMT A (Prado Guzmán et al., 2023), no obstante hay que tomar en cuenta diferencias socio-culturales de las poblaciones estudiadas, lo cual podría explicar que en ambos experimentos se obtengan resultados diferentes en cuanto a la diferencia significativa del desempeño de grupos con exposición directa e indirecta, de modo que la necesidad de contrastar los resultados obtenidos en este estudio con un grupo control vuelve a presentarse para una observación y análisis más completo en cuanto a los niveles de deterioro cognitivo con la exposición a pesticidas.

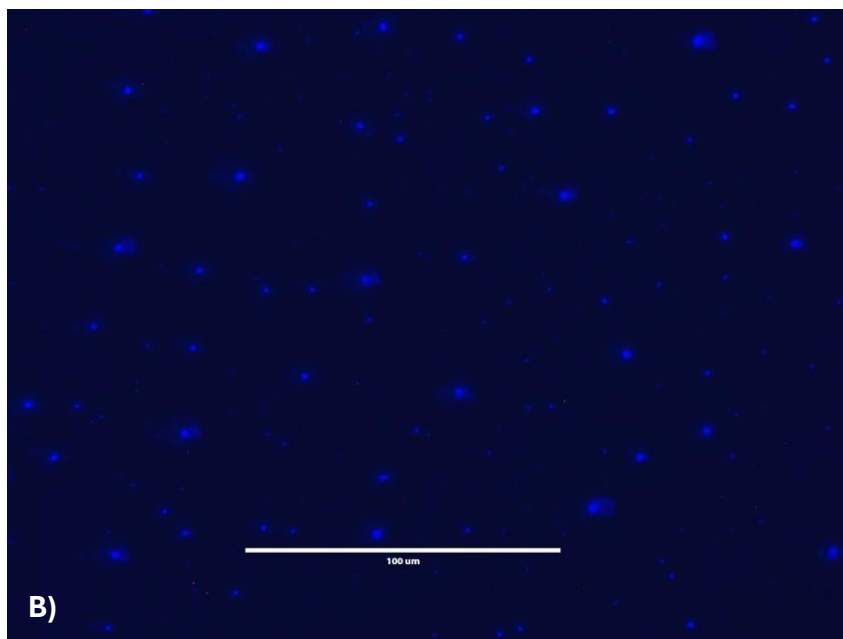
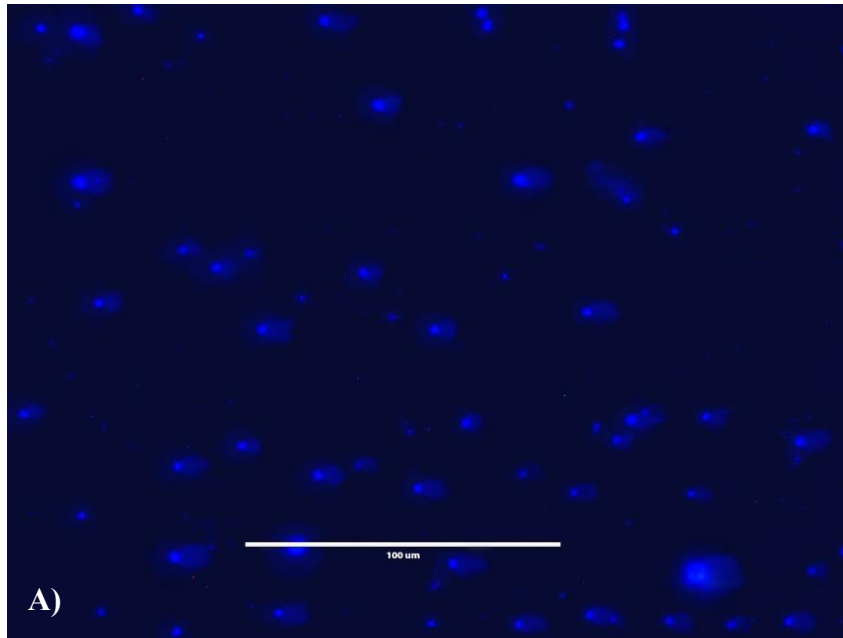
## IV.5 Estudios del daño genético

Se identificaron 100 células de cada participante con el software OpenComet y se clasificaron en base al daño al ADN en 5 categorías, considerando el tipo 0 una célula sin daño el tipo 4 como células con daño muy severo. Se obtuvieron las medias de las células pertenecientes a cada categoría de los voluntarios de ambos grupos los resultados fueron analizados por medio de t student para comparar los resultados de ambos grupos estudiados *tabla II.7*.

Parámetros	Exposición directa	Exposición indirecta	<i>p</i>
	Media $\pm$ (DE)	Media $\pm$ (DE)	
Tipo 0	1.65 (2.55)	10.16 (15.17)	<0.001
Tipo 1	3.67 (4.36)	46.97 (18.15)	<0.001
Células Tipo 2	64.15 (21.48)	39.86 (18.52)	<0.001
Tipo 3	26.60 (22.34)	2.16 (2.44)	<0.001
Tipo 4	3.86 (4.09)	0.83 (2.30)	<0.001

*Tabla II.7* Clasificación de las células con daño genético, considerando las células de tipo 0 como células sin daño o daño indetectable, las de tipo 1 con daño muy leve, las de tipo 2 con daño leve, las de tipo 3 con daño severo y las de tipo 4 como con daño muy severo, los datos se presentan en medias y desviaciones estándar, las diferencias entre los grupos se realizaron por medio de t student. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo expuesto directa e indirectamente en todas las categorías para clasificar el daño a las células. Se puede observar una diferencia significativa en la cantidad de células en promedio con ADN intacto entre el grupo ED con una media de  $1.65 \pm 2.55$ , y el grupo EI una media  $10.15 \pm 15.15$ , lo cual muestra que si bien hubieron participantes del grupo en los que todas sus células tuvieron daño una gran cantidad de participantes tuvieron células con ADN intacto a diferencia de los participantes del grupo de exposición directa.



**Figura 8.** Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia sobre las muestras de dos voluntarios donde se pueden ver varias células con y sin formación en cometa.

A) Voluntario expuesto directamente: se pueden observar a simple vista varios cometas con daño severo

B) Voluntario expuesto indirectamente: Se pueden observar a simple vista algunos cometas con daño ligero y severo y varias células sin daño al ADN

Resalta en el grupo ED que las células tendían a estar mayormente clasificadas dentro del tipo 2 y tipo 3, es decir con daño ligero y severo, mientras que en el grupo con pocos en el tipo 1, mientras que en la muestra de exposición indirecta las células se encuentran mayormente clasificadas en tipo 1 y tipo 2, es decir con daño muy ligero y con ligero, *figura 8*. De igual modo se puede encontrar un contraste entre las clasificaciones en que menos se encontraban las células, en el

grupo indirecto las células tipo 0 y 1, mientras que en el grupo indirecto había menos células clasificadas dentro del grupo 3 y 4. Sumado a las diferencias significativa, los resultados señalan una tendencia a un mayor daño al ADN en los pacientes que tienen contacto directo con aquellos pacientes que tienen un contacto indirecto, donde si bien una gran cantidad de células tienen daño, el daño tiende a ser menor teniendo incluso células con nulo daño, estos resultados se encuentran alineados con otros estudios que evidencian la relación entre el daño genético con los pesticidas como el estudio de Matheus et al donde por medio del ensayo de micronúcleos a trabajadores expuesto y no expuestos a pesticidas encontraron una diferencia significativa y una correlación positiva entre la exposición a pesticidas y la presencia de micronúcleos, los cuales surgen a consecuencia de la genotoxicidad (Matheus et al., 2017). Al mismo tiempo se puede ver una congruencia de estos resultados con los encontrados por Cayir et al en 2019, ya que estos usaron los tipos de cometas según el daño como un parámetro para encontrar una relación entre el daño genético y la exposición a pesticidas, encontrando que los trabajadores expuestos directamente a mezclas de pesticidas tenían mayor daño en el ADN en comparación al grupo control, lo cual se observaba en la cantidad de nucleoides en cada categoría de daño (Cayir et al., 2019).

El análisis de OpenComet lanzó resultados de varios parámetros, para este estudio se consideraron la intensidad del cometa, la intensidad de la cola, el largo de la cola, el momento cola y momento olive, además de parámetros basados en la clasificación de células con daño como las unidades

arbitrarias y la cantidad de células totales con daño reconocible, como los relevantes para una comparación entre ambos grupos estudiados, los cuales fueron analizados por t student *tabla II.8*.

<b>Parámetro</b>	<b>Expuesto Directamente Media ± (DE)</b>	<b>Expuesto Indirectamente Media ± (DE)</b>	<b>p</b>
Intensidad cometa	36.43 (9.33)	12.66 (2.91)	<.001
Intensidad cola	28.53 (8.18)	9.70 (2.19)	<.001
Largo cola (px)	23.86 (5.01)	23.97 (4.64)	0.915
Momento cola	22.15 (4.99)	21.19 (4.60)	0.348
Momento olive	11.69 (2.49)	11.42 (3.03)	0.966
Células totales con daño	100 (0.00)	87.97 (20.16)	<0.001
Unidades arbitrarias	228.40 (28.89)	136.53 (26.47)	<0.001

*Tabla II.8* Evaluación de la genotoxicidad obtenida por OpenComet Los datos se presentan en medias y desviaciones estándar, las diferencias entre los grupos se realizaron por medio de t student. La importancia significativa se identifica como  $p < 0.05$ .

Intensidad cometa: Contenido de ADN dividido entre el tamaño del cometa.

Intensidad cola: Contenido de ADN dividido entre el tamaño de la cola.

Largo cola: Largo de la cola en pixeles.

Momento cola: Longitud de la cola multiplicada por el % de ADN de la cola.

Momento olive: Producto del % de ADN de la cola y media de la distancia entre los centroides de cabeza y cola.

Unidades arbitrarias: Suma de los valores individuales de los 100 cometas observados, donde el tipo 0 tiene un valor de 0, el tipo 1 de 1, el tipo 2 de 2, tipo 3 de 3 y el tipo 4 de 4.

Se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos en los parámetros de intensidad del cometa con una media de  $36.43 \pm 9.33$  y  $12.66 \pm 2.91$  del grupo ED y EI respectivamente, en intensidad de la cola, con una media de  $28.53 \pm 8.18$  y  $9.70 \pm 2.19$  del grupo ED y EI respectivamente, y en las unidades arbitrarias con una media de  $228.40 \pm 28.89$  para el grupo ED y  $136.53 \pm 26.47$  en el grupo EI, coincidiendo en una tendencia a valores mayores en el grupo ED en comparación al grupo EI, mientras que, en el caso del largo de la cola, el momento cola y el momento olive, no existe una diferencia significativa entre ambos grupos. A la vez se evaluaron

las cantidades de células que tenían daño, aquellas que tenían células con daño de tipo 1 a 4, existiendo una diferencia significativa entre ambos grupos evaluando, siendo el grupo ED el que presentaba más células afectadas por la genotoxicidad.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios como el de Grover et al en 2003, donde al realizar un análisis cometa sobre los leucocitos de una población de trabajadores expuestos a pesticidas y sujetos control, encontraron una diferencia significativa entre el daño genético de los trabajadores expuestos en contraste al grupo control, aunque dicho estudio al usar el parámetro de largo de la cola, el cual era significativamente mayor en los trabajadores expuestos a los controles, no es equiparable al ser el largo de la cola uno de los parámetros sin diferencia estadísticamente significativa en la experimentación de este estudio, aunque se puede observar que en el estudio de Grover el largo de la cola entre los trabajadores con mayor exposición (aquellos con más años de exposición) con aquellos con menor exposición era ligeramente diferente (Grover et al., 2003), con lo cual se podría especular que la razón de que esta no sea significativa entre ED y EI en este sea según la cantidad de exposición siendo mayor en los ED así como en los de mayor tiempo de exposición y menor en los EI así como en los de menor tiempo de exposición, sin embargo para poder confirmar esto es necesario comparar con otro estudio en el que se hayan investigado según el tipo de exposición y no el tiempo de exposición.

