

Guía de Presentación de

INFORMES DE AVANCE – INFORMES FINALES

Proyectos acreditados en la Secretaría de Investigación y Postgrado.

1. TÍTULO DEL PROYECTO: EVALUACION DE RIESGO SOBRE LA SALUD HUMANA FRENTE A LA EXPOSICION OCUPACIONAL A QUIMICOS DE USO AGRARIO EN EL SOBERBIO, MISIONES

3. FECHAS DE INICIO Y DE FINALIZACION DEL PROYECTO: DESDE 01.01.2011 HASTA 01.01.2013

4. PERIODO AL QUE SE REFIERE EL PRESENTE INFORME: DESDE 01.01.2011 HASTA 01.01.2012

5. EQUIPO DE INVESTIGACION

APELLIDO Y Nombre	Cargo / Beca	Nº de horas investigada x semana	Mes de incorporación	Mes de finalización	Evaluación S - NoS
MARTIN Cristina	PTI	10	01.2011	01.2013	S
GONZALEZ Carlos	PTI	10	01.2011	01.2013	S
PADULA Diego	PTI	10	01.2011	01.2013	S
GALEANO VELAZQUEZ Zulema	PAD	5	01.2011	01.2013	S
QUIROGA Ana María	JTP	10	01.2011	01.2013	S
FERNANDEZ DE LA PUENTE Graciela	JTP	10	01.2011	01.2013	S
ACHON Marisol	BE	10	01.2011	01.2013	S
SCHWIETER Horacio	PTI	10	01.2011	01.2013	S
SCHNEIDER Sonia Alejandra	AY1	10	01.2011	01.2013	S
BRAVIN Carolina	AY1	10	01.2011	01.2013	S

Se consignan primero los datos del Director de Proyecto y luego los de otros investigadores que trabajaron efectivamente en la investigación.

En 'Cargo / Beca' se anotarán las iniciales de la categoría docente y dedicación, o de investigación:

PTI	Profesor Titular
PAS	Profesor Asociado
PAD	Profesor Adjunto
JTP	Jefe de T. Prácticos
AY1	Ayudante de 1ª
AY2	Ayudante de 2ª

ex	Exclusiva
se	Semiexclusiva
si	Simple

AUX	Auxiliar de Investigación
INI	Investigador Inicial
ASI	Asistente
IND	Independiente
PRI	Principal

b	Becario
ah	Ad honorem
ADS	Adscripto
INV	Invitado

Así, un Profesor titular semiexclusiva se escribe 'PTI se' y un Auxiliar ad honorem 'AUX ah'.

Si el investigador tiene varios cargos ocupar otros tantos renglones, al igual que si ha cambiado de cargo o de nº de horas semanales dedicadas a la investigación en el transcurso del período de referencia.

'*Nº Horas investiga x semana*' se refiere a las horas que insumió efectivamente la realización de la investigación (y no a la dedicación total del cargo). Si la persona tiene varios cargos, consignar para cada uno de ellos la dedicación horaria semanal al proyecto.

En '*Mes de incorporación*' consignar el mes a partir del cual cada investigador se ha incorporado al proyecto; y en '*mes de finalización*', cuando ha dejado de participar. Las fechas no pueden extenderse más allá de los límites del período de referencia del informe.

La '*Evaluación*' está referida al desempeño de cada investigador durante el período de referencia de acuerdo a la evaluación del Director del Proyecto. Consignar S (Satisfactoria) o No S (No Satisfactoria) Si es necesario a continuación de cuadro se puede fundamentar las evaluaciones No Satisfactorias.

Firma Director de Proyecto

Aclaración:.....

Fecha de presentación del Informe de Avance – Final.....

PARA RESPONDER A LOS ITEMS SIGUIENTES UTILIZAR HOJAS COMPLEMENTARIAS (TAMAÑO A4)
EN EL NUMERO QUE SE REQUIERA

6. RESUMEN DEL PROYECTO ORIGINAL

Se trata de describir sintéticamente (máximo 200 palabras) las principales características (tema, metodología, etc.) del proyecto.

Los plaguicidas son agentes químicos ampliamente utilizados por el hombre, para proteger de organismos nocivos la producción y calidad de las cosechas, para el control de vectores y plagas importantes en la salud pública, en el uso pecuario y doméstico. Estas se consideran como mutágenos potenciales por contener ingredientes con propiedades para provocar cambios en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Uno de los problemas actuales más importantes y controvertidos es el efecto sobre la salud humana derivado de su uso directo.

A través del desarrollo de este Proyecto se pretende evaluar el riesgo sobre la salud humana asociado a la exposición ocupacional de agrotóxicos en productores rurales de la Provincia de Misiones, ubicados en el Alto Uruguay.

Se investigarán las características epidemiológicas, la percepción de riesgo que tienen los trabajadores, las prácticas de protección, el grado de exposición a plaguicidas y los biomarcadores que indiquen exposición y daño, mediante encuesta, entrevista semiestructurada, evaluación clínica de lesiones de la mucosa bucal (mucositis), Ensayos de genotoxicidad como el Test de micronúcleos (MN) y Ensayo del Cometa, en células de descamación de mucosa oral y en linfocitos de sangre periférica. Se estudiarán los biomarcadores de susceptibilidad genética conferidos por los polimorfismos del gen CYP1A1.

7. LISTA DE ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE EL PERÍODO

Se trata de las actividades efectivamente realizadas durante el período de referencia. Pueden ser las mismas que las incluidas en el Proyecto, pero también pueden aparecer nuevas actividades que no hayan sido previstas originalmente. Esta sección puede ser publicada en la página de la Facultad y de la Universidad.

Las actividades se realizaron en:

- Hospital El Soberbio
- Laboratorio de la Cátedra Toxicología y Medicina Legal. FCEQyN
- Laboratorio de Biología Molecular Hospital de Pediatría Posadas
- Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Las palmas. Gran Canaria. España
- Laboratorio de Inmunología y genética humana del Hospital Negrin de Las Palsmas, Gran Canaria: España.

7.1) Puesta a punto de los Instrumentos diseñados para el Trabajo: Entrevistas, Ficha de Evaluación bucal, Protocolos para obtención y procesamiento de las muestras biológicas.

7.1.1.) Diseño y utilización del Protocolo para la Entrevista Semiestructurada

En todas las personas que participaron en el estudio (expuestos y no expuestos) en el momento de la toma de muestra, mediante una encuesta (Anexo I), se obtuvo información de los siguientes datos: lugar de ubicación de la chacra, edad, sexo, máxima educación alcanzada, hábitos (consumo de bebidas alcohólicas, tabaco y otros), patología y enfermedades en curso, consumo de medicamentos, lugar donde desarrolla la actividad laboral, tipo de cultivos que practica, tipo de plaguicidas y fertilizantes que aplica, (nombre comercial y principio activo), equipo de aplicación, frecuencia de la exposición, última vez que aplicó un agrotóxico, última vez que ingresó a la zona de cultivo, sistema de protección (uso de guantes, máscara, botas, ropa impermeable). También se solicitó a cada persona evaluada que relate sus acciones diarias desde que se inicia el día hasta que termina, de un día laboral.

7.1.2.) Diseño y utilización del Protocolo de Evaluación de salud bucal

En todos los individuos considerados para el estudio se utilizó el Protocolo de evaluación diseñado para este trabajo, según modificaciones en base a los criterios de la OMS de estadificación para lesiones orales manifestadas en pacientes tras el uso de radioterapia y quimioterapia con drogas anticancerígenas. Estas lesiones se consideran debidas a daño en el material genético de las células del epitelio oral. (Anexo II)

En los individuos en los que se encontró una lesión sospechosa por sus características clínicas, se tomaron muestras obtenidas por biopsia en el consultorio del Hospital de El Soberbio.

Las mismas se analizaron en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Escuela de Agudos: "Dr. Ramón Madariaga"

Se documentó fotográficamente cada lesión.

7.1.3.) Puesta a punto de las técnicas analíticas de Micronúcleos y Ensayo Cometa

Se realizó una "Prueba Piloto" de evaluación del nivel de exposición a plaguicidas en trabajadores rurales, a los efectos de ajustar el proceso de la toma de muestra y evaluar los instrumentos de recolección de datos, la convocatoria de los mismos y el contacto con las autoridades sanitarias de la zona de estudio,

El biomarcador de genotoxicidad utilizado en este caso fue el Ensayo de micronúcleos (Mn) y la muestra biológica de estudio fue la mucosa oral.

La toma de muestra se realizó en el laboratorio del Hospital de Salud Pública de la localidad de El Soberbio (Misiones), ubicada geográficamente en el Alto Uruguay, sobre la margen del mencionado río. La convocatoria de las personas expuestas, voluntariamente interesadas en participar de la evaluación, se realizó por medio de los profesionales de la salud del hospital, como así también a través de medios de comunicación y fuerzas vivas de la localidad.

Previamente a la realización del estudio, a cada participante que asistió en forma voluntaria al estudio, se le leyó el formulario de "Consentimiento Informado" (Ver ANEXO III) y luego se lo invitó a firmar al pie a manera de dar su conformidad a la extracción de la muestra biológica y realización del estudio.

Los individuos de la población control se apareó por de sexo, edades y hábitos que pueden tener capacidad de modificación de los valores de los biomarcadores genotóxicos, como consumo de alcohol y tabaco

En la evaluación se consideraron los *Factores de Confusión* (hábitos: fumar o beber, agua de consumo, uso de medicamentos).

Los *Criterios de Exclusión* para ambos grupos del estudio fueron:

1. Antecedentes de enfermedades crónicas que requieran terapias o medicamentos durante largo tiempo (inmunosupresores).
2. Uso de agentes quimioterapéuticos.
3. Tratamientos con radioterapia y exposición a rayos X en los últimos 6 meses.

Los resultados de las pruebas en ambas poblaciones se compararon, a los efectos de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas de alteraciones en el ADN, expresadas en las pruebas de genotoxicidad.

Los siguientes protocolos son los modificados durante el trabajo:

a. PROTOCOLO PARA TEST DE MICRNUCLEOS (MN) EN MUCOSA BUCAL

Obtención de la muestra:

- Hacer enjuagar la boca al dador.
- Raspar enérgicamente el interior de ambas mejillas del dador con una escobilla.
- Colocar la escobilla en un tubo cónico conteniendo 1,5 ml. de Solución Fisiológica. Cortar el extremo de la escobilla a la altura del borde del tubo.
- Pasar por vortex unos segundos para que se desprendan las células.