Si bien los resultados pueden contraponerse a otros como lo obtenido por Piperakis et al en 2006, donde se usaron linfocitos y se cuantificó el porcentaje de ADN en la cola y la intensidad de la cola con la cual se dividieron las células según el tipo de daño presentado, encontraron que no había una diferencia significativa entre el nivel de daño del ADN de los trabajadores moderada y altamente expuestos y el grupo control (Piperakis et al., 2006), existen otros estudios que confirman los resultados de la experimentación de este trabajo presentado, además de los

mencionados anteriormente caben mencionar el de Carbajal et al en 2015, en la cual se estudió una población de trabajadores expuestos a pesticidas en Guerrero midiendo el daño al ADN por medio de un estudio cometa a células bucales, encontrando un daño significativamente mayor en el grupo expuesto a comparación del no expuesto, confirmando la genotoxicidad por un ensayo de micronúcleos llevado a cabo en esa misma experimentación (Carbajal-López et al., 2015), o la investigación de Intranuovo et al de 2018 que de igual manera a esta investigación evaluó linfocitos y encontró un mayor nivel de daños al ADN en los trabajadores expuestos ocupacionalmente a pesticidas en comparación con el grupo no expuesto que vivía en la misma zona, por medio de parámetros como unidades arbitrarias, porcentaje de ADN en la cola, largo de la cola y momento cola (Intranuovo et al., 2018).

#### IV.6 Análisis de correlación

Finalmente, los parámetros más relevantes del estudio como los resultados de las pruebas neuropsicológicas, la hemoglobina, la intensidad de la cola y del cometa, fueron analizados por una correlación de Pearson con los niveles de afección por inhibición de las colinesterasas entre ambos grupos, usando este parámetro como biomarcadores de la acción de los pesticidas colinesterásicos *tabla II.9*.

Parámetro		Exposición directa		Exposición indirecta	
		AChE	BChE	AChE	BChE
Test MoCA	r	-0.07	0.055	0.126	0.125
	p	(0.965)	(0.742)	(0.419)	(0.425)
Test TMT A	r	-0.110	-0.087	-0.160	0.010
	p	(0.279)	(0.394)	(0.120)	(0.924)
Test TMT B	r	-0.061	0.196	-0.111	0.033
	p	(0.717)	(0.238)	(0.490)	(0.840)
Tipo 1	r	-0.667	-0.296	0.013	-0.353

	<i>p</i>	(0.020)	(0.067)	(0.935)	(0.019)
	<i>r</i>	0.465	0.290	-0.293	-0.050
<b>Tipo 3</b>	<i>p</i>	(<0.001)	(0.008)	(0.054)	(0.742)
	<i>r</i>	0.147	0.266	-0.015	-0.012
<b>Tipo 4</b>	<i>p</i>	(0.183)	(0.015)	(0.925)	(0.940)
	<i>r</i>	0.524	0.302	-0.056	-0.089
<b>Intensidad del cometa</b>	<i>p</i>	(<0.001)	(0.005)	(0.716)	(0.584)
	<i>r</i>	0.489	0.287	-0.085	-0.089
<b>Intensidad de la cola</b>	<i>p</i>	(<0.001)	(0.009)	(0.583)	(0.565)
	<i>r</i>	0.178	-0.076	0.121	-0.128
<b>Unidades arbitrarias</b>	<i>p</i>	(0.278)	(0.646)	(0.440)	(0.415)

*Tabla II.9* Correlaciones entre los diversos parámetros evaluados con la disminución/inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE). Tipo 1, tipo 2, tipo 3: Cantidad de células evaluadas por estudio cometa que caen dentro de su categoría respectiva Test MoCA, Test TMT A y TMT B: Resultados obtenidos en puntaje para las pruebas. Los datos fueron analizados mediante la correlación de Pearson y los resultados se expresan como coeficientes de correlación (*r*) y *p* entre paréntesis. Se indica como importancia significativa  $p < 0.05$ .

Los resultados muestran en la exposición directa 5 parámetros en los que existe una correlación significativa con la inhibición de cualquiera de las dos enzimas estudiadas, de las cuales solamente una muestra una correlación significativa negativa, siendo esta la inhibición de AChE con la cantidad de cometas tipo 1, mientras que las demás correlaciones son positivas, dichas son en el caso de la disminución de la actividad de la AChE con la intensidad del cometa, la intensidad de la cola, y la cantidad de cometas de tipo 3; y en el caso de la inhibición a la BChE es con los mismos parámetros sumando los niveles de hemoglobina y la cantidad de cometas de tipo 4.

Por otro lado, en la exposición indirecta se puede observar una correlación significativa entre la inhibición de las colinesterasas y la cantidad de cometas de tipo 1 con la inhibición de la BChE, observando una correlación negativa significativa.

Los resultados obtenidos demuestran una correlación no fuerte, pero si significativa entre el daño genético y el efecto en de los pesticidas en los humanos medido en la inhibición a las colinesterasas. Por un lado, la correlación significativa negativa entre la cantidad de cometas de tipo 1 y la inhibición de la AChE indica que mientras mayor es la afección a la AChE se generan menores cantidades de cometas con daño muy leve, es decir, los de tipo 1 en los individuos expuestos directamente al mismo tiempo que se ve en este grupo y correlacionado a la disminución de esta misma enzima, una correlación significativa positiva con los cometas de tipo 3, lo cual expone que a menor cantidad de esta enzima mayor cantidad de cometas con daño severo se pueden observar, y si sumado la existencia de una correlación significativa positiva entre los cometas con daño muy severo y la inhibición de BChE, se puede sugerir que mientras mayor es la inhibición a las colinesterasas, se forman menos cometas con daño leve e inicia a incrementarse la formación de cometas con un daño mucho mayor, como lo son los de tipo 3 y 4, en personas que se exponen directamente a los pesticidas. Esto contrasta con lo observado en los pacientes expuestos indirectamente donde si bien se registra una significativa correlación negativa entre la inhibición de la BChE con los cometas de daño leve, al igual que en los individuos expuestos indirectamente, aunque en este relacionándose con la inhibición de la AChE, no existe una correlación entre la inhibición de ninguna colinesterasa con el aumento o disminución de cantidad de cometas con un daño mayor.

Con respecto a la intensidad del cometa y de la cola, se puede notar una clara correlación positiva significativa entre la disminución tanto de la AChE como la BChE en el grupo expuesto directamente, lo cual evidencia que mientras mayor es la afección de los pesticidas en este grupo, inhibiendo ambas colinesterasas, mayor es el nivel de daño al ADN observado en una mayor

intensidad tanto del cometa como de la cola. No obstante, en el caso de los voluntarios expuesto indirectamente no se pudo observar una correlación significativa entre estos parámetros.

Concluyendo que los niveles de intoxicación provocados por pesticidas causan un daño mayor en los individuos expuestos directamente de manera que mientras más daño enzimático provocan mayor es el daño genético medible por el ensayo cometa, mientras que en los individuos expuestos indirectamente la exposición a pesticidas si bien puede generar daño genético, los niveles de inhibición sobre las colinesterasas se correlaciona muy levemente con la genotoxicidad medible por el estudio cometa.

Mientras que no se observó ninguna correlación significativa entre el deterioro cognitivo y la inhibición de las colinesterasas en ningún grupo evaluado, lo cual contrasta con el estudio de Rosales et al se evaluó a trabajadores expuestos ocupacionalmente a pesticidas OP y encontraron por medio de una relación lineal, una correlación significativa entre la inhibición de la BChE y las puntuaciones de la prueba MMSE (Rosales-Rimache et al., 2023). Los resultados de las correlaciones de este estudio destacan considerando también los resultados de los individuos a las pruebas neuropsicológicas donde una gran cantidad de voluntarios presentaban deterioro cognitivo en ambos grupos evaluados, lo cual podría significar que el desarrollo cognitivo de la población estudiada se ve afectada por variantes socioculturales. Aunque otros estudios sobre los efectos dañinos de los pesticidas encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los grupos expuestos y controlados tampoco encontraron correlaciones significativas como la investigación Bernieri et al de 2019 donde se investigaron a trabajadores expuestos a pesticidas en Brasil y encontraron daño significativamente mayor en los agricultores expuestos durante mayor tiempo que en los expuestos durante menor tiempo, a su vez que se una inhibición de la BChE significativamente incrementada en los grupos expuestos durante mayor tiempo, sin embargo no

encontraron una correlación entre la inhibición de la BChE, el daño genético y el tiempo (Bernieri et al., 2019).

Finalmente se aplicó un análisis por correlación de Pearson entre los niveles de genotoxicidad, medida en la intensidad del cometa y la intensidad de la cola, y el deterioro cognitivo medido por las 3 pruebas, en ambos grupos expuesto, *tabla II. 10*.

Parámetro		Exposición directa		Exposición indirecta	
		Intensidad de cometa	Intensidad de cola	Intensidad de cometa	Intensidad de cola
<b>MoCA</b>	r	-0.143	-0.110	-0.350	-0.403
	p	0.198	(0.322)	(0.020)	(0.007)
<b>TMT A</b>	r	0.029	0.002	0.042	0.085
	p	0.796	(0.983)	(0.791)	(0.594)
<b>TMT B</b>	r	-0.002	0.002	0.230	0.292
	p	0.986	(0.987)	(0.143)	(0.060)

*Tabla II.10* Correlaciones entre el deterioro cognitivo medido según los resultados obtenidos en las pruebas MoCA, TMT A y TMT B y el nivel de daño genético medido en la intensidad del cometa y la intensidad de la cola entre ambos grupos evaluados. Los datos fueron analizados mediante la correlación de Pearson y los resultados se expresan como coeficientes de correlación (r) y p entre paréntesis. Se indica como importancia significativa  $p < 0.05$ .