Realización de los preparados:

- Centrifugar a 1.500 rpm durante 5 min. Manteniendo la escobilla dentro del tubo. Eliminar el sobrenadante por volcado. Descartar la escobilla.
- LAVADOS: Las células se lavan 2 veces con igual volumen de SF. Seguido de centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min. (La finalidad es eliminar microorganismos y restos celulares que puedan interferir).
- En el último lavado descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur y resuspender el botón en 1,5 ml. de SF.

- Homogeneizar bien con vortex y gotear sobre portaobjetos precalentados en estufa a 55°C aprox. Utilizando micropipeta de 50 µl.
- Cubrir todo el porta sin gotear dos veces en el mismo lugar. Realizar 3 portas por cada muestra.
- Dejar secar al aire (o en estufa a la misma Temp.)
- Fijar con Metanol (80%) frío por 30 min. Y dejar secar nuevamente.

Coloración y observación de los extendidos.

Las células fijadas en los extendidos se pueden colorear con distintos colorantes como ser, colorantes fluorescentes: naranja de acridina (NA), yoduro de propidio o con Hoechst 33258, así como con colorantes convencionales: Papanicolau, Giemsa o Feulgen-fast green. En este trabajo se utilizó NA.

- Teñir los extendidos con naranja de acridina, 10 minutos, en el momento de la observación (ver preparación del colorante en el ANEXO V).
- Los preparados deben analizarse con aumento de 40x empleando microscopio de fluorescencia.
- La observación de los extendidos fue realizada por un solo observador, donde la metodología utilizada fue a doble ciego, o sea, las muestras fueron codificadas y el observador no conocía a que población pertenecía, así como otras variables tal como; sexo, edad, consumo de tabaco y alcohol. Imposibilitando así tener alguna influencia subjetiva que afectara los resultados.

Identificación de los Micronucleos

Los Mn son morfológicamente idénticos a los núcleos normales, pero más pequeños. Presentan las siguientes características (Schmid, 1975; Tawny Holdsworth, 1992):

- Tamaño menor a 1/3 del núcleo principal.
- Forma redonda u ovalada.
- Borde liso y uniforme.
- No solapado con núcleo principal y con bordes perfectamente distinguibles.
- Igual color e intensidad que núcleo principal o levemente más clara.
- No presentar refringencia.

No se contabilizan células rotas, plegadas, superpuestas, o con núcleo fragmentado

Frecuencia de Mn: Número de células con Mn/1000 células contabilizadas.

Nota; si al contar 1000 células no contabilizo ninguna célula con Mn, contar mil mas y así hasta 3000 células.

b. ENSAYO COMETA O ELECTROFORESIS ALCALINA DE CÉLULAS INDIVIDUALES EN GEL DE AGAROSA (SCGE)

b.1. Protocolo para realización del Ensayo Cometa o Electroforesis alcalina de células individuales en gel de agarosa (SCGE)

- Ensayo de viabilidad

Mediados por fluorocromos : Tomar 100 µl de suspensión celular, agregar 4 µl de una solución BrEtNA en eppendorf. Poner sobre portaobjeto, cubrir y observar en microscopio de fluorescencia. Las células vivas se ven color verde, las muertas color rojo, y las en proceso de apoptosis poseen características particulares de vacuolización y fragmentación nuclear, con posible tinción mixta dependiendo del estadio de apoptosis en el que se encuentren. Contar 100 células, la viabilidad debe ser superior al 90 % para poder ser utilizadas en la aplicación del SCGE.

- ***Naranja de acridina se ve verde***
- ***Bromuro de Etidio se ve naranja***

- Metodología:

1. Preparación de los “slides”

Porta objetos limpios y desengrasados (se recomiendan esmerilados), se sumergen en agarosa normal (80°C), se retiran, se limpia la parte posterior y se dejan secar en posición horizontal durante aproximadamente 2 días (hasta 15 días dependiendo del clima). Una vez secos, se guardan a temperatura ambiente, separados unos de otros.

2. Obtención de la muestra:

- Hacer enjuagar la boca al paciente con agua corriente y luego raspar energicamente el interior de ambas mejillas con una escobilla.
- Colocar la escobilla en un tubo cónico conteniendo 1,5 ml. de Solución Fisiológica. Cortar el extremo de la escobilla a la altura del borde del tubo.
- Pasar por vortex unos segundos para que se desprendan las células.
- Centrifugar a 1.500 rpm durante 5 min. Manteniendo la escobilla dentro del tubo. Descartar la escobilla. Eliminar el sobrenadante por volcado.
- LAVADOS: Las células se lavan 2 veces con igual volumen de SF. Seguido de centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min. (La finalidad es eliminar microorganismos y restos celulares que puedan interferir). En el último lavado descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- Una vez obtenida la suspensión de células, se prepara la solución de trabajo: En un eppendorf colocar 1ml de PBS + 2gotas de pellet, homogeneizar.

- Tomar 10 µl de esta solución y mezclar con 100 µl de agarosa de bajo punto de fusión (37°C) en otro eppendorf. Homogeneizar.
- Sembrar en los porta objetos preparados.

3. **Siembra de los portaobjetos:**

- La siembra consiste en colocar 100 µl en una línea en el centro del portaobjetos. Luego se coloca el cubreobjetos de tamaño adecuado, lo que producirá la distribución de la muestra a lo largo de todo el porta. Evitar la formación de burbujas.
- Dejar gelificar en heladera (aprox. 20min.), una vez gelificado, se procede a retirar los cubreobjetos deslizando en forma lateral.

4. **Lisis**

A partir de esta etapa todo se realiza a 4°C. Los portas se colocan en los vasos de coplin que contienen la solución de lisis final, la cual tuvo que ser preparada en el día de su utilización y enfriada a 4°C, se deja actuar como mínimo 1 hora y hasta 1 mes manteniendo a 4°C y en oscuridad. Si luego de la lisis hay precipitado, se lavan los portas con PBS. La solución de lisis no puede ser reutilizada.

Todos los pasos posteriores se hacen en ausencia de luz para evitar el daño extra que pueda sufrir el ADN desnudo expuesto a la luz directa.

5. **Desnaturalización**

Retirar los preparados de la solución de lisis y colocarlos en una cuba horizontal en heladera que contenga el Buffer de electroforesis a 4°C a pH alcalino (pH >13).

Dejar los preparados sumergidos en buffer el tiempo necesario para que se lleve a cabo el *Unwinding* del ADN según la muestra de que se trate (lo recomendado es 20 minutos).

6. **Electroforesis**

Se realiza la corrida electroforética a 0,90 v/cm. durante 20 min. Empleando buffer de electroforesis a pH alcalino (mayor a 13).

7. **Neutralización**

Retirar cuidadosamente los portas de la cuba y realizar tres lavados con buffer de neutralización a intervalos de 5 minutos. Escurrir y deshidratar durante 5 min. en alcohol etílico o dejar secar al aire si se van a observar en el momento.

8. **Tinción con Bromuro de Etidio**

Teñir en el momento de la lectura con 25 µl de Bromuro de Etidio. La lectura de los preparados se hace utilizando un microscopio de fluorescencia (Objetivo 400 x y filtro de excitación de 515-560 nm).

Cuantificar 100 células por muestra, 50 en cada réplica. Determinar la cantidad de células en cada nivel de daño considerando

- nivel 0= sin daño, sin migración de fragmento (sin cola).
- nivel 1= daño leve (cola de longitud menor al diámetro de nucleoide)
- nivel 2= daño moderado (longitud de cola mayor al diámetro de un nucleoide pero menor al diámetro de dos)
- nivel 3 = daño alto (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres)
- nivel 4 = daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides)

A medida que aumenta la longitud de la cola y por ende la cantidad de ADN en la misma, el nucleoide (“cabeza del cometa”) va perdiendo intensidad y tamaño.

Calcular el $ID = n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$.

Donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño. La categoría 0 no se incluye en el ID.

El daño puede medirse también utilizando un micrómetro: medir la longitud del cometa desde el centro del borde delantero de la cabeza (longitud solo de la cola) hasta el último fragmento visible en la cola.

Se determina el ID para cada muestra o ejemplar.

Instrumental (de la FCEQyN de la UNaM)

- Microscopio de fluorescencia: KARL ZEISS. Standard 25.
- Fuente de fluorescencia: KARL ZEISS. V.H.W. f – 2b.
- Cuba electroforética refrigerada: ENDURO – 250 volt. Labnet International, Inc.
- Fuente de poder electroforética: ENDURO – Horizontal Gel Electrophoresis Systems. Labnet International, Inc.
- Macrocentrífuga
- Agitador Vortex
- Estufa de cultivo para 37°C

Análisis estadístico

El estudio es de tipo descriptivo caso-control apareados según sexo, edad, hábitos y consumo de fármacos.

Se compararon en las poblaciones expuestas y no expuestas, las frecuencias de Mn.

Se planteó una hipótesis de investigación, enunciada en forma operacional como hipótesis alterna, $H_1: \mu_1 > \mu_2$, donde μ se considera el daño promedio para cada población. La hipótesis nula quedó establecida entonces como $H_0: \mu_1 = \mu_2$.

Se construyó la base de datos con las variables independientes y dependientes. Luego se realizó el análisis demográfico con las variables: edad, sexo, hábito de fumar y consumo de bebidas alcohólicas para las dos poblaciones. Se dibujaron las tablas con la frecuencias de Mn obtenidas para ambos Grupos

El análisis para evaluar el daño genotóxico se realizó mediante el software Statgraphics *Centurion XV,0* para Windows, donde primero se realizó un análisis descriptivo de las variables, luego observando que los valores de las frecuencia de Mn, variable cuantitativa discreta, aunque le convertimos en variable cuantitativa continua al expresar la frecuencia por 1000 células observadas, la misma no deja de ser una proporción y para ello debemos usar métodos no paramétricos.. Se utilizó pruebas de comparación de medianas para dos muestras independientes (U de Mann Whitney). El valor de $p < 0,05$ se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

Se calcularon la media, la mediana y desviación estándar para el biomarcador. Las tablas de frecuencia de los datos colectados fueron generadas por el programa Microsoft Office Excel 2010.-

- **Variable: Resultado**

Es el daño genotóxico por exposición a plaguicidas, fue evaluado a través de: Test de Mn en mucosa bucal que evalúa el daño clastogénico y/o aneugénico dado por la frecuencia de Mn evaluadas en mil células.

- **Variable de exposición.**

Exposición a plaguicidas en años, tipo de plaguicidas y uso de ropa de protección.