Los resultados demuestran una correlación negativa significativa entre el daño genético medido tanto por la intensidad del cometa como la intensidad de la cola con los resultados del MoCA en el grupo EI, entendiendo que, a mayor daño genético medido por estos parámetros, menores eran los resultados de los voluntarios EI obtenidos por medio del MoCA. Si bien no hay experimentos que correlacionen estos dos parámetros en individuos expuestos ocupacional y/o ambientalmente a pesticidas con lo cual comparar estos resultados, se puede ver una congruencia con estudios que se enfocan exclusivamente a la correlación entre el deterioro cognitivo y el daño genético como el trabajo de Bortolotto et al de 2021, que se centró en el daño genético por estrés ocupacional en personal de enfermería, encontrando una asociación entre niveles deficientes de rendimiento

cognitivo, especialmente en la memoria de trabajo, y el daño al ADN medido tanto por micronúcleos como el ensayo cometa (Bortolotto et al., 2021), o la investigación de Lee et al en 2009 que estudió una población de edad avanzada encontrando una correlación entre el deterioro cognitivo y el daño al ADN medido por el estudio cometa exclusivamente en el parámetro de porcentaje de ADN en cola ((Lee et al., 2009)).

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES**

En esta investigación se observaron los efectos de los pesticidas en diferentes parámetros que afectan la salud de los individuos que puedan ser expuestos tanto directa como indirectamente, con un enfoque en los pesticidas OPs, los cuales son los más utilizados por empresas agrícolas mexicanas. Se pudo observar de manera bastante preocupante, un alto porcentaje de individuos con deterioro cognitivo en ambos grupos de participantes evaluados, un hallazgo bastante alarmante que puede indicar el grave efecto neurológico de los pesticidas, aunque la falta de una diferencia significativa entre ambos grupos pueda significar que el deterioro cognitivo este viéndose amplificado por otras variables ambientales y socioculturales.

Al encontrar concentraciones de BDNF significativamente menores en los individuos del grupo expuesto directamente en comparación al grupo expuesto indirectamente se recalcan los efectos neurotóxicos de los pesticidas, reiterando los antecedentes que sugieren una alteración directa de los pesticidas sobre esta proteína y al juntar estos resultados con los obtenidos con las pruebas neuropsicológicas se puede sugerir una hipótesis en la cual si bien ya existe un declive cognitivo en los pacientes con exposición indirecta, los niveles de pesticidas no llegan a disminuir tanto como en pacientes con una exposición más concentrada como es en el caso de la exposición directa y al no existir un grupo control sobre el que se experimentara en esta exposición solo se puede especular si los niveles de exposición indirecta se encuentran disminuidos, aumentados o similares a los de una población no afectada por pesticidas y por consiguiente si se afectaron las rutas y/o genes que codifican para el BDNF en caso de encontrarse disminuidos, o si al contrario estos se encuentran aumentados como un mecanismo de protección para la supervivencia neuronal.

Respecto a la genotoxicidad, esta fue medida mediante parámetros del estudio cometa, encontrando que existen daño al ADN en ambas poblaciones estudiadas con un daño significativamente mayor en la población con una exposición directa a los pesticidas, lo cual se

puede ver en la cantidad de células que tenían daño en ambas poblaciones y los parámetros de intensidad de la cola e intensidad del cometa, siendo congruente con otros estudios y reafirmando la hipótesis que asevera el daño que causan los pesticidas, siendo la causa el estrés oxidativo causado por los pesticidas.

Por último, en las enzimas colinesterasas, usadas en el estudio como biomarcadores para confirmar el efecto de los pesticidas, se identificó una tendencia hacia la inhibición de la actividad de la butirilcolinesterasa, más no en la acetilcolinesterasa, por lo tanto, los grupos sobre los que se estudio pudieron tener contacto con pesticidas o sustancias que inhibieran la acción de los OPs sobre la acetilcolinesterasa. Esta inhibición nos indica y confirma que los individuos partícipes en el estudio tuvieron exposición a los pesticidas, además de sugerir que no solamente a pesticidas OPs, si no que puede que a mezclas de diversos pesticidas de otro tipo, esto a su vez señala que los efectos sobre el ADN y la plenitud cognitiva fueron causados no solamente por OPs, sino por algún otro pesticida que afecte otras dianas, y si bien esta hipótesis no puede descartarse sería necesario una confirmación sobre los pesticidas con los que los individuos trabajaron y los que utilizan la empresa de la zona donde viven.

Esta investigación ayuda a comprender de mejor manera los efectos neuro y genotóxicos de los pesticidas sobre poblaciones que trabajen y convivan con ellos habitualmente, encontrando ciertas diferencias, tendencias y similitudes entre ambos grupos, lo cual pone un enfoque mayor en la necesidad de proteger esta población vulnerable divulgando información simple pero efectiva y completa entre los propios individuos que tengan contacto con la intención de que estos comprendan los peligros a los que se enfrentan y puedan cambiar sus hábitos a un mayor cuidado, una mejor protección y hábitos higiénicos, a su vez que debe aumentarse la presión sobre las empresas que utilizan estos trabajadores para que velen por la salud de ellos así como la de la

población que habita en las zonas donde suelen trabajar, con la finalidad que estas mismas empresas otorguen material de trabajo y protección adecuado sobre los trabajadores, cuide el tipo de pesticidas y mezclas que utilizan así como informen a los trabajadores constantemente maneras de cuidarse, riesgos, y tengan una buena atención a la salud en caso de que algún trabajador desarrolle síntomas de una intoxicación tanto aguda como crónica.

## **CAPITULO VI PROYECTOS A FUTURO**

Los trabajos que pueden hacerse en un futuro pueden tener dos enfoques principales, mejorar los trabajos presentados intentando minimizar las limitaciones de este trabajo, incluyendo un grupo control para una mejor referencia y comparativa, así como agregar otras pruebas experimentales. El otro enfoque es explorar en las áreas que no se han profundizado en este trabajo, como los hábitos de los trabajadores o estudiar correlacionar los pesticidas con los que tengan contacto y la genotoxicidad y/o deterioro cognitivo.

Por un lado, puede profundizarse el estudio tanto de la genotoxicidad como del deterioro cognitivo incluyendo otras pruebas. En el caso de la genotoxicidad puede realizarse otro ensayo de carácter rápido que pueda hacerse a los voluntarios, como un estudio de micronúcleos, el cual si bien por sí solo no presenta resultados contundentes puede usarse como complemento, esto pues se necesita solamente una muestra de saliva lo cual permite que incluso pacientes que puedan negarse a ser puncionados puedan participar. En el caso del deterioro cognitivo, una prueba como la MSSE por su rapidez y fácil aplicación puede complementar los resultados obtenidos con el MoCA, así como alguna otra prueba rápida como el test del reloj, aunque el MSSE por su validez en español puede ser una mejor opción complementaria.

Por otro lado, puede hacerse un estudio con una inclinación a recaudar información sobre los hábitos de los trabajadores y las empresas con respecto a los plaguicidas, ya que, si bien al momento de hacer la recolección de datos los voluntarios comentaban algunas cosas sobre la manera en que trabajaban o lo que conocían, dicha información no fue recolectada. Además, contar con un estudio de esta índole demostraría lo que otros estudios mencionan sobre la falta de una adecuada instrucción a los trabajadores agrícolas que están en contacto con pesticidas y como esto afecta teniendo mayor facilidad a incidentes de toxicidad crónica.

Para profundizar el estudio puede optarse también por investigar que pesticidas son con los que tienen en contacto los trabajadores según los metabolitos urinarios que puedan detectarse, inclinando el estudio a correlacionar específicos pesticidas o mezclas de estos con los efectos sobre los parámetros estudiados. Esto quitaría la limitante de desconocer con exactitud los pesticidas que utilizan, ya que los trabajadores no respondían a dicho cuestionamiento al ignorar ellos mismos las sustancias con las que trabajan. Por ende, una investigación en la cual se estudien residuos urinarios de metabolitos puede dar información suficiente para correlacionar los pesticidas con los parámetros como el deterioro cognitivo como la genotoxicidad, y por ende tener una mejor comprensión sobre como los tipos de pesticidas y mezclas están afectando estos parámetros.

## **CAPÍTULO VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Arango-Lasprilla, J. C., Rivera, D., Aguayo, A., Rodríguez, W., Garza, M. T., Saracho, C. P., Rodríguez-Agudelo, Y., Aliaga, A., Weiler, G., Luna, M., Longoni, M., Ocampo-Barba, N., Galarza-Del-Angel, J., Panyavin, I., Guerra, A., Esenarro, L., García De La Cadena, P., Martínez, C., & Perrin, P. B. (2015). Trail Making Test: Normative data for the Latin American Spanish speaking adult population. *NeuroRehabilitation*, 37(4), 639–661. <https://doi.org/10.3233/NRE-151284>
- Ardebili Dorri, S., Hosseinzadeh, H., Abnous, K., Vahdati Hasani, F., Yazdian Robati, R., Marjan Razavi, B., Dorri, A. S., Hasani, V. F., & Robati, Y. R. (2015). Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on malathion induced depressive-like behavior in subacute exposure and protective effects of crocin. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18, 958–966.
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications. In *Archives of Medical Science* (Vol. 11, Issue 6, pp. 1164–1178). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Bedman, F. (2011). ¿Qué son los plaguicidas? *Ciencia Hoy*, 21, 11–16.
- Benítez Del Rosario, M. A. (2002). Diagnosis of cognitive impairment: methodological problems at the frontier of cognitive normality. *Atencion Primaria / Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria*, 30(1), 14–15. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(02\)78957-9](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(02)78957-9)
- Bernardino-Hernández, H. U., Mariaca-Méndez, R., Nazar-Beutelspacher, A., Álvarez-Solís, J. D., Torres-Dosal, A., & Herrera-Portugal, C. (2019). Conocimientos, conductas y síntomas de intoxicación aguda por plaguicidas entre productores de tres sistemas de producción agrícolas en los Altos de Chiapas, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 35(1), 7–23. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.01.01>
- Bernieri, T., Moraes, M. F., Ardenghi, P. G., & Basso da Silva, L. (2019). Assessment of DNA damage and cholinesterase activity in soybean farmers in southern Brazil: High versus low pesticide exposure. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 55(4), 355–360. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1704608>
- Bolognesi, C., & Morasso, G. (2000). Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 182–187.
- Bortolotto, I., de Brum, A. P. S., Guecheva, T. N., de Souza, L. M., de Paula-Ramos, A. L. L., Trindade, C., & Consiglio, A. R. (2021). DNA damage, salivary cortisol levels, and cognitive

- parameters in a nursing team. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 861–862. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503300>
- Capó, M. A., & Frejo, M. T. (2007). Toxicogenómica: Una nueva rama de la toxicología. *Medicina Balear*, 22(3), 25–29.
- Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. E., & Martínez-Arroyo, A. (2015). Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2513–2520. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5474-7>
- Carlock, L. L., Chen, W. L., Gordon, E. B., Killeen, J. C., Manley, A., Meyer, L. S., Mullin, L. S., Pendino, K. J., Percy, A., Sargent, D. E., Seaman, L. R., Svanborg, N. K., Stanton, R. H., Tellone, C. I., & Goethem, D. L. V. (1999). Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: Divergent approaches and interpretations. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 2(2), 105–160. <https://doi.org/10.1080/109374099281197>
- Castillo Ordoñez, W. O., & Velasco Reyes, M. A. (2023). Progresos y retos de la Toxicología Genética. *Revista Toxicol*, 40, 81–86.
- Cayir, A., Coskun, M., Coskun, M., & Cobanoglu, H. (2019). Comet assay for assessment of DNA damage in greenhouse workers exposed to pesticides. *Biomarkers*, 24(6), 599. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1610498>
- Chittrakul, J., Sapbamrer, R., & Hongsibsong, S. (2022). Exposure to organophosphate insecticides, inappropriate personal protective equipment use, and cognitive performance among pesticide applicators. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1060284>
- Choreño-Parra, J. A., De La Rosa-Arredondo, T., & Guadarrama-Ortíz, P. (2020). Abordaje diagnóstico del paciente con deterioro cognitivo en el primer nivel de atención. *Medicina Interna de México*, 36((6)), 807–824. [www.medicinainterna.org.mx](http://www.medicinainterna.org.mx)
- Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C., & Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 345). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109531>
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., & Štětina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>
- Colucci-D'amato, L., Speranza, L., & Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain

- cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20, pp. 1–29). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>
- Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios CEMAR. (2024). *Guía sobre pruebas de genotoxicidad e interpretación de datos para medicamentos destinados a uso humano* (COFEPRIS, Ed.).
- Costa, T. S. (2005). SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO. In *Hospital Mar-Esperanza-Barcelona*. [http://www.scartd.org/arxiu/fisio\\_sna05.pdf](http://www.scartd.org/arxiu/fisio_sna05.pdf)
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
- Dautan, D., Souza, A. S., Huerta-Ocampo, I., Valencia, M., Assous, M., Witten, I. B., Deisseroth, K., Tepper, J. M., Bolam, J. P., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2016). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nature Neuroscience*, 19(8), 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/nn.4335>
- De Los Ríos, I., Sánchez, P., González, D., & García, J. (2005). Neuropatía periférica y deterioro de las funciones cognitivas asociados a exposición crónica a organofosforados. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 43(6), 479–486. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=46&IDARTICULO=5021&IDPUBLICACION=629>
- Díaz Osorio, L. (2021). Identificación Del Polimorfismo rs662 del gen PON1 Relacionado A La Deficiencia Cognitiva Por La Exposición A Plaguicidas Organofosforados Por Medio De Genética Poblacional En La Población De Aquitania, Boyacá. *Universidad de Los Andes*, 1–12.
- Durán-Cristiano, S. C. (2022). Actividad colinérgica y su papel en el sistema visual. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 96(2S), 82–92. <https://doi.org/10.24875/rmo.m21000214>
- Esquivel-Valenzuela, B., Cueto-Wong, J. A., Valdez-Cepeda, R. D., Pedroza-Sandoval, A., Trejo-Calzada, R., & Pérez-Veyna, Ó. (2019). Prácticas de manejo y análisis de riesgo por el uso de plaguicidas en la Comarca Lagunera, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(1), 25–33. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.01.02>
- FAO,OMS. (2019). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas OMS y FAO*.
- Fernández A, D. G., Mancipe G, L. C., & Fernández, D. C. (2010). INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS Introducción Plaguicidas. *Revista Med*, 18(1), 84–92.
- Fernández Prieto, R. M., Ramallo Bravo, A., Carmona Carmona, G., & Carrasco Jiménez, M. S. (2011). Papel de las colinesterasas plasmáticas. Actualización. In *Revista Española de*

- Anestesiología y Reanimación* (Vol. 58, Issue 8, pp. 508–516). Elsevier Doyma. [https://doi.org/10.1016/S0034-9356\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S0034-9356(11)70126-8)
- Flores Soto, S. T. (2005). Estructura y función de los receptores nicotínicos. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315–326.
- Fundación Heinrich Böll, Amigos de la Tierra, & Pesticide Action Network. (2023). *Atlas de los pesticidas*. <https://www.tierra.org/wp-content/uploads/2023/04/Atlas-pesticidas-Amigos-Tierra.pdf>
- Grover, P., Danadevi, K., Mahboob, M., Rozati, R., Banu, B. S., & Rahman, M. F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. In *Mutagenesis* (Vol. 18, Issue 2). <http://mutage.oxfordjournals.org/>
- Hasegawa, N., & Annaka, H. (2022). Cognitive features of adult focal epilepsy with unknown etiology revealed by the trail making test. *Epilepsy and Behavior*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108625>
- Herrera Moreno, J. F., Benitez Trinidad, A. B., Xotlanihua Gervacio, M. D. C., Bernal Hernández, Y. Y., Medina Díaz, I. M., Barrón Vivanco, B. S., González Arias, C. A., Pérez Herrera, N. E., & Rojas García, A. E. (2018a). Factores de riesgo de exposición durante el manejo y uso de plaguicidas en fumigadores urbanos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34, 33–44. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.03>
- Herrera Moreno, J. F., Benitez Trinidad, A. B., Xotlanihua Gervacio, M. D. C., Bernal Hernández, Y. Y., Medina Díaz, I. M., Barrón Vivanco, B. S., González Arias, C. A., Pérez Herrera, N. E., & Rojas García, A. E. (2018b). Factores de riesgo de exposición durante el manejo y uso de plaguicidas en fumigadores urbanos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34, 33–44. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.03>
- Intranuovo, G., Schiavulli, N., Cavone, D., Birtolo, F., Cocco, P., Vimercati, L., Macinagrossa, L., Giordano, A., Perrone, T., Ingravallo, G., Mazza, P., Strusi, M., Spinosa, C., Specchia, G., & Ferri, G. M. (2018). Assessment of DNA damages in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides by comet assay in a cross-sectional study. *Biomarkers*, 23(5), 462–473. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1443513>
- Janoš, T., Ottenbros, I., Bláhová, L., Šenk, P., Šulc, L., Pálešová, N., Sheardová, J., Vlaanderen, J., & Čupr, P. (2023). Effects of pesticide exposure on oxidative stress and DNA methylation urinary biomarkers in Czech adults and children from the CELSPAC-SPECIMEn cohort. *Environmental Research*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115368>
- Kapeleka, J. A., Sauli, E., & Ndakidemi, P. A. (2021). Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. In *International Journal of Environmental Health Research* (Vol. 31, Issue 7, pp. 805–822). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1690132>

- Kaur, A., Edland, S. D., & Peavy, G. M. (2018). The MoCA-Memory Index Score: An Efficient Alternative to Paragraph Recall for the Detection Of Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 32(2), 120–124. <https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000240>
- Kim, J. Y., Park, S. jin, Kim, S. K., Kim, C. S., Kim, T. H., Min, S. H., Oh, S. S., & Koh, S. B. (2019). Pesticide exposure and cognitive decline in a rural South Korean population. *PLoS ONE*, 14(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213738>
- Larrea Poma, M., Tirado Bustillos, N., & Eugenia Ascarrunz, M. G. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay Genotoxic damage caused by exposure to pesticides in farmers Luribay Township. *Biofarbo*, 18(2), 31–43.
- Lee, L. K., Shahar, S., & Rajab, N. F. (2009). Serum folate concentration, cognitive impairment, and DNA damage among elderly individuals in Malaysia. *Nutrition Research*, 29(5), 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.05.006>
- Lobo, T. M., & Bolaños, A. (2014). Micronucleos biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud. Universidad de Carabobo*, 18(2), 18–26.
- López Trigo, J. A., Arriola Manchola, E., Carnero Pardo, C., Freire Pérez, A., López Mongil, R., Manzano Palomo, S., & Olazarán Rodríguez, J. (2014). Deterioro cognitivo leve y afectividad en el adulto mayor. In *Revista del Hospital Psiquiatrico de la Habana* (Vol. 11, Issue 2).
- López-Durán, R. M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., García-Suárez, M. D., Muñoz-Nava, H., Hernández-Hernández, Á., Vidal-Moreno, C., & Gómez-Olivares, J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: Blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34, 69–80. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.06>
- Luna-Gonzalez, J., Martin-Gonzalez, A., Brito-Loeza, C., Espinosa-Romero, A., & Pacheco-Pantoja, E. (2018). Introducción a Técnicas de Segmentación de Células del Ensayo Cometa. *Revista Académica de La Facultad de Ingenieria Univerisad Autónoma de Yucatán*, 22(3).
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *EXCLI Journal*, 17, 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>
- Margulis, L. E., Squillace Louhau, M. R., & Ferreres, A. R. (2018). Baremo del tmt para capital federal y gran buenos aires. *Revista Argentina de Ciencias Del Comportamiento*, 10(3), 54–63.

- Ma'rufi, I., Rif'ah, E. N., Wathon, S., & Ali, K. (2023). Pesticide use behavior, cognitive impairment and the model of safety standard of pesticide use among farmworkers in Indonesia. *F1000Research*, *12*, 174. <https://doi.org/10.12688/f1000research.129475.1>
- Matheus, T., Aular, Y., Bolaños, A., Fernández, Y., Barrios, E., & Hung, M.-L. (2017). Actividad de butirilcolinesterasa y micronúcleos en trabajadores agrícolas expuestos a mezclas de plaguicidas. *Salud de Los Trabajadores*, *25*(1), 23–36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375853771003>
- Maurer, S. V., & Williams, C. L. (2017). The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. *Frontiers in Immunology*, *8*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>
- Medina, O. M., Sánchez, L. H., & Flórez-Vargas, O. (2015). Actividad enzimática colinesterasa en muestras de sangre humana: efecto de las condiciones de almacenamiento Cholinesterase enzyme activity in human blood samples: effects of the store conditions. *Revista de La Universidad Industrial de Santander*, *47*(2), 151–158. <http://www.redalyc.org/pdf/3438/343839278006.pdf>
- Meneses-Meneses, A. Y., Flores-Paredes, E. G., & Poenitz, A. V. (2023). Trail Making Test TMT: First approach to the psychometric properties in the adult Ecuadorian population. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, *32*(2), 49–54. <https://doi.org/10.46997/revecuatneurol32200049>
- Menz, J., Götz, M. E., Gündel, U., Gürtler, R., Herrmann, K., Hessel-Pras, S., Kneuer, C., Kolrep, F., Nitzsche, D., Pabel, U., Sachse, B., Schmeisser, S., Schumacher, D. M., Schwerdtle, T., Tralau, T., Zellmer, S., & Schäfer, B. (2023). Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data. In *Archives of Toxicology* (Vol. 97, Issue 9, pp. 2303–2328). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03553-w>
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Costa Pereira, C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., ... Langie, S. A. S. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. In *Nature Protocols* (Vol. 15, Issue 12, pp. 3817–3826). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Noble, E. E., Billington, C. J., Kotz, C. M., & Wang, C. (2011). The lighter side of BDNF. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *300*, 1053–1069. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00776.2010.-Brain-derived>