- **Variable de confusión.**

Sexo, edad, consumo de tabaco y alcohol.

c. **Polimorfismos genéticos en genes de vías críticas de detoxificación.**

d. **Análisis de los datos**

ESTUDIO DE GENES QUE PARTICIPAN EN LAS VIAS DE DETOXIFICACION

En la población expuesta y en la no expuesta, se obtuvo entre 5ml y 10 ml de sangre periférica por venopunción, colectada con anticoagulante EDTA 1,5 mg/ml.

EXTRACCIÓN DE ADN

Estas técnicas se desarrollaron completamente en el Laboratorio de Inmunogenética del Hospital negrin de las Palmas de Gran Canaria, España.

El ADN fue extraído y purificado a partir de de 300 μ l de sangre completa de forma automatizada con el sistema de perlas magnéticas en el iPrep™ Purification System (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mediante el iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), con el iPrep™ Protocol Cards (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), y el kit iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

El sistema de extracción y purificación automatizada utilizado se basa en la tecnología patentada Magtration® (filtración magnética) de PSS (Precision System Science) que utiliza perlas magnéticas del sistema ChargeSwitch® Technology (CST®) que a un pH bajo tienen una carga positiva y se unen al ADN cargado negativamente. Las proteínas y otros contaminantes no se unen y se arrastran con un lavado buffer acuoso. Con este sistema de purificación del ADN se elimina la filtración y la centrifugación

El ADN unido a las perlas magnéticas se separa luego del lisado utilizando una separación magnética en las paredes laterales de los tips. Las perlas se lavan para ser removidas y el ADN puro se recupera en un buffer de elución. (Fig III.4) El protocolo descriptivo se presenta en el Anexo. (Protocolo III.3. Fig.III.5)

El ADN se cuantificó y se determinó la calidad de las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific ,Wilmington, DE). El ADN se eluyó a una concentración de 50 μ g/ μ l con ratios para A260/A280 y A230/260 entre 1,7 y 1,9.

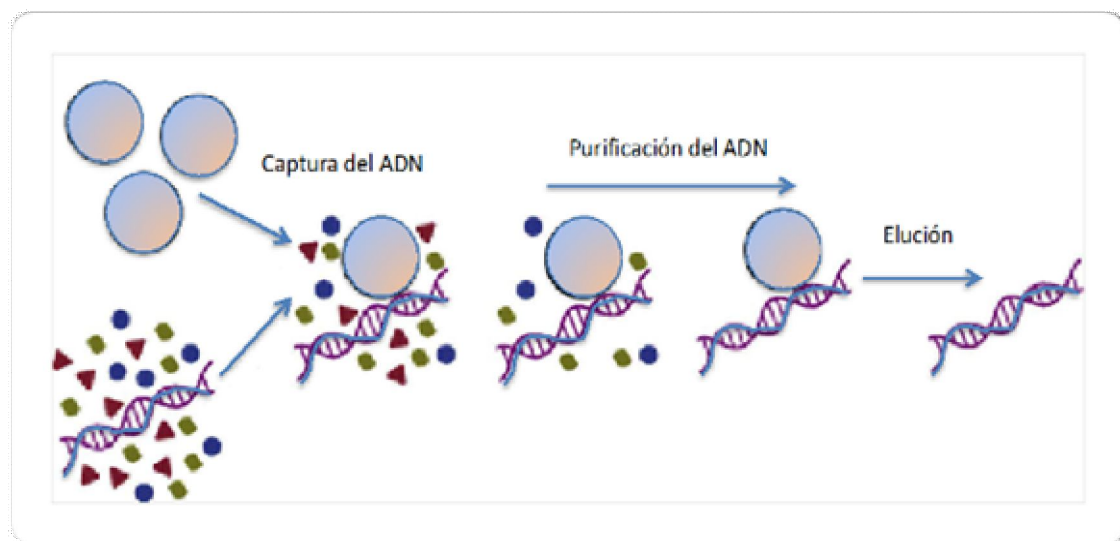


FIGURA III.5 Extracción del ADN mediante perlas magnéticas.

Paso 1: Captura del ADN: se lisan las células y el ADN crudo se captura con perlas magnéticas y los restos celulares y las proteínas quedan en solución.

Paso 2: Purificación del ADN: Se digieren los restos de proteínas con proteasas y luego se lava para obtener el ADN intacto, puro.

Paso 3: Elución: El ADN puro obtenido se recupera en una solución de elución de volumen pequeño para su utilización

ESTUDIO DE DISCRIMINACION ALELICA DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES CANDIDATOS LTBP3, MSX1, PAX9, PTCH1, SHH y SMO.

SELECCIÓN DE GENES Y SNPs

En este estudio se seleccionaron 6 genes que participan en las vías de detoxificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Para el estudio considerando una variedad de recursos que incluyeron resultados publicados sobre ligamiento, asociación, barrido amplio y completo del genoma, experimentos knock-out en ratones, estudios de expresión de genes en tejidos embrionarios, de anatomía ontológica, de regiones cromosómicas diana y del catalogo de expresión génica en embriones humanos durante estadios tempranos del desarrollo que contiene los perfiles de expresión de 25 estadios y tejidos de los mismos en la región craneofacial y oral de embriones humanos (COGENE; <http://hg.wustl.edu/COGENE>). Cai J, Ash D, Kotch LE, Jabs EW, Attie-Bitach T, et al. (2005) Gene expression in pharyngeal arch 1 during human embryonic development. *Hum Mol Genet*14: 903–912. Se investigaron en las bibliotecas de analisis seriados de expression de genes (SAGE) Development of human craniofacial morphology during the late embryonic and early fetal periods. *Am J Orthod* 88: 64–76. considerando fundamentalmente las vías moleculares de señalización del desarrollo: de la vía Hedgehog (SHH y PTCH1), de la vía WNT (SMO), de la vía FGF (MSX1 y PAX9), y de la vía TGFB (LTBP3) En estos 6 genes se seleccionaron 32 SNPs utilizando datos del Proyecto HapMap versión 27 (www.hapmap.org) y el software Haploview versión 4.2 (www.haploview.org)

Una vez localizado el cromosoma y la posición en el mismo de cada uno de los genes a estudiar mediante el HapMap, se introdujeron esos datos en el Haploview para localizar a los SNPs más relevantes en función de los haplotipos. El programa permite, mediante la selección de un número modesto de SNPs, recolectar datos del 95% de la heterocigocidad presente en un locus sin tener que estudiar a todos los SNPs. La herramienta Haploview permite la selección de SNPs basado en bloques de haplotipos identificados con el genotipo de datos existentes del proyecto HapMap.(Gabriel et al.,2002; 2003)

Se utilizaron datos adicionales sobre los SNPs de la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

Los polimorfismos seleccionado de los genes SHH (cr7q36, NM_000193), PTCH1 (cr9q22.3, NM_000264), SMO (cr7q32.3, NM_005631.4), MSX1 (cr4p16.1, NM_002448),

PAX9 (cr14q12, NM_006194) y LTBP3 (cr 11q12, NM_021070) se pueden ver en la Tabla III.1. La R^2 dada por Haploview fue de >0.95 para todos los genes.

De los 32 SNPs, 29 se analizaron con sondas disponibles comercialmente en Applied Biosystems Inc. Para detectar los polimorfismos de los alelos A y B que figuran en la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) Los otros 3 se diseñaron para este estudio y figuran en la Tabla III.1. como personalizada. En todos los casos el alelo 1 o A, se marcó en la sonda con VIC dye y el alelo 2 o B, con FAM dye a partir de la referencia en la base de datos. Los alelos A y B para los SNPs estudiados y el sitio del gen donde se localizan, se listan en la Tabla (Tabla III.2.) (Gabriel, Schaffner et al.,2002).

La ubicación de cada uno de los 32 polimorfismos de los genes estudiados se puede ver en los esquemas de la Fig.III.6.

DETERMINACION DE LOS GENOTIPOS DE LOS SNP

La genotipificación de los SNPs se hizo en **Biotrove OpenArray™ NT Cyclor (Applied Biosystems)** (Foster City, CA) un sistema altamente automatizado, que utiliza bajísimos volúmenes de muestra y de alta performance para el análisis de los SNP

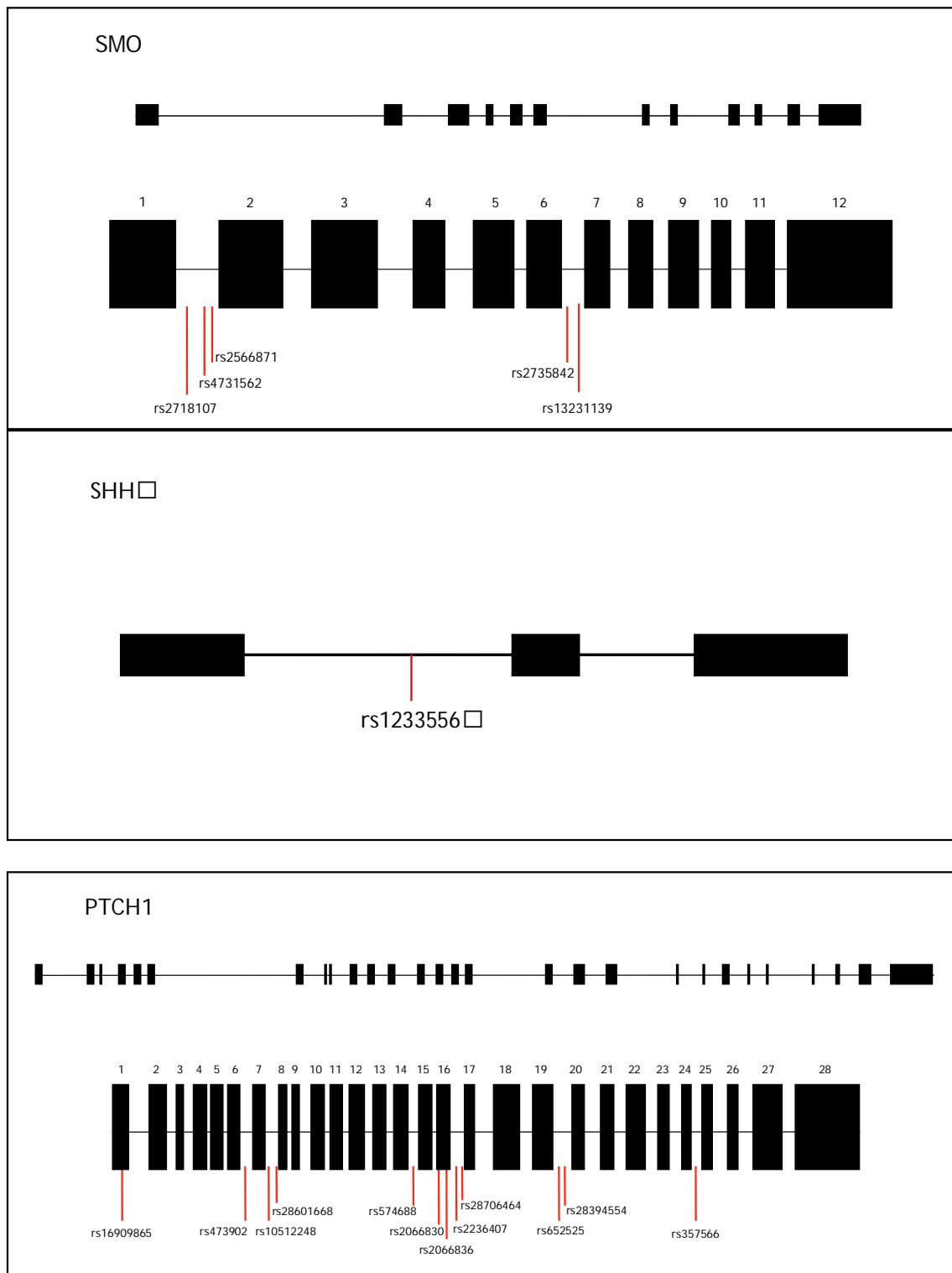
La carga de las muestras se realizó en el instrumento de carga **Carga de muestras OpenArray® AccuFill™ System.**

GEN	SNP	P BASES	ALELO A	ALELO B
SHH	rs1233556	155600417	G	A
PTCH1	rs10512248	98259703	A	C
PTCH1	rs16909865	98207302	C	G
PTCH1	rs2066830	98238403	C	T
PTCH1	rs2066836	98238358	C	T
PTCH1	rs2236407	98237796	A	G
PTCH1	rs28394554	98228225	C	T
PTCH1	rs28601668	98245716	A	G
PTCH1	rs28706464	98235310	C	T
PTCH1	rs357566	98215164	A	G
PTCH1	rs473902	98256235	A	C
PTCH1	rs574688	98239190	C	G
PTCH1	rs652525	98229183	A	G
SMO	rs13231139	128847022	A	C
SMO	rs2566871	128843169	C	T
SMO	rs2718107	128838659	A	C
SMO	rs2735842	128846469	A	G
SMO	rs4731562	128842573	A	G
MSX1	rs10213286	4861780	C	T
MSX1	rs1042484	4864381	C	T
MSX1	rs12532	4865146	A	G
MSX1	rs3775261	4863745	A	C
PAX9	rs10131337	37144516	C	T
PAX9	rs11156925	37143145	A	G
PAX9	rs11844675	37144001	A	G
PAX9	rs17104897	37133206	A	G
PAX9	rs17104928	37142554	A	G
PAX9	rs17176643	37142969	A	C
PAX9	rs2236007	37132769	A	G
PAX9	rs8004187	37140504	C	T
LTBP3	rs11227221	65319265	C	T
LTBP3	rs11548537	65305758	C	T

Table III.1 .Polimorfismos (SNPs) incluidos en el estudio (n = 32) en los pacientes con OFC y sus PPG

Gen	Símbolo	Id Ensayo	SNP	Alelos A/B	Crom.	Polimor. detectado	R2
Sonic Hedgehog					7q36	2	
	SHH	C2544057_10	rs1233556	C/T			
Patched 1					9q22.3	32	98%
	PTCH1	C30311445_20	rs10512248	G/T			
	PTCH1	C32723069_10	rs16909865	C/G			
	PTCH1	C11496528_10	rs2066830	A/G			
	PTCH1	C11496532_10	rs2066836	A/G			
	PTCH1	C1435586_1_	rs2236407	A/G			
	PTCH1	Personalizado	rs28394554	G/A			
	PTCH1	C59533087_10	rs28601668	A/G			
	PTCH1	C59533040_10	rs28706464	C/T			
	PTCH1	personalizado	rs357566	A/G			
	PTCH1	C679121_10	rs473902	G/T			
	PTCH1	C679107_10	rs574688	C/G			
	PTCH1	personalizado	rs652525	T/C			
Smoothened homolog (Drosophila)					7q32	11	98%
	SMO	C3208164_10	rs13231139	A/C			
	SMO	C2055273_10	rs2566871	C/T			
	SMO	C26502002_10	rs2718107	A/C			
	SMO	C3208162_10	rs2735842	A/G			
	SMO	C2055272_10	rs4731562	A/G			
Msh homeobox 1					4p16	4	
	MSX1	C30375438_10	rs10213286	C/T			
	MSX1	C2876123_10	rs1042484	A/G			
	MSX1	C26933394_10	rs12532	A/G			
	MSX1	C27479847_10	rs3775261	A/C			
Paired box 9					14q13	8	98%
	PAX9	C0532206_10	rs10131337	C/T			
	PAX9	C2178762_10	rs11156925	A/G			
	PAX9	C31332939_10	rs11844675	A/G			
	PAX9	C33401606_10	rs17104897	A/G			
	PAX9	C2178760_20	rs17104928	A/G			
	PAX9	C460666_10	rs17176643	A/C			
	PAX9	C25473485_10	rs2236007	A/G			
	PAX9	C2178758_10	rs8004187	C/T			
Latent transOFCrming growth factor binding protein 3					11q13	11	
	LTBP3	C3186270_10	rs11227221	C/T			
	LTBP3	C45034917_10	rs11548537	A/G			

Fig. III.6. Esquema de los genes con la ubicación de los SNPs de SHH, PTCH1, SMO, MSX1, PAX9 Y LTPB3.



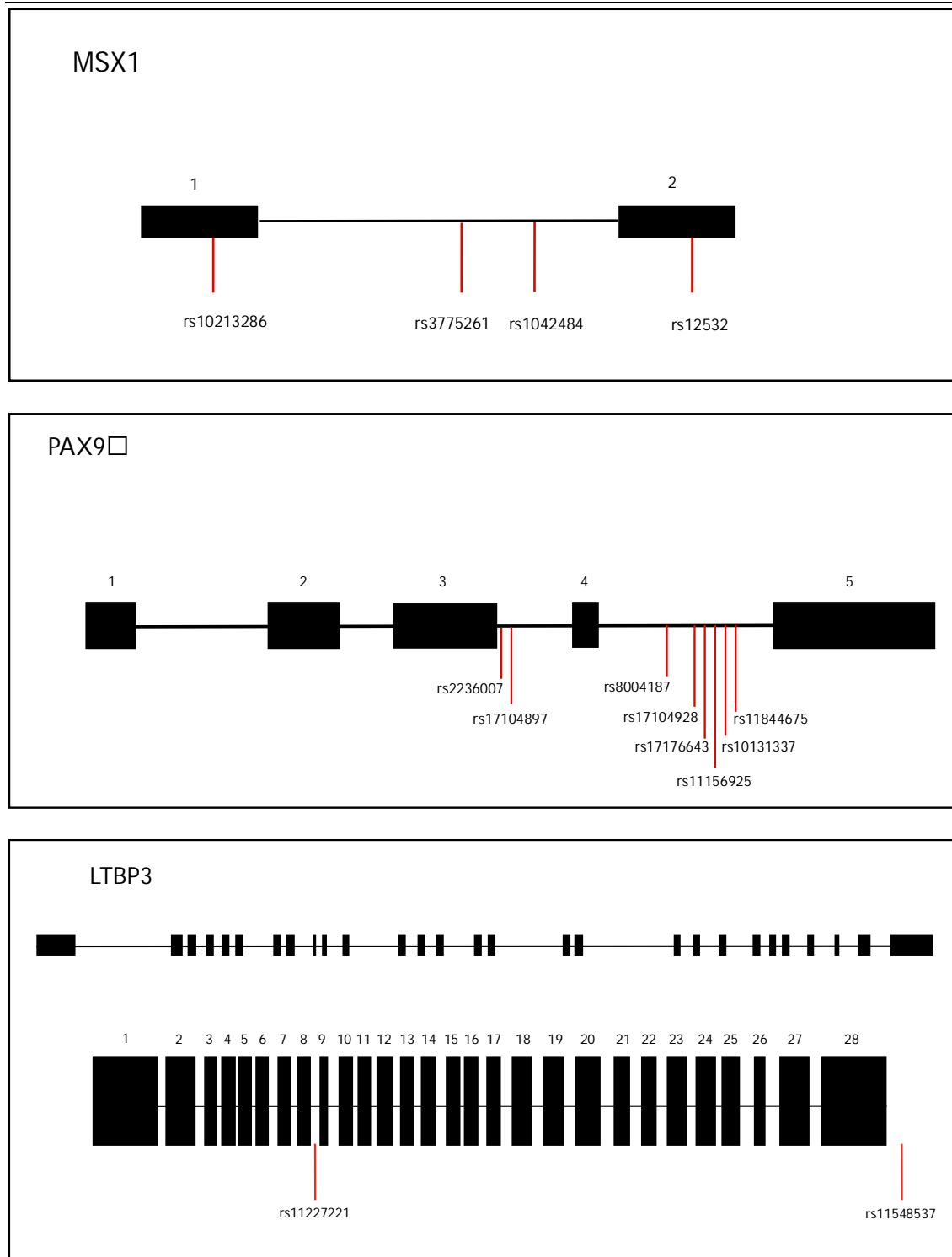


Fig. III.6-(cont) Esquema de los genes con la ubicación de los SNPs de SHH, PTCH1, SMO, MSX1, PAX9 Y LTPB3

Cada **placa de TaqMan OpenArray™** se diseñó para contener los 32 ensayos para el total de muestras (94 muestras de ADN y 2 controles sin ADN (NTCs)).

Las placas se sellaron con el instrumento de sellado **Sellado OpenArray® Case Sealing Station** (Applied Biosystems, Inc.)

Para cada reacción de amplificación se usó un pocillo. El ensayo de múltiple reacción de TaqMan se realizó en un **Dual Flat Block (384-well) GeneAmp PCR System 9700** (Applied Biosystems, Inc.) Fig.III.7.

Se usó un protocolo con las siguientes condiciones de ciclos de la PCR:

- paso inicial a 93°C por 10 minutos
- 50 ciclos de 45 segundos a 95°C
- 13 segundos a 94°C
- 2 minutos, 14 segundos a 53°C
- paso final durante 2 minutos a 25°C
- extensión final a 4°C.

Los resultados de la fluorescencia se leyeron utilizando el software **OpenArray™ SNP Genotyping Analysis version 1.0.5**. (Applied Biosystems, Inc.).(Protocolo extendido)

SISTEMA TAQMAN DE GENOTIPIFICACION.