- Ojha, A., & Srivastava, N. (2014). In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.01.007>
- Olive, P. L. (2002). The Comet Assay An Overview of Techniques. In V. V. Didenko (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 203, pp. 179–194). Human Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:179>.
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- OMS, & FAO. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. <https://doi.org/13604S/1/12.14>
- Orias-Vásquez, M. (2020). CUERPO EDITORIAL Intoxicación por organofosforados Organophosphate poisoning. *Revista Médica de Sinergia*, 5(8).
- Ortega Freyre, E. G., Carrera García, M. A., Intriago Ortega, M. P., Lares Bayona, E. F., & Quintanar Escorza, M. A. (2016). Asociación de la exposición ocupacional a plaguicidas organofosforados con el daño oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa. *Revista de Toxicología*, 33, 39–43.
- Özdemir, S., Altun, S., Özkaraca, M., Ghosi, A., Toraman, E., & Arslan, H. (2018). Cypermethrin, chlorpyrifos, deltamethrin, and imidacloprid exposure up-regulates the mRNA and protein levels of bdnf and c-fos in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 203, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.190>
- Park, S. E., Jeong, S. H., Yee, S. B., Kim, T. H., Soung, Y. H., Ha, N. C., Kim, N. D., Park, J. Y., Bae, H. R., Park, B. S., Lee, H. J., & Yoo, Y. H. (2008). Interactions of acetylcholinesterase with caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation. *Carcinogenesis*, 29(4), 729–737. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn036>
- Pino Vázquez, A., & Brezmes Raposo, M. (2021). Intoxicación por organofosforados. *Asociación Española de Pediatría*, 1, 793–801. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73839-X](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73839-X)
- Piperakis, S. M., Kontogianni, K., Siffel, C., & Piperakis, M. M. (2006). Measuring the effects of pesticides on occupationally exposed humans with the comet assay. *Environmental Toxicology*, 21(4), 355–359. <https://doi.org/10.1002/tox.20191>
- Pizarro, Á. G., Peralta, E. A., Muñoz-quezada, M. T., & Mondaca, B. L. (2018). EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y POLINEUROPATÍA PERIFÉRICA EN TRABAJADORES DE LA REGIÓN DEL MAULE, CHILE. *Revista Española de Salud Pública*, 92, 1–10.
- Prado Flores, M. G., García Ramírez, M. de J., & García Casillas, A. C. (2019). *Los plaguicidas organofosforados, beneficios y riesgos Prado*.

- Prado Guzmán, K., Puerta Cortés, D. X., & Poveda Cuellar, J. L. (2023). Effect of pesticides on cognitive and motor performance in habitants of rural areas of Tolima. *Psicología Desde El Caribe*, 39(03). <https://doi.org/10.14482/psdc.39.3.152.519>
- Pu, X., Wang, Z., & Klaunig, J. E. (2015). Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. *Current Protocols in Toxicology*, 2015, 3.12.1-3.12.11. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>
- Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efecto de los plaguicidas sobre el ambiente y salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223240764010>
- Ramírez, J. a, & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67–75. <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>
- Rodríguez Serrano, L. M. (2016). *Participación del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) en la extinción de una memoria aversiva a los sabores* [Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez-Carrillo, A., DCruz, S. C., Mustieles, V., Suárez, B., Smagulova, F., David, A., Peinado, F., Artacho-Cordón, F., López, L. C., Arrebola, J. P., Olea, N., Fernández, M. F., & Freire, C. (2022). Exposure to non-persistent pesticides, BDNF, and behavioral function in adolescent males: Exploring a novel effect biomarker approach. *Environmental Research*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113115>
- Rojas, L. S. (2019). Deterioro cognitivo moderado y factores de riesgo. *Revista Clínica de La Escuela de Medicina UCR-HSJD*, 9(5), 16–22.
- Rosales, J. (2015a). Uso de Marcadores genotoxicológicos para la evaluación de agricultores expuestos a plaguicidas organofosforados. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(3), 247–252.
- Rosales, J. (2015b). Uso de marcadores genotoxicológicos para la evaluación de agricultores expuestos a plaguicidas organofosforados. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(3), 247. <https://doi.org/10.15381/anales.v76i3.11233>
- Rosales-Rimache, J., Machado-Pereyra, P., & Bendezu-Quispe, G. (2023). Relationship between Butyrylcholinesterase Activity and Cognitive Ability in Workers Exposed to Chlorpyrifos. *Safety*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/safety9010012>
- Saborío Cervantes, Is. E., Mora Valverde, M., & Durán Monge, M. del P. (2019). Intoxicacion Por Organofosforados. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 298.
- SADER, & SENASICA. (2019). *MANUAL PARA EL BUEN USO Y MANEJO DE PLAGUICIDAS EN CAMPO*.

- SAGARPA, & FAO. (2012). *MÉXICO: EL SECTOR AGROPECUARIO ANTE EL DESAFÍO DEL CAMBIO CLIMÁTICO VOLUMEN I*.
- Sanabria, A., Alvarado-Echeverria, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(2), 76–87. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2017/rmn172h.pdf>
- Sapbamrer, R., & Nata, S. (2014). Health symptoms related to pesticide exposure and agricultural tasks among rice farmers from northern Thailand. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 19(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s12199-013-0349-3>
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Paronama Agroalimentario 2022. *Sader*, 1–218.
- Serobyán, N., Jagannathan, S., Orlovskaya, I., Schraufstatter, I., Skok, M., Loring, J., & Khaldoyanidi, S. (2007). The cholinergic system is involved in regulation of the development of the hematopoietic system. *Life Sciences*, 80(24–25), 2352–2360. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.04.017>
- Silver, M. A., Shenhav, A., & D’Esposito, M. (2008). Cholinergic Enhancement Reduces Spatial Spread of Visual Responses in Human Early Visual Cortex. *Neuron*, 60(5), 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.038>
- Skaper, S. D. (2017). Neurotrophic factors: An overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1727, pp. 1–17). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_1)
- Srivastava, R., Mishra, N., Singh, U. M., & Srivastava, R. (2016). Genotoxicity: mechanisms and its impact on human diseases. *Octa Journal of Biosciences*, 4(3), 67–70. <https://doi.org/10.4172/2329>
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1089–1098). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- WHO. (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. *World Health Organization Chronicle*, 29(10), 397–401.
- Wongta, A., Hongsibsong, S., Xu, Z. L., Chantara, S., Pattarawarapan, M., Sapbamrer, R., Sringarm, K., Sawarng, N., & Tongjai, P. (2023). The Relationship of Organophosphate Pesticide Exposure and Cognitive Decline Among Residents of an Agricultural Area in Northern Thailand. *Journal of Health Research*, 37(6), 372–379. <https://doi.org/10.56808/2586-940X.1035>
- Xiang, A. C., Xie, J., & Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase in intestinal cell differentiation involves G2/M cell cycle arrest. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), 1768–1779. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8016-3>

- Zazpe, A., & Río, J. Del. (1997). Neurotrofinas 1: Aspectos moleculares Palabras clave. In *Rev Med Univ Navarra* (Vol. 41).
- Zhao, Q., Lv, Y., Zhou, Y., Hong, Z., & Guo, Q. (2012). Short-Term Delayed Recall of Auditory Verbal Learning Test Is Equivalent to Long-Term Delayed Recall for Identifying Amnestic Mild Cognitive Impairment. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051157>
- Zuñiga Venegas, L. A. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. [Doctorado]. Universidad Autónoma de Barcelona.

## **CAPÍTULO VIII. ANEXOS**

# Anexo 1. Prueba MoCA (Montreal Cognitive Assessment)

## MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) (EVALUACIÓN COGNITIVA MONTREAL)

NOMBRE:  
Nivel de  
estudios:  
Sexo:

Fecha de nacimiento:  
FECHA:

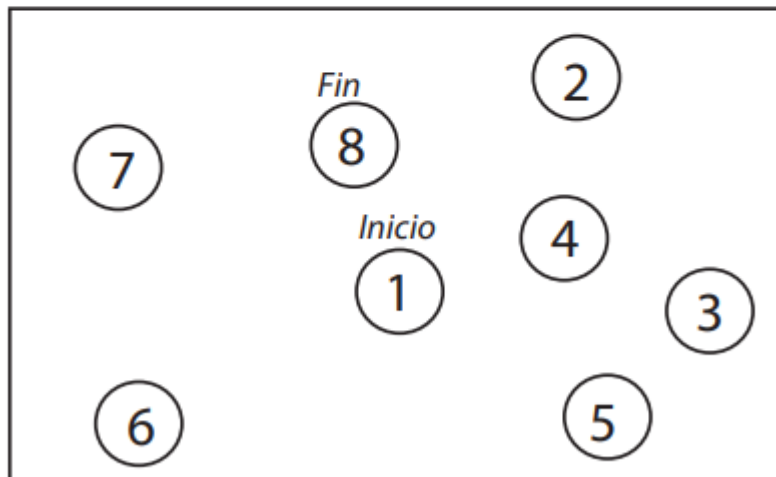
VISUOESPACIAL / EJECUTIVA							Puntos	
		<p>Copiar el cubo</p>		<p>Dibujar un reloj (Once y diez) (3 puntos)</p>			<p>___/5</p>	
<p>[ ]</p>		<p>[ ]</p>		<p>[ ] Contorno</p>	<p>[ ] Números</p>	<p>[ ] Agujas</p>		
IDENTIFICACIÓN								
							<p>___/3</p>	
<p>[ ]</p>		<p>[ ]</p>		<p>[ ]</p>				
MEMORIA	<p>Lea la lista de palabras, el paciente debe repetirlas. Haga dos intentos. Recuérdese las 5 minutos más tarde.</p>		ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	<p>Sin puntos</p>
		1er intento						
		2º intento						
ATENCIÓN	<p>Lea la serie de números (1 número/seg.) El paciente debe repetirla. [ ] 2 1 8 5 4 El paciente debe repetirla a la inversa. [ ] 7 4 2</p>						<p>___/2</p>	
<p>Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si <math>\geq 2</math> errores.</p>		<p>[ ] FBACMNAAJKLBAFAKDEAAAJAMOFAB</p>					<p>___/1</p>	
<p>Restar de 7 en 7 empezando desde 100.</p>		[ ] 93	[ ] 86	[ ] 79	[ ] 72	[ ] 65	<p>___/3</p>	
<p>4 o 5 sustracciones correctas: 3 puntos, 2 o 3 correctas: 2 puntos, 1 correcta: 1 punto, 0 correctas: 0 puntos.</p>								
LENGUAJE	<p>Repetir: El gato se esconde bajo el sofá cuando los perros entran en la sala. [ ] Espero que él le entregue el mensaje una vez que ella se lo pida. [ ]</p>						<p>___/2</p>	
<p>Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "P" en 1 min. [ ] _____ (N <math>\geq</math> 11 palabras)</p>							<p>___/1</p>	
ABSTRACCIÓN	<p>Similitud entre p. ej. manzana-naranja = fruta [ ] tren-bicicleta [ ] reloj-regla</p>						<p>___/2</p>	
RECUERDO DIFERIDO	<p>Debe acordarse de las palabras SIN PISTAS</p>	ROSTRO	SEDA	IGLESIA	CLAVEL	ROJO	<p>Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente</p>	
		[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]		
Optativo	Pista de categoría							
	Pista elección múltiple							
ORIENTACIÓN	<p>[ ] Día del mes (fecha) [ ] Mes [ ] Año [ ] Día de la semana [ ] Lugar [ ] Localidad</p>						<p>___/6</p>	
<p>© Z. Nasreddine MD Versión 07 noviembre 2004 www.mocatest.org</p>		<p>Normal <math>\geq</math> 26 / 30</p>			<p>TOTAL ___/30</p>		<p>Añadir 1 punto si tiene <math>\leq</math> 12 años de estudios</p>	