El sistema OpenArray® de reciente desarrollo y utilización utiliza la reacción en cadena de polimerasa (PCR) basada en reactivos fluorescentes para proporcionar la detección cualitativa de targets mediante el análisis.post-PCR (END POINT).

A través de los experimentos de genotipado se pueden identificar leves variaciones en los genes dentro de una población. Es posible analizar decenas a cientos de polimorfismos (SNPs) de un solo nucleótido en miles a decenas de miles de muestras en pocas horas, con el 99,7% de concordancia entre los datos generados con ensayos del tipo TaqMan. En ensayos de PCR en tiempo real.

8. ALTERACIONES PROPUESTAS AL PLAN DE TRABAJO ORIGINAL

Incluir aquí eventualmente las explicaciones referentes a las razones por las cuales determinadas actividades no han sido realizadas o lo han sido en diferente medida que lo previsto. También fundamentar, si es el caso, cualquier otro tipo de modificación que haya sufrido el proyecto.

Del Proyecto original previsto no se ha podido realizar el análisis cualitativo de las entrevistas y el estudio de genética molecular se ha modificado remplazando la investigación de genes del metabolismo, con genes del desarrollo fundamentales en las vías del metabolismo

Sea realizado la investigación cuantitativa de contaminantes en el suero de los individuos expuestos y no expuestos pero aún no se analizaron los resultados

Para la evaluación de la población del estudio y de toma de muestras, se hizo necesario el traslado del equipo al Hospital de El Soberbio, previa convocatoria pública.

En las fechas establecidas se pudieron estudiar 36 trabajadores rurales y 22 controles. Siendo más difícil contar con individuos voluntarios.

La financiación del traslado estuvo a cargo de la FCEQyN desde la Cátedra Toxicología y Medicina Legal, a la Codirección del Proyecto así como el estudio de Mn y ensayo del cometa.

La financiación del estudio de cuantificación de contaminantes y de genética molecular, estuvo a cargo de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, como parte de un proyecto de cooperación y con una Beca obtenida de la AECID, Embajada española, por concurso , a la dirección del proyecto.

No se ha podido realizar el análisis de los datos obtenidos tanto en las entrevistas como en genética molecular, cuya caracterización genotípica ya se ha hecho, en muchos más genes que los previstos así como el estudio cuantitativo, no previsto en el mismo.

La segunda etapa del Trabajo de Investigación consistirá en terminar con la puesta a punto de la técnica de Ensayo Cometa, a los efectos de poder efectuar la campaña de toma de muestras y poder valorar con ambos ensayos de estudio de genotoxicidad el nivel de impregnación de plaguicidas y el impacto sobre la salud, que ese proceso conlleva.

9. PRODUCCIÓN DEL PROYECTO

Incluir aquí los productos y resultados alcanzado mediante la realización de la investigación.

Para la referencia correspondiente a cada producto comenzar en un nuevo renglón; en el caso de publicaciones, documentos inéditos, informes parciales o finales, y de cualquier material que se anexe a la presentación del informe de avance, indicar '(Anexo ...)’.

A los fines de compatibilizar información con otras Facultades y con la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNaM, sugerimos consignar:

RESULTADOS OBTENIDOS

9.1. Ensayo Cometa:

La puesta a punto de la técnica de Ensayo Cometa en células de mucosa oral resultó muy complicada, debido a que las membranas biológicas de las células resisten el tratamiento de lisis a base de EDTA, Triton x100 y DMSO. Más abajo se detalla las modificaciones introducidas a la técnica, con el objeto de producir la lisis de las células y la obtención de los “nucleoides”. En términos generales las modificaciones se basaron en la introducción de proteasas (tripsina y proteinasa K) a la solución de lisis.

Inicialmente al implementar la nueva solución de lisis se produjo una destrucción masiva de células de la mucosa oral. Posteriormente al ajustar la misma se logró la obtención de algunos nucleoides, aunque un número insuficiente para poder realizar la electroforesis y estudiar los “cometas” (al menos 100 nucleoides).

Las modificaciones introducidas a la técnica del ensayo fueron las siguientes:

- Debido a que obtuvimos escasa cantidad de células en el pellet se implementó una modificación en la obtención de la muestra:

Se sumergió la escobilla con el raspado de células bucales en un eppendorf con 1,5 ml de PBS. Se colocó en agitador Vortex unos segundos, se sacó la escobilla y centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min. Eliminando todo el sobrenadante con pipeta Pasteur.

Quedan aproximadamente 50 µl de suspensión celular. Se agrega aproximadamente 200 µl de ABPF, de tal modo que se puedan preparar dos slides por muestra.

- Debido a que la lisis a pH alcalino con las soluciones estándar no fue suficiente para obtener nucleoides, permaneciendo las células enteras, sin disgregar las membranas, se implementó un paso previo a la lisis que consistió en tratar el slide pre-integrado con una solución de Tripsina y luego Proteinasa K. (Szeto et al. 2005).

Lisis con Tripsina y Proteinasa K:

- Agregar al portaobjeto donde se encuentran las células pre-integradas en agarosa, solución de tripsina (0,25% de tripsina, 1mM EDTA en PBS) en cantidad suficiente para cubrir el porta. Mantener en cámara húmeda durante 30 minutos a 37 ° C.

- Lavar una vez con PBS.
- Tratar con 100 µl de proteinasa K (1mg/ml en solución de lisis pH 7,5) incubar en cámara húmeda durante 1 hora a 37 ° C.
- Luego, mantener en solución de lisis estándar pH 10 durante 1 hora 4°C (por lo menos). Nosotros dejamos 24 hs. Mínimo.

Por tratarse la proteinasa de un reactivo oneroso cuya adquisición resultó complicada, decidimos probar otra opción para realizar la lisis celular: Sumergir los porta preintegrados en solución de tripsina 0,25% en SF durante 30 minutos a 37 ° C. Seguido de un enjuague con SF. Para luego pasar a la solución de lisis estándar. (Vazquez Alvarado et al.)

Después de realizado este paso de lisis por ambos métodos, los slides fueron teñidos con BrEt (sin llegar a realizar la desnaturalización y corrida electroforética) para evaluar la producción o no de la lisis celular. Los resultados fueron los siguientes:

- Muestras lisadas con proteinasa k y tripsina: Se produjo lisis (observación de nucleoides) pero, observamos un bajo número en el recuento.
- Muestras lisadas con tripsina 0,25% en SF.: Se obtuvieron nucleoides aislados (hubo lisis). Pero también en muy baja cantidad.

9.2.- Test de Micronúcleos:

Los resultados de la “Prueba Piloto” incluyen el análisis descriptivo y analítico para la evaluación de daño genotóxico mediante el Test de Mn en mucosa bucal en expuestos a plaguicidas y controles.

- Estadística descriptiva de la población de estudio

El análisis demográfico de la población de estudio se presenta en la tabla 1 y tabla 2.

La población consta de 22 individuos, siendo 6 (27%) mujeres y 16 (73%) varones; 8 (36%) son fumadores, 8 (36%) consumen bebidas alcohólicas y 6 (27%) son además de fumadores, consumidores de bebidas alcohólicas. Con una mediana para la edad de 41 +/-12 años y un rango de 16 a 58 años.

La población consta de 36 individuos, siendo 6 (16%) mujeres y 30 (84%) varones; 8 (22%) son fumadores, 18 (50%) consumen bebidas alcohólicas y 7 (19%) son además de fumadores, consumidores de bebidas alcohólicas. Con una mediana para la edad de 44+/-10 años y un rango de 17 a 59 a

Las dos poblaciones guardan similitud con respecto a las variables; edad sexo y hábitos. Condiciones necesarias para el diseño de estudio planteado.

Todos los individuos consumidores de bebidas alcohólicas lo hacen de una forma ocasional

Tabla 1: Población no expuesta a plaguicidas.

Nº de individuo	Sexo	Edad (años)	Fuma	Alcohol
1	1	22	0	0
2	1	26	0	0
3	1	44	0	0
4	1	42	1	1
5	0	44	0	0
6	1	40	1	1
7	1	48	1	1
8	0	42	0	0
9	1	47	0	0
10	0	28	0	0
11	0	23	0	0
12	1	38	0	1
13	1	20	0	0
14	0	55	0	0
15	0	30	0	0
16	1	58	0	1
17	1	16	1	1
18	1	18	1	0
19	1	43	1	0
20	1	44	0	0
21	1	55	1	1
22	1	28	1	1

Tabla 2: Población expuesta a plaguicidas.

Nº individuo	Sexo	Edad (años)	Fuma	Alcohol	Exposición (años)
1	1	37	0	1	11 a 20
2	0	37	0	0	11 a 20
3	1	29	0	0	< 11
4	1	45	1	1	11 a 20
5	1	25	0	1	11 a 20
6	1	51	0	0	> 20
7	0	39	0	1	11 a 20
8	1	17	0	0	< 11
9	1	57	0	0	11 a 20
10	1	59	0	0	11 a 20
11	1	36	1	1	11 a 20
12	1	47	0	0	11 a 20
13	1	58	0	0	> 20
14	1	52	0	0	11 a 20
15	1	35	1	0	11 a 20
16	1	38	1	1	11 a 20
17	1	48	1	1	> 20
18	1	47	0	0	> 20
19	1	41	1	1	>20
20	1	38	0	1	>20
21	1	33	0	1	11 a 20
22	1	46	0	1	< 11
23	1	54	0	1	11 a 20
24	1	56	0	0	>20
25	1	39	0	0	>20
26	1	43	0	1	>20
27	1	45	0	1	11 a 20
28	1	32	0	0	11 a 20
29	0	36	0	1	11 a 20
30	0	35	0	0	< 11
31	1	56	1	1	>20
32	0	56	1	1	> 20
33	1	58	0	1	>20
34	0	40	0	0	11 a 20
35	1	46	0	0	11 a 20
36	1	47	0	0	< 11

Referencias; sexo: 1-masculino, 0-femenino; fumar: 1-fumador, 0-no fumador; alcohol: 1-consume, 0-no consume

9.3. Evaluación de efecto genotóxico por el ensayo de Micronúcleos en mucosa bucal.

El daño genotóxico determinados mediante la frecuencia de Mn en mucosa bucal en expuestos a plaguicidas y no expuestos, se observa en las tablas a y b (Ver ANEXO I Y ANEXO II) respectivamente.

El análisis descriptivo de la variable resultado (frecuencia de Mn de cada grupo) demostró que la misma solo adquiere ciertos valores como podemos observar en el siguiente grafico (Fig 13) de distribución de probabilidades (es una variable cuantitativa discreta, es una proporción).

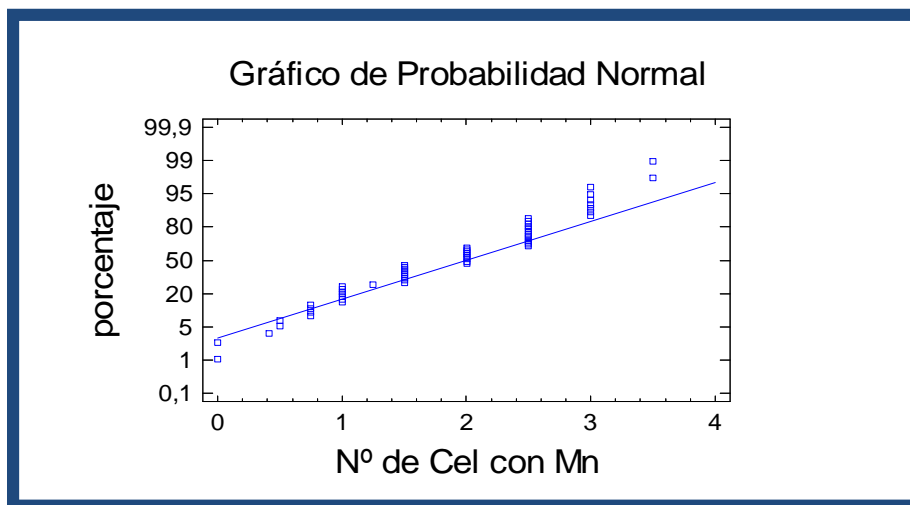


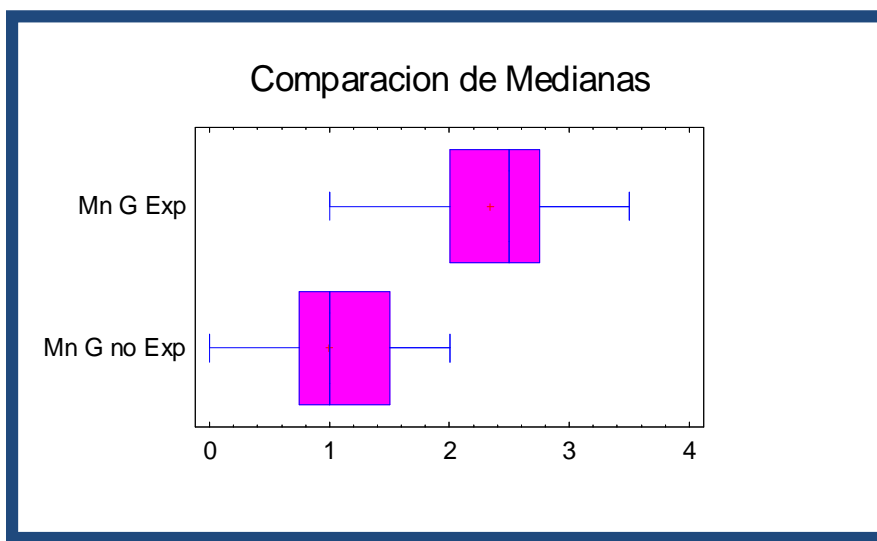
Figura Nro. 1: Gráfico de distribución de probabilidad para la variable resultado

El análisis de comparación de medianas utilizando la prueba de U-Mann-Whitney se observa en la tabla 6, donde existe un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia del número de Mn en los expuestos a plaguicidas con relación a los no expuestos para un p-valor $< 0,05$, gráficamente podemos observar mediante el gráfico de Cajas y Bigotes (Fig 14). El p-valor obtenido para la comparación de las medianas fue de $1,5 \times 10^{-8}$.

Estos resultados nos llevaron a rechazar la H_0 y aceptar la H_1 , confirmando así la hipótesis de investigación planteada.

Tabla 3. Daño genotóxico, Micronucleos en mucosa bucal en expuestos y controles.

VARIABLE	Nº Mn/grupo	MEDIANAS
Grupo Expuestos	84	2,5
Grupo no Expuesto	22	1

**Figura Nro. 2: Gráfico de cajas y bigotes para las medianas de las frecuencias de Cel. con Mn obtenidas para ambos Grupos.**

9.4. Análisis de las variables de confusión

Luego de observar que las medianas de la frecuencia de Mn, de ambos grupos fueran estadísticamente diferentes para el nivel de confianza planteado, se procedió a analizar las variables de confusión (sexo, edad, habito de fumar y el consumo de bebidas alcohólicas) y el número de células micronucleadas para cada Grupo.

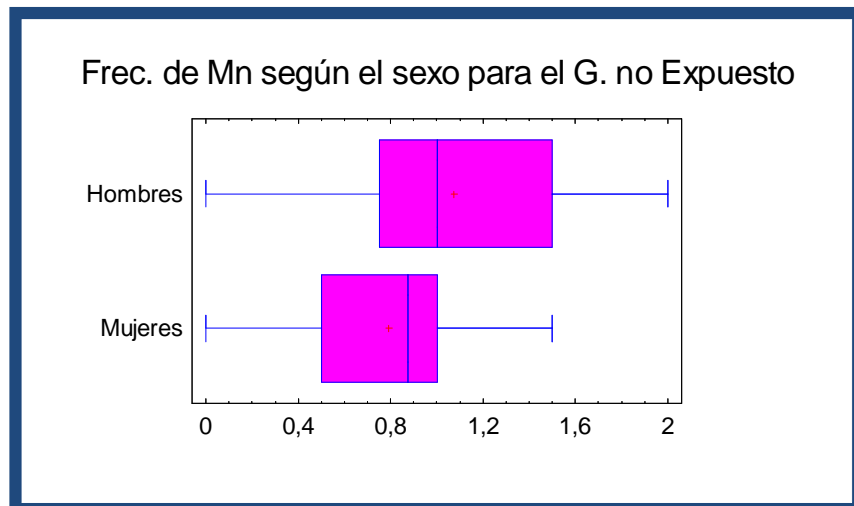
a.- Variable de confusión: SEXO

Grupo no Expuesto:

Sexo	Mediana de la Frecuencia de Mn
Hombres (16)	1

Mujeres (6)

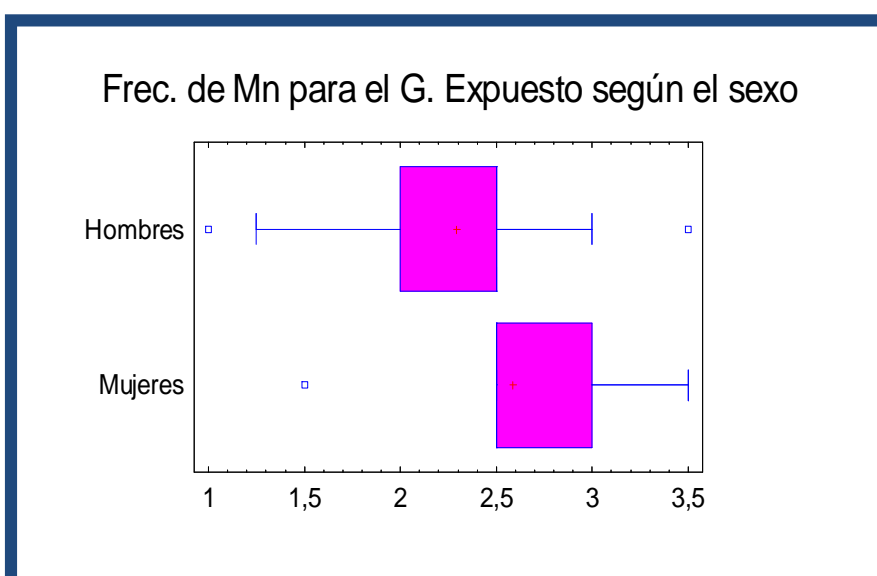
0,87



Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,36), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea el sexo no influye en el número de células con Mn para el Grupo no Expuesto, según este estudio.

Grupo Expuesto:

sexo	Mediana de la Frecuencia de Mn
Hombres (30)	2,5
Mujeres (6)	2,5



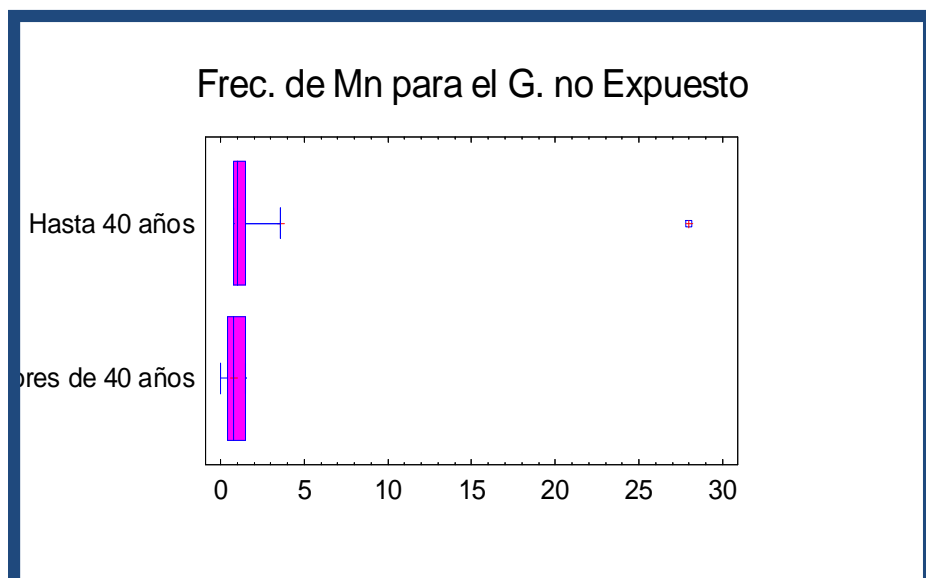
Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,31), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea el sexo no influye en el número de células con Mn para el Grupo Expuesto a agrotóxicos, según este estudio.

b. Variable de confusión: EDAD

Para evaluar esta variable se separó dos grupos etarios, un grupo formado por aquellos individuos cuya edad era menor o igual a 40 años y otro grupo formado por aquellos cuya edad era mayor de 40 años.