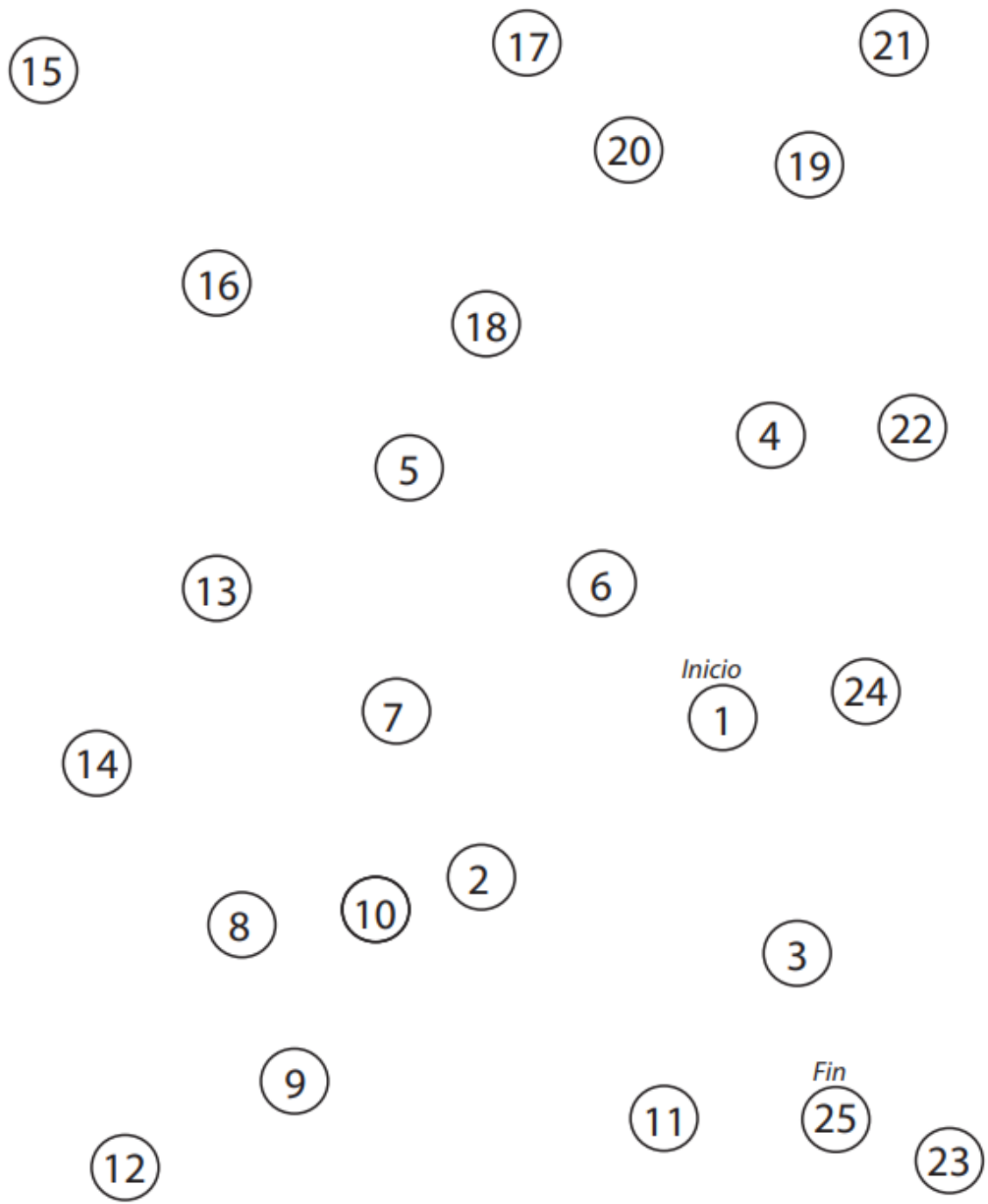
## Anexo 2. Prueba TMT (Trial Making Test)

### Trail Making Test

Parte A

PRÁCTICA

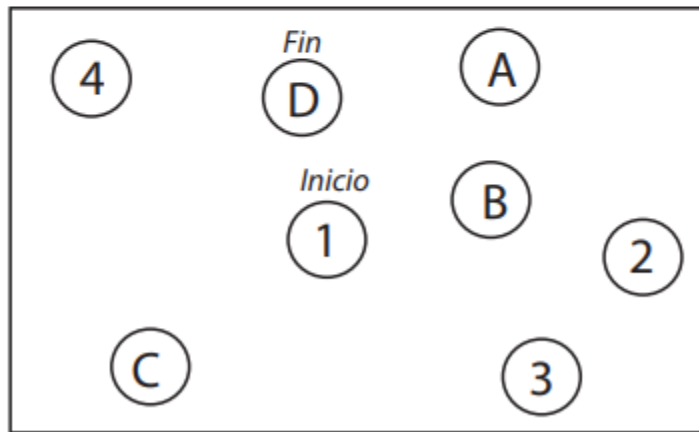


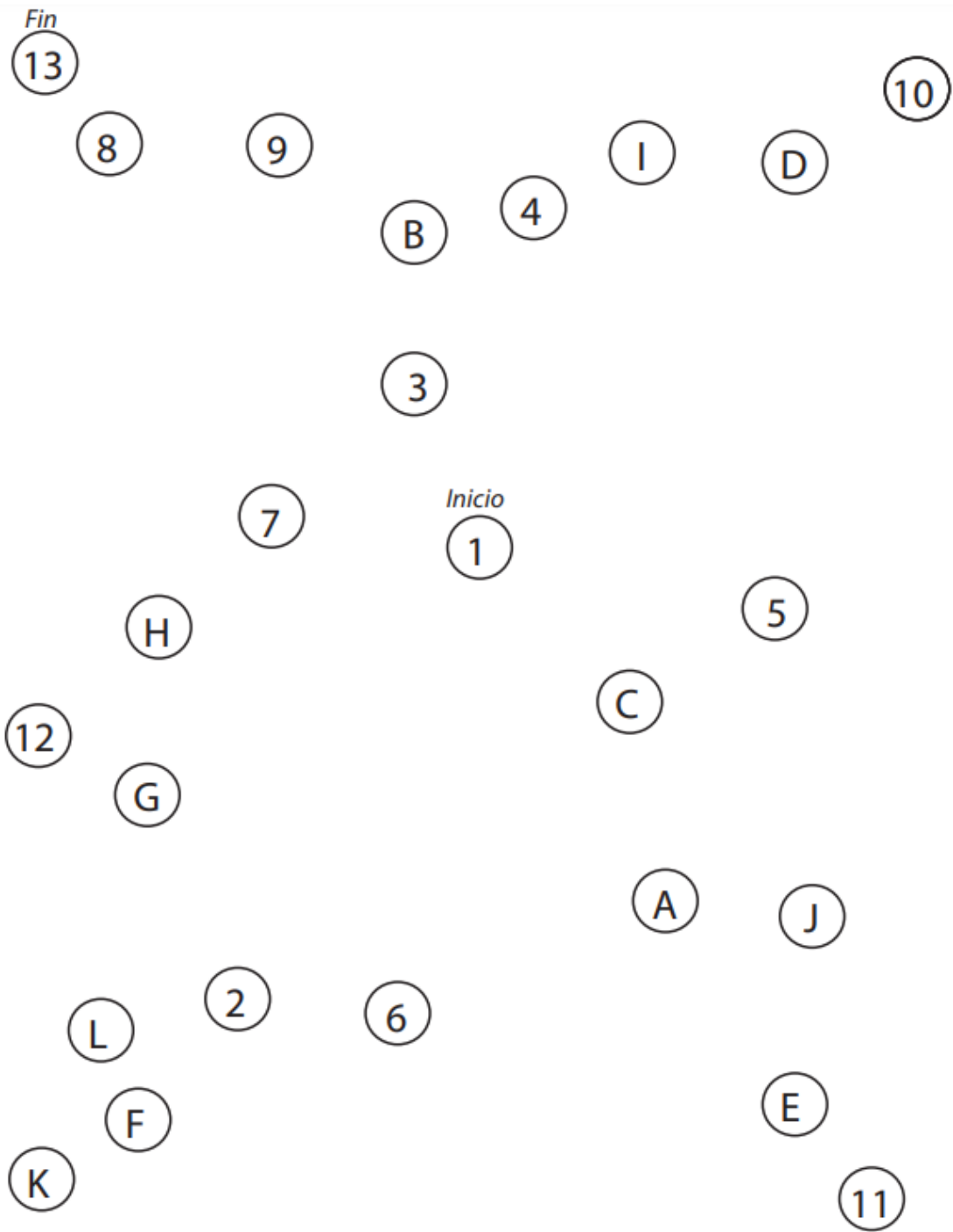


# Trail Making Test

Parte B

## PRÁCTICA





### Anexo 3. Datos normativos para TMT con ajuste a la población adulta de México.

Normative data for the TMT-A stratified by age and education levels for MEXICO

Percentile	Age (Years)														
	18-22	23-27	28-32	33-37	38-42	43-47	48-52	53-57	58-62	63-67	68-72	73-77	>77		
>12 years of education	95	-	-	5.6	8.8	12.1	15.3	18.5	21.7	24.9	28.1	31.4	34.6	37.8	
	90	5.9	9.1	12.4	15.6	18.8	22.0	25.2	28.5	31.7	34.9	38.1	41.3	44.5	
	85	10.4	13.6	16.9	20.1	23.3	26.5	29.7	32.9	36.2	39.4	42.6	45.8	49.0	
	80	14.2	17.4	20.6	23.8	27.0	30.3	33.5	36.7	39.9	43.1	46.3	49.6	52.8	
	70	20.2	23.4	26.6	29.8	33.0	36.3	39.5	42.7	45.9	49.1	52.3	55.6	58.8	
	60	25.2	28.4	31.7	34.9	38.1	41.3	44.5	47.7	51.0	54.2	57.4	60.6	63.8	
	50	29.9	33.1	36.3	39.6	42.8	46.0	49.2	52.4	55.6	58.9	62.1	65.3	68.5	
	40	34.6	37.8	41.0	44.2	47.5	50.7	53.9	57.1	60.3	63.5	66.8	70.0	73.2	
	30	39.6	42.9	46.1	49.3	52.5	55.7	59.0	62.2	65.4	68.6	71.8	75.0	78.3	
	20	45.6	48.9	52.1	55.3	58.5	61.7	64.9	68.2	71.4	74.6	77.8	81.0	84.3	
	15	49.4	52.6	55.8	59.0	62.3	65.5	68.7	71.9	75.1	78.3	81.6	84.8	88.0	
	10	53.9	57.1	60.3	63.5	66.8	70.0	73.2	76.4	79.6	82.8	86.1	89.3	92.5	
	5	60.6	63.8	67.1	70.3	73.5	76.7	79.9	83.2	86.4	89.6	92.8	96.0	99.2	
	1 to 12 years of education	95	7.5	10.7	13.9	17.2	20.4	23.6	26.8	30.0	33.3	36.5	39.7	42.9	46.1
		90	14.3	17.5	20.7	23.9	27.1	30.3	33.6	36.8	40.0	43.2	46.4	49.7	52.9
85		18.7	22.0	25.2	28.4	31.6	34.8	38.1	41.3	44.5	47.7	50.9	54.1	57.4	
80		22.5	25.7	28.9	32.1	35.4	38.6	41.8	45.0	48.2	51.5	54.7	57.9	61.1	
70		28.5	31.7	34.9	38.1	41.4	44.6	47.8	51.0	54.2	57.5	60.7	63.9	67.1	
60		33.5	36.8	40.0	43.2	46.4	49.6	52.9	56.1	59.3	62.5	65.7	68.9	72.2	
50		38.2	41.4	44.7	47.9	51.1	54.3	57.5	60.8	64.0	67.2	70.4	73.6	76.8	
40		42.9	46.1	49.3	52.6	55.8	59.0	62.2	65.4	68.7	71.9	75.1	78.3	81.5	
30		48.0	51.2	54.4	57.6	60.8	64.1	67.3	70.5	73.7	76.9	80.2	83.4	86.6	
20		54.0	57.2	60.4	63.6	66.8	70.1	73.3	76.5	79.7	82.9	86.1	89.4	92.6	
15		57.7	60.9	64.1	67.4	70.6	73.8	77.0	80.2	83.5	86.7	89.9	93.1	96.3	
10		62.2	65.4	68.6	71.9	75.1	78.3	81.5	84.7	88.0	91.2	94.4	97.6	100.0	
5		69.0	72.2	75.4	78.6	81.8	85.0	88.3	91.5	94.7	97.9	100.0	100.0	-	