Grupo no Expuesto:

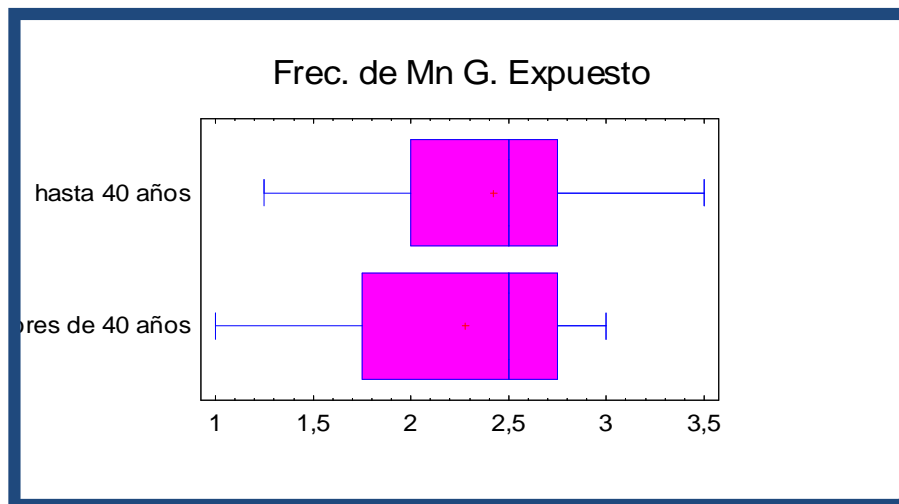
Edad (años)	Mediana de la Frecuencia de Mn
Menor y/o igual a 40 (11)	1
Mayor de 40 (11)	0,75



Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,10), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la edad no influye en el número de células con Mn para el Grupo no Expuesto, según este estudio.

Grupo Expuesto:

Edad (años)	Mediana de la Frecuencia de Mn
Menor y/o igual a 40 (16)	2,5
Mayor de 40 (20)	2,5



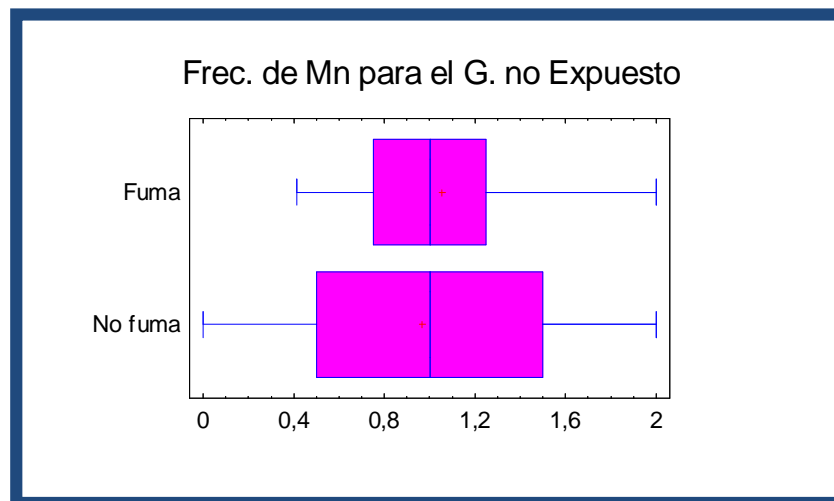
Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,65), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la edad no influye en el número de células con Mn para el Grupo Expuesto, según este estudio.

c. Variable de confusión: FUMAR

Para esta variable solo se tuvo en cuenta si el individuo fumaba o no, no se consideró el número de cigarrillos consumidos diariamente ni tampoco los años de consumo.

- **Grupo no Expuesto:**

Fumar	Mediana de la Frecuencia de Mn
Fumadores (8)	1
No fumadores (14)	1

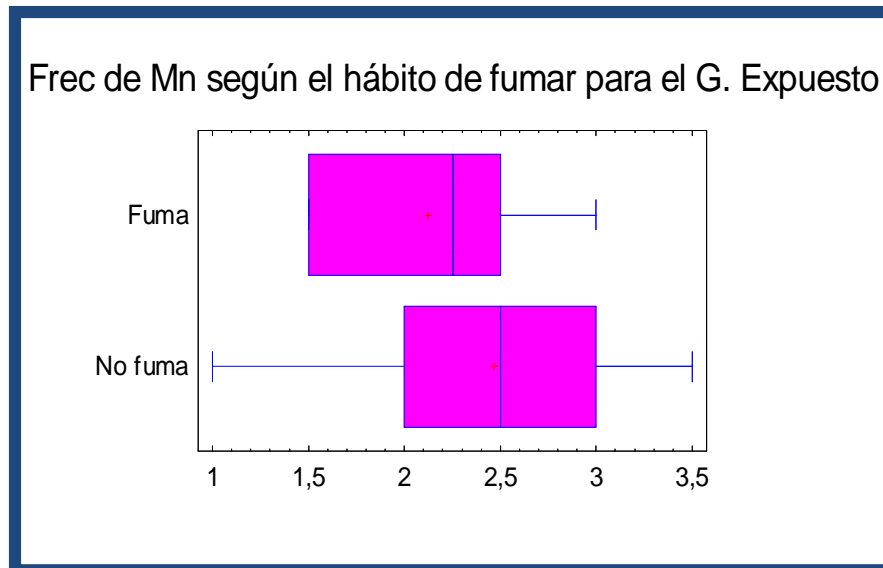


Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,86), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la variable fumar no influye en el número de células con Mn para el Grupo no Expuesto, según este estudio.

- **Grupo Expuesto:**

Fumar	Mediana de la Frecuencia de Mn
-------	--------------------------------

Fumadores (8)	2,25
No fumadores (28)	2,5



Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,16), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la variable fumar no influye en el número de células con Mn para el Grupo Expuesto, según este estudio.

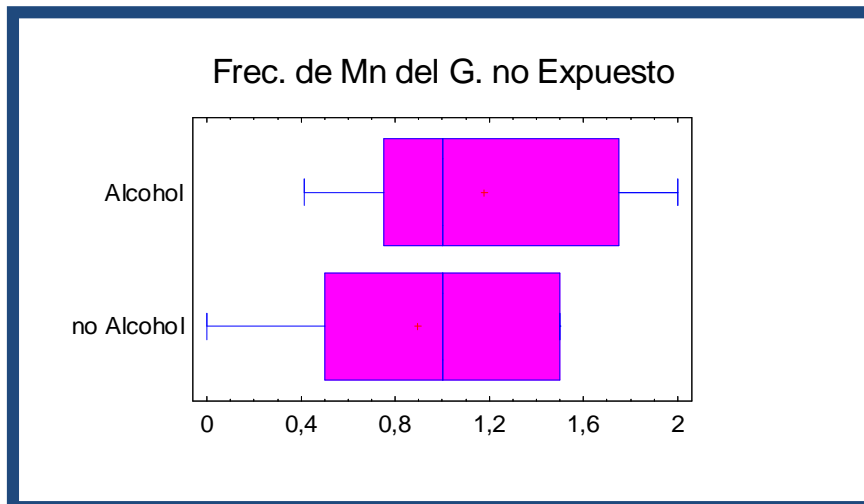
d. Variable de confusión: CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Para esta variable solo se tuvo en cuenta si el individuo consumía o no algún tipo de bebida con contenido alcohólico, no se consideró la frecuencia del consumo ni el tenor alcohólico de las bebidas consumidas.

- **Grupo no Expuesto:**

Consumo de bebidas	Mediana de la Frecuencia de Mn
--------------------	--------------------------------

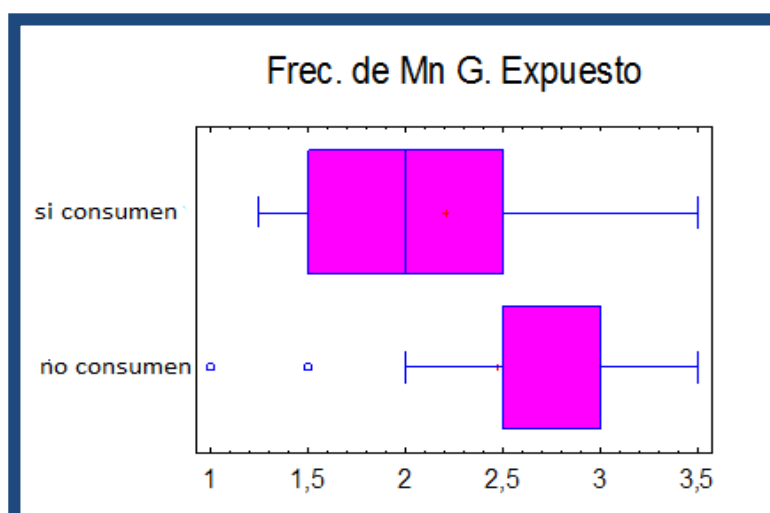
alcohólicas	
Si (8)	1
No (14)	1



Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,42), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la variable consumo de bebidas alcohólicas no influye en el número de células con Mn para el Grupo no Expuesto, según este estudio.

- **Grupo Expuesto:**

Consumo de bebidas alcohólicas	Mediana de la Frecuencia de Mn
Si (18)	2
No (18)	2,5



Dado que el p-valor es mayor o igual a 0,05 (0,15), no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas para un nivel de confianza del 95,0%. o sea la variable consumo de bebidas alcohólicas no influye en el número de células con Mn para el Grupo Expuesto, según este estudio.

DISCUSION.

Test de Micronúcleos:

En el enfoque epidemiológico molecular, la medición de biomarcadores moleculares o celulares como indicadores del riesgo de enfermedad o de exposición, tiene aplicaciones en los estudios de exposición ambiental y ocupacional. El propósito principal de utilizar biomarcadores es la vigilancia, esto es la identificación de personas o poblaciones en riesgo, para permitir la aplicación de medidas preventivas o correctivas. (7)

Los trabajadores agrícolas de la presente investigación, fueron seleccionados por sus características particulares de trabajo, donde la actividad agrícola es intensa, el uso de los plaguicidas es indiscriminado y con manejo inadecuado, situación que supone un alto nivel de exposición del productor y su familia. En el Municipio de El Soberbio los agricultores tabacaleros están en una continua exposición a distintos agrotóxicos (propios del cultivo que practican, así como también del herbicida glifosato).

Es así que los resultados obtenidos nos sugieren que, la exposición ocupacional a plaguicidas causó daño en el material genético de las células somáticas, pues el test de Mn en mucosa bucal (biomarcador utilizado) demostró incremento de daño genotóxico en los trabajadores agrícolas ocupacionalmente expuestos a plaguicidas en relación a los controles ($p < 0.05$). Los plaguicidas a los que están expuestos, mostraron tener efecto genotóxico, sobre todo efecto clastógeno y aneuploidogénico que pudieron inducir a la formación del Mn, como resultado de rupturas de cadena doble del ADN no reparadas, de daño al centrómero, cinetocoro o fibras del huso acromático (8). Estos datos nos

indican que la población rural de este municipio, por la actividad que realiza pondría en riesgo su salud.