Normative data for the TMT-B stratified by age and education levels for MEXICO

Percentile	Age (Years)													
	18-22	23-27	28-32	33-37	38-42	43-47	48-52	53-57	58-62	63-67	68-72	73-77	>77	
>12 years of education	95	-	-	-	-	-	-	-	7.6	16.3	24.9	33.6	42.2	
	90	-	-	-	-	-	-	13.2	21.8	30.4	39.1	47.7	56.4	65.0
	85	-	-	-	-	11.1	19.7	28.4	37.0	45.7	54.3	63.0	71.6	80.3
	80	-	-	6.4	15.1	23.7	32.4	41.0	49.7	58.3	67.0	75.6	84.3	92.9
	70	9.4	18.1	26.7	35.4	44.0	52.7	61.3	70.0	78.6	87.3	95.9	104.6	113.2
	60	26.5	35.2	43.8	52.5	61.1	69.8	78.4	87.1	95.7	104.4	113.0	121.7	130.3
	50	42.4	51.0	59.7	68.3	77.0	85.6	94.3	102.9	111.6	120.2	128.9	137.5	146.2
	40	58.2	66.9	75.5	84.2	92.8	101.5	110.1	118.8	127.4	136.1	144.7	153.4	162.0
	30	75.4	84.0	92.7	101.3	109.9	118.6	127.2	135.9	144.5	153.2	161.8	170.5	179.1
	20	95.6	104.3	112.9	121.6	130.2	138.9	147.5	156.2	164.8	173.5	182.1	190.8	199.4
	15	108.3	117.0	125.6	134.3	142.9	151.6	160.2	168.9	177.5	186.2	194.8	203.5	212.1
	10	123.5	132.2	140.8	149.5	158.1	166.8	175.4	184.1	192.7	201.4	210.0	218.7	227.3
	5	146.3	155.0	163.6	172.3	180.9	189.6	198.2	206.9	215.5	224.2	232.8	241.5	250.1
	1 to 12 years of education	95	-	-	-	-	13.7	22.4	31.0	39.7	48.3	57.0	65.6	74.3
		90	-	-	10.6	19.3	27.9	36.6	45.2	53.9	62.5	71.2	79.8	88.5
85		8.5	17.2	25.8	34.5	43.1	51.8	60.4	69.1	77.7	86.4	95.0	103.7	112.3
80		21.2	29.9	38.5	47.2	55.8	64.5	73.1	81.8	90.4	99.0	107.7	116.3	125.0
70		41.5	50.1	58.8	67.4	76.1	84.7	93.4	102.0	110.7	119.3	128.0	136.6	145.3
60		58.6	67.3	75.9	84.6	93.2	101.9	110.5	119.1	127.8	136.4	145.1	153.7	162.4
50		74.5	83.1	91.8	100.4	109.0	117.7	126.3	135.0	143.6	152.3	160.9	169.6	178.2
40		90.3	98.9	107.6	116.2	124.9	133.5	142.2	150.8	159.5	168.1	176.8	185.4	194.1
30		107.4	116.1	124.7	133.4	142.0	150.7	159.3	168.0	176.6	185.3	193.9	202.6	211.2
20		127.7	136.3	145.0	153.6	162.3	170.9	179.6	188.2	196.9	205.5	214.2	222.8	231.5
15		140.4	149.0	157.7	166.3	175.0	183.6	192.3	200.9	209.6	218.2	226.9	235.5	244.2
10		155.6	164.2	172.9	181.5	190.2	198.8	207.5	216.1	224.8	233.4	242.1	250.7	259.4
5		178.4	187.1	195.7	204.4	213.0	221.7	230.3	239.0	247.6	256.2	264.9	273.5	282.2

# Anexo 4. Kit de análisis de la actividad de la acetilcolinesterasa

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

## Product Information

### Acetylcholinesterase Activity Assay Kit

Catalog Number **MAK119**

Storage at Room Temperature

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

Acetylcholinesterases (AChEs) are enzymes that hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine (ACh) to acetate and choline. AChE is located at the synaptic cleft and functions to terminate synaptic transmission by catalyzing the breakdown of ACh allowing cholinergic neurons to return to a resting state after activation. Changes in AChE activity may result from exposure to certain insecticides, which act as cholinesterase inhibitors. Inhibitors of AChE are also used to treat certain conditions such as dementia.

The Acetylcholinesterase Activity Assay kit provides a simple and direct procedure for measuring AChE levels in a variety of samples such as blood, serum, and plasma. This assay is an optimized version of the Ellman method in which thiocholine, produced by AChE, reacts with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) to form a colorimetric (412 nm) product, proportional to the AChE activity present. One unit of AChE is the amount of enzyme that catalyzes the production of 1.0  $\mu$ mole of thiocholine per minute at pH 7.5 at room temperature. This kit has a linear range of 10–600 units/L of AChE activity.

### Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Assay Buffer, pH 7.5 Catalog Number MAK119A	30 mL
Calibrator, equivalent to 200 U/L Catalog Number MAK119B	4 mL
Reagent Catalog Number MAK119C	240 mg

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- Spectrophotometric multiwell plate reader
- Clear 96 well flat-bottom plate

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Storage/Stability

This kit is shipped, and should be stored at room temperature.

### Procedure

#### Sample Preparation

Blood samples should be diluted 40-fold in Assay Buffer.

Tissue or cell lysates can be prepared by briefly sonicating or by homogenization in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 5 minutes. Used cleared supernatants for assay.

Best results are obtained when lysates are freshly prepared. If this is not feasible, lysates should be stored at 2–8 °C and used within 24 hours.

#### Assay Reaction

1. The Working Reagent should be prepared fresh and used within 30 minutes. Each reaction will require 2 mg of Reagent. To prepare Working Reagent, calculate the amount of reagent needed in total and weigh that amount into a centrifuge tube. Add 200  $\mu$ L of Assay Buffer per 2 mg of Reaction and vortex to dissolve.
2. Transfer 200  $\mu$ L of water (Assay Blank) and 200  $\mu$ L of Calibrator into separate wells of a 96 well plate. Add 10  $\mu$ L of samples into separate wells of the 96-well plate.
3. Transfer 190  $\mu$ L of the freshly prepared Working Reagent to all sample wells and tap plate briefly to mix.
4. Incubate the samples at room temperature. After 2 minutes, take the initial absorbance measurement at 412 nm ( $A_{412}$ )<sub>initial</sub>.
5. Continue to incubate the plate at room temperature. At 10 minutes, take the final measurement ( $A_{412}$ )<sub>final</sub>.

**Note:** This assay is based on an enzyme-catalyzed kinetic reaction. Addition of Working Reagent should be quick and mixing should be brief but thorough. Use of a multichannel pipette is recommended.

These assays can be adapted for use in standard 1 mL cuvettes. To adapt to cuvettes follow procedure as for 96 well plates but change volumes as follows: 1 mL of water, 1 mL of Calibrator, 50  $\mu$ L of sample, and 950  $\mu$ L of Working Reagent.

#### Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Suggested Solution
Assay not working	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For UV assays, use clear plates that are UV transparent or quartz plates.
Samples with erratic readings	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings

#### Calculations

AChE Activity (units/L) =

$$\frac{(A_{412})_{\text{final}} - (A_{412})_{\text{initial}} \times n \times 200}{(A_{412})_{\text{calibrator}} - (A_{412})_{\text{blank}}}$$

200 = equivalent activity (units/L) of the Calibrator when assayed is read at 2 minutes and 10 minutes

n = dilution factor (n = 40 for whole blood)

( $A_{412}$ )<sub>calibrator</sub> = Absorbance of the calibrator at 10 minutes

( $A_{412}$ )<sub>blank</sub> = Absorbance of the blank at 10 minutes

If the AChE activity without consideration of the dilution factor is higher than 600 units/L, dilute sample further in Assay Buffer and repeat the assay. Multiply the results by the dilution factor.

One unit of AChE is the amount of enzyme that catalyzes the production of 1.0  $\mu$ mole of thiocholine per minute at room temperature at pH 7.5. This kit has a linear range of 10–600 units/L of AChE activity.

LS,MAM 11/13-1

## Anexo 5. Kit para determinación de BDNF

Millipore®

www.sigmaaldrich.com

### Certificate of Analysis / Protocol

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757

**Product Name** Human BDNF ELISA Kit  
for serum, plasma, and cell culture supernatants

**Product Number** RAB0026

**Lot Number** 0510K0106

**Storage** Store the kit at -20°C. It remains active for up to 1 year. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The reconstituted standard should be stored at -20°C or -70°C (-70°C is recommended). Opened microplate strips or reagents may be stored for up to 1 month at 2-8°C. Return unused wells to the pouch containing desiccant pack and reseal along entire edge.

**Components**

1. Human BDNF Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - RAB0026A-EA: 96 wells (12 strips x 8 wells) coated with anti-Human BDNF.
2. 20x Wash Buffer (Item B) - RABWASH4
3. Lyophilized Human BDNF Protein Standard (Item C) - RAB0026C-1VL
4. Biotinylated Human BDNF Detection Antibody (Item F) - RAB0026D-1VL
5. HRP-Streptavidin (Item G) - RABHRP5
6. ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - RABTMB3
7. ELISA Stop Solution (Item I) - RABSTOP3
8. ELISA 1x Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - RABELADA-30ML
9. ELISA 5x Assay/Sample Diluent Buffer B (Item E1) - RABELADB-15ML

### Assay/Sample Diluent Buffer dilution (Preparation, Step 2)

Assay/Sample Diluent Buffer B (Item E1) should be diluted 5-fold with deionized or distilled water before use.

### Sample Dilution (Preparation, Step 3)

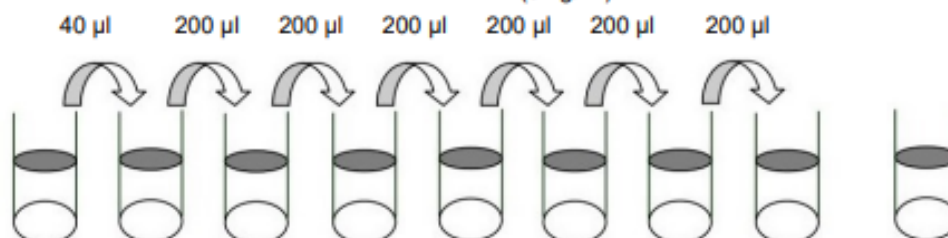
Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) should be used for dilution of serum and plasma samples. 1x Assay/Sample Diluent Buffer B (Item E1) should be used for dilution of cell culture supernatant samples. The suggested dilution for normal serum/plasma is 5 - 500 fold.

\* Please note that the levels of BDNF may vary between different samples. Optimal dilution factors for each sample must be determined by the investigator.



**Preparation of Standard  
(Preparation, Step 4)**

Briefly spin a vial of Item C. Add 720  $\mu$ l Assay Diluent A (for serum/plasma samples) or 1X Assay Diluent B (for cell culture medium) into Item C vial to prepare a 400 ng/ml standard. Dissolve the powder thoroughly by a gentle mix. Add 40  $\mu$ l BDNF standard from the vial of Item C, into a tube with 960  $\mu$ l Assay Diluent A or 1X Assay Diluent B to prepare a 16 ng/ml standard solution. Pipette 300  $\mu$ l Assay Diluent A or 1X Assay Diluent B into each tube. Use the stock standard solution to produce a dilution series (Figure 1). Mix each tube thoroughly before the next transfer. Assay Diluent A or 1X Assay Diluent B serves as the zero standard (0 ng/ml).



		Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Zero Standard
Diluent volume	Item C+ 720 $\mu$ l	960 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l
Conc.	400 ng/ml	16 ng/ml	6.4 ng/ml	2.56 ng/ml	1.02 ng/ml	0.41 ng/ml	0.16 ng/ml	0.066 ng/ml	0 ng/ml

**Preparation of Biotinylated  
Detection Antibody  
(Preparation, Step 6)**

Briefly spin the Detection Antibody vial (Item F) before use. Add 100  $\mu$ l of 1x Diluent Buffer B (Item E1) into the vial to prepare a detection antibody concentrate. Pipette up and down to mix gently (the concentrate can be stored at 4°C for 5 days). The detection antibody concentrate should be diluted 80-fold with 1x Diluent Buffer B (Item E1) and used in Procedure, step 4.

**Dilution of HRP-Streptavidin  
Concentrate  
(Preparation, Step 7)**

Briefly spin the HRP-Streptavidin concentrate vial (Item G) and pipette up and down to mix gently before use, as precipitates may form during storage. HRP-Streptavidin concentrate should be diluted 200-fold with 1x Diluent Buffer B (Item E1).

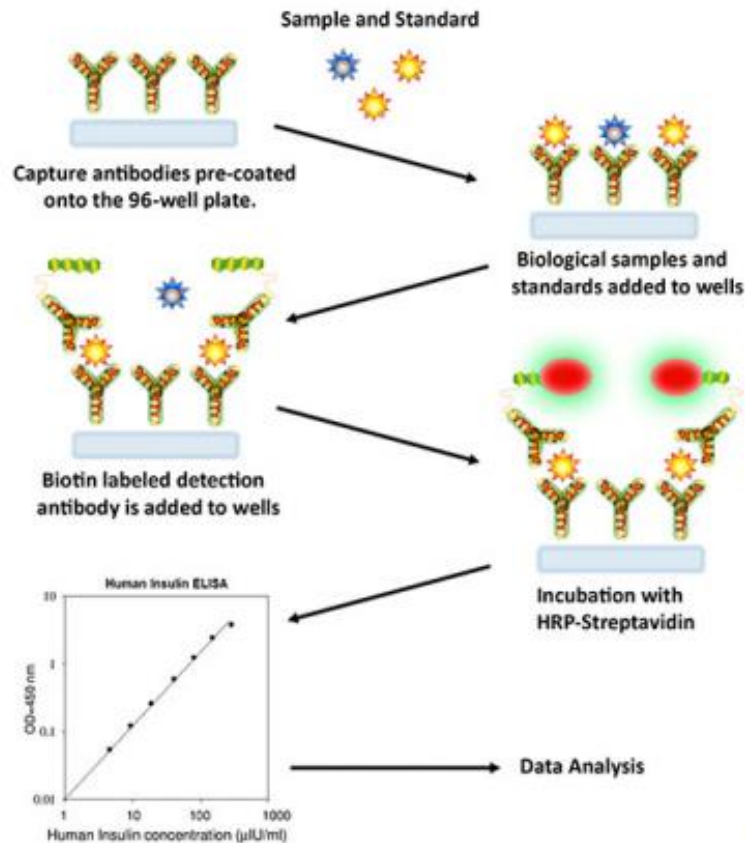
For example: Briefly spin the vial (Item G) and pipette up and down to mix gently. Add 50  $\mu$ l of HRP-Streptavidin concentrate into a tube with 10 ml 1X Assay Diluent B to prepare a final 200 fold diluted HRP- Streptavidin solution (don't store the diluted solution for next day use). Mix well.



## Sandwich Assay Procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18 - 25°C) before use. It is recommended that all standards and samples be run at least in duplicate.
2. Add 100 µl of each standard and sample into appropriate wells. Cover wells and incubate for 2.5 hours at room temperature or overnight at 4°C with gentle shaking.
3. Discard the solution and wash 4 times with 1X Wash Solution. Wash by filling each well with Wash Buffer (300 µl) using a multi-channel Pipette or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
4. Add 100 µl of 1x prepared Detection Antibody to each well. Cover wells and incubate for 1 hour at room temperature with gentle shaking.
5. Discard the solution. Repeat the wash procedure as in step 3.
6. Add 100 µl of prepared Streptavidin solution to each well. Cover wells and incubate for 45 minutes at room temperature with gentle shaking.
7. Discard the solution. Repeat the wash as in step 3.
8. Add 100 µl of TMB One-Step Substrate Reagent (Item H) to each well. Cover wells and incubate for 30 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking.
9. Add 50 µl of Stop Solution (Item I) to each well. Read absorbance at 450 nm immediately.

Fig 2: Example of the Sandwich ELISA process



# Anexo 6. Kit de Lymphoprep para separación de linfocitos

## Lymphoprep™



### PRODUCT DESCRIPTION

Lymphoprep™ is a ready-made, sterile and endotoxin tested solution for the isolation of pure lymphocyte suspensions. The solution contains Sodium Diatrizoate and Polysaccharide in the following concentrations:

Sodium Diatrizoate	9.1% (w/v)
Polysaccharide	5.7% (w/v)

#### Physical-chemical characteristics:

Density:	1.077 ± 0.001g/ml
Osmolality	290 ± 15 mOsm

### PRINCIPLE OF THE SEPARATION PROCEDURE

The most common technique for separating leucocytes is to mix blood with a compound which aggregates the erythrocytes, thereby increasing their sedimentation rate. The sedimentation of leucocytes is only slightly affected and can be collected from the upper part of the tube when the erythrocytes have settled. Using a mixture of Sodium Metrizoate and Polysaccharide, Bayum (1968) developed a one-step centrifugal technique for isolation of lymphocytes from anti-coagulated blood stored at room temperature for up to 6 hours.

### STABILITY AND STORAGE

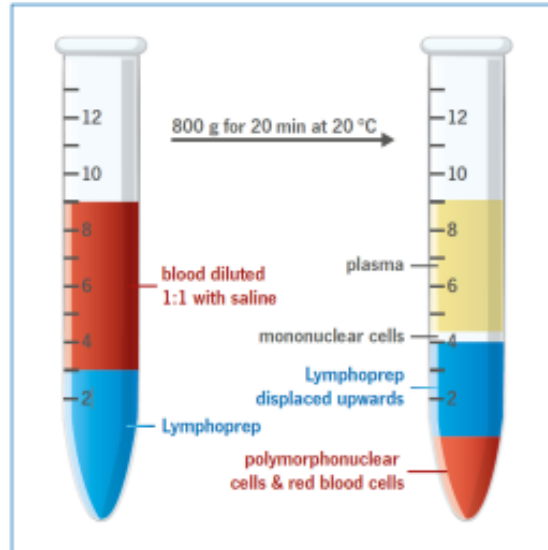
Lymphoprep™ is stable for 3 years provided the solution is kept sterile and protected from light. Prolonged exposure to direct sunlight leads to release of iodine from the Sodium Diatrizoate molecule. This effect is negligible when working with this solution on a day to day basis. Lymphoprep™ should be stored at +4 °C to +30 °C.

### SEPARATION PROCEDURE (see Figure)

1. Collect blood into a tube containing anticoagulant (EDTA, heparin, ACD) or use defibrinated blood.
2. Dilute the blood by addition of an equal volume of 0.9% NaCl.
3. Carefully layer 6 ml of the diluted blood over 3 ml Lymphoprep™ in a 12–15 mm centrifuge tube. Alternatively Lymphoprep™ can be underlayered. Avoid mixing of blood and separation fluid. Cap the tube to prevent the formation of aerosols.
4. Centrifuge at 800 x g for 20 minutes at room temperature (approximately 20 °C) in a swing-out rotor. If the blood is stored for more than 2 hours, increase the centrifugation time to 30 minutes.
5. After centrifugation the mononuclear cells form a distinct band at the sample/medium interface, as shown in the figure. The cells are best removed from the interface using a Pasteur pipette without removing the upper layer.
6. Dilute the harvested fraction with 0.9% NaCl or medium to reduce the density of the solution and pellet the cells by centrifugation for 10 minutes at 250 x g.

### PURITY AND VIABILITY

The described method has been found to be rapid, simple and reliable and gives excellent results with blood samples from most normal individuals and patients. The technique can also be used for preparation of lymphocyte suspensions for mixed lymphocyte culture tests. The contamination in the lymphocyte suspensions of erythrocytes is usually between 1-5 per cent of the total cell number. Some immature granulocytes may follow the lymphocytes during intense immunosuppressive therapy. When heparinized blood is used, it is essential to remove most of the platelets, in order to avoid inhibition in the cytotoxicity test. The described washing procedure is usually sufficient.



### REFERENCES

Bayum, A. (1968): Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97.

### ORDERING INFORMATION

Lymphoprep™	Prod. no. 1856	1 x 250 ml
Lymphoprep™	Prod. no. 1858	1 x 500 ml
Lymphoprep™	Prod. no. 1856	4 x 250 ml
Lymphoprep™	Prod. no. 1858	6 x 500 ml

### Manufacturer:



Serumwerk Bernburg AG  
Hallesche Landstraße 105b  
06406 Bernburg/Germany  
Phone: +49 3471 860-0  
Fax: +49 3471 860-130  
[www.serumwerk.com](http://www.serumwerk.com)

ISO 13485 certified company

**Anexo 7. Ejemplos de cometas encontrados en voluntarios de ambos grupos.**