La evaluación de exposición a plaguicidas individuales en exámenes de vigilancia en humanos es muy difícil porque la mayoría de los modelos agrotécnicos implican el uso regular de un gran número de pesticidas diferentes, junto con otros productos químicos como los coadyuvantes, que varían mucho en su toxicidad potencial (9). Entonces es muy difícil sacar conclusiones específicas sobre el daño genotóxico causado por un tipo específico de plaguicida. Se cuenta con poca información sobre el efecto genotóxico de mezclas complejas, aunque ha sido comprobado que el nivel de exposición y el uso de varios plaguicidas por separado produce genotoxicidad de forma significativa, en poblaciones ocupacionalmente expuestas a estos productos (Faust et al. 2004) (10).

El tiempo de exposición o años que los trabajadores llevan empleando plaguicidas, no fue tenido en cuenta en este estudio, debido que el biomarcador utilizado permite evaluar solo el daño genotóxico como resultado de la exposición aguda a los mismos. Pero se sabe que existe un daño crónico acumulativo, que se va incrementando con el paso del tiempo. Las exposiciones crónicas son difíciles de evaluar ya que los efectos que se observan son resultado de una exposición continua a diferentes compuestos y en concentraciones desconocidas (11). Ahora bien, generalmente a mayor tiempo de exposición, mayor cantidad de producto que se puede acumular en el organismo y se manifiestan con diferentes efectos sobre la salud.

Para el biomarcador utilizado en este estudio, Ensayo de Mn en mucosa bucal, las características individuales como ser; el sexo, la edad, consumo de tabaco y el consumo de alcohol, no mostraron resultados significativos, a pesar que la bibliografía así lo atestigua, (fundamentalmente para alcohol y tabaco)(12) (13), por lo que podríamos suponer que estas variables no han influido en el estudio del daño genotóxico, probablemente porque las muestras de la población de Expuestos y de No Expuesto a plaguicidas es de pocos individuos. Existen otros trabajos, como ser los realizados por Garaj- Vrhovac y col. (14) y otros estudios similares en los que los resultados indicarían que el hábito de fumar no influye en el daño genotóxico por plaguicidas.

Al no haber antecedentes de investigaciones semejantes a este estudio, en la Provincia de Misiones, nos imposibilitó hacer una comparación mas detallada sobre los resultados obtenidos. Estudios realizados por Gomez – Arroyo y col. (15) han encontrado un incremento de la frecuencia de Mn en células de mucosa bucal en agricultores, sin embargo estos autores encontraron niveles del biomarcador bastante altos (de 3.8 Mn en

controles y 10 Mn en expuestos por 1000 células) comparados con los resultados obtenidos en el presente trabajo (de 1,00 y 2,50 Mn respectivamente) atribuimos las diferencias encontradas a que se tratan de modelos agrotécnicos y características geográficas distintas, y más considerar la susceptibilidad individual de cada individuo que participó en el estudio. A pesar del riesgo asociado con exposición a plaguicidas los individuos están a menudo expuestos a una mezcla variable de sustancias químicas, de ahí que existe un rango complejo de valores de exposición que puede ser responsable para la variación de niveles de genotoxicidad entre diferentes estudios de biomonitorio en personas expuestas a plaguicidas.

La técnica de detección de Mn en las células epiteliales de la mucosa oral, resultó de gran utilidad como estudio de biomonitorio por presentar suficiente sensibilidad para la detección de exposición a agentes tanto genotóxicos como clastógenos y aneuploidógenos. Propiedad que puede ser atribuida a su potencial para expresar una variedad de enzimas de activación carcinógena (Faust et al. 2004) (16). A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir por otra parte que la técnica aquí utilizada demostró ser sumamente eficaz para monitorear poblaciones sospechadas de estar expuestas a sustancias genotóxicas tal como sugieren Dulout et al. (1996) (17), Fenech et al, (1997) (18).

Como es bien conocido, muchos de los efectos adversos para la salud son el resultado del daño genético inducido por agentes genotóxicos, tanto en las células somáticas como en las germinales. Si el daño se produce en la línea somática, entre otros efectos, puede derivar en cáncer, contribuir al envejecimiento prematuro y producir enfermedades vasculares, entre otros. Asimismo, si el daño se induce en células germinales puede afectar tanto a los individuos expuestos (efectos sobre la fertilidad), como a su descendencia. (19) Por consiguiente, está claro el gran impacto en la salud humana, que las enfermedades genéticas presentan, y que hay que dedicar todos los esfuerzos posibles para minimizar la exposición a plaguicidas que puedan desarrollar de las mismas.

La trascendencia de éstos estudios radica en la posibilidad de brindar información acerca del riesgo al que se exponen las personas en contacto con éstas sustancias, de forma que los trabajadores y la sociedad tomen conciencia del problema y generen las formas en la que se ha de resolver. En primera instancia utilizar equipo adecuado de protección, ya que se ha demostrado que los trabajadores expuestos a plaguicidas de forma protegida, presentan menos daño en el ADN (Pastor et al. 2001, Bolognesi 2003) (20)

(21); presionar para la prohibición de plaguicidas muy tóxicos, como ha sucedido en otros países; establecer normas y medidas reales de control hacia fabricantes, distribuidores y usuarios; desarrollar programas de concientización para el uso y manejo de éstas sustancias; generar las condiciones para la reintroducción de técnicas tradicionales y alternativas para el control de plagas, pudiéndose combinar con la aspersión de plaguicidas benévolos.

Nuestro estudio mostró que los productores y sus familias, directa e indirectamente expuestos a plaguicidas, tuvieron un daño genotóxico, según las condiciones del diseño experimental planteado. Sería importante ampliar el tamaño de la muestra y realizar seguimientos sistemáticos de las poblaciones expuestas a plaguicidas utilizando varios biomarcadores de exposición y efecto, como parte de un plan de trabajo de investigación multidisciplinario.

Ensayo Cometa:

A esta altura del desarrollo del trabajo de investigación, los resultados indican que es necesario continuar con la puesta a punto de la técnica.

Los referentes a nivel de nuestro país (para nosotros Dra. Marta Carballo – GINETOX, Fac. de farmacia y Bioquímica, UBA y Dra. Fernanda Simoniello. Cátedra de Toxicología y Qca. Legal. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL), poseen escasa experiencia en la aplicación de Ensayo Cometa en células de Mucosa oral. Esta situación hace que sea para el equipo de investigación más dificultosa la puesta a punto de la técnica.

Es numerosa la bibliografía internacional que refiere a las dificultades de la lisis de las células de mucosa oral y la necesidad de utilizar proteasas, junto a los detergentes, en la solución de lisis. (Valverde et al, 1997) (22)

Las modificaciones a la técnica de lisis se basaron primeramente en los trabajos de Szeto y col. (23), que consistió en tratar el slide pre-integrado con una solución de Tripsina y luego Proteinasa K. Esta modificación produjo una destrucción muy alta de células y escasos nucleoides. Mejores resultados obtuvimos mediante la aplicación de la técnica de Vazquez Alvarado y col. (24), que aplican en la lisis de células de mucosa oral, solo Tripsina.

Pensamos, no obstante, subsanar el bajo recuento de nucleoides por medio de dos acciones: por un lado “enriqueciendo” la muestra como lo detallamos en el primer ítem. Por otra parte, pensamos que la Tripsina, colocada sobre el slide pre-integrado e

incubada a 37 °C para que actúe, tal vez disuelva exageradamente las membranas, o bien al estar a esa temperatura se disuelva y pierda la muestra que está en un agar de bajo punto de fusión. Por esto, probaremos próximamente realizar la lisis con Tripsina directamente en la suspensión celular, previo a la siembra del porta-objetos.

A pesar de las dificultades que representa trabajar en la obtención de cometas en células epiteliales bucales, e incluso por tratarse de una muestra que genera “cometas atípicos” según algunos trabajos consultados (Pinhal et al, 2005) (25), creemos que es de suma utilidad el desarrollo de esta técnica, dado que la obtención de la muestra (mucosa oral) es de fácil obtención e incruenta, lo cual facilita de sobremanera la labor, sobre todo cuando se implementan campañas de valoración de impacto ambiental, donde la obtención de muestras se realiza en lugares retirados de los laboratorios (como en nuestro caso) e involucra a niños o a personas reacias a una punción venosa.

CONCLUSIONES

- Los trabajadores agrícolas, de la zona rural del municipio de El soberbio expuestos a plaguicidas, mostraron un aumento estadísticamente significativo en el daño ocasionado al ADN con respecto a las personas no expuestas, evaluados mediante el análisis de Mn en células epiteliales de la mucosa oral a través del aumento en la frecuencia de células micronucleadas.
- No observamos diferencias estadísticamente significativas, tanto para el Grupo Expuesto como para el Grupo no Expuesto, en función a las variables: edad, sexo, hábitos tabáquico y el consumo de bebidas alcohólicas

• Bibliografía

1. Abell A., Juul S. y Bonde J. (2000). *“Time to pregnancy among female greenhouse workers”*. Scand. J. Work Environ. Health 26, 131-136.
2. Bhalli J., Khan Q., Haq M., Khalid A. y Nasim A. (2006). *“Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry”*. Mutagenesis 21, 143-148
3. Carrano A.V., Natarajan A.T. *“Considerations for population monitoring using Cytogenetic Techniques”*. Mutat. Res. 204: 379 -406

4. Mudry M.D.; Carballo M.A. Texto *"Genética Toxicológica"*. Pág. 91 – 92. Ed. De los cuatro vientos. Buenos Aires. 2006
5. Venegas L.Z. Tesis doctoral *"Optimizaciones metodológicas del Ensayo Cometa y su aplicación en biomonitorización humana"* Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. 2009.-
6. Martínez-Valenzuela C.; Gómez-Arroyo C. *"Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas"*. Rev. Int. Contam. Ambient. 23 (4) 185-200, 2007. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. México.
7. Baranger D.; Casteglioni, G.; Gonzalez, C.; Herrera, J.L.; Rodríguez, F. *"Tabaco Y Agrotóxicos: Un estudio sobre productores de Misiones"*. Editorial Universitaria de Misiones. Posadas (Misiones) 2007.- Texto pag 78. ISBM 978-950-579-081-4.
8. Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A. y Marcos R. (1993). *"Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides"*. Mutagenesis 8, 511-516
9. Simoniello M.F. y otros. *"DNA damage in workers occupatonally exponed to pesticida mixtures"*. Journal of Applied Toxicology. Cát. de Toxicología y Oca. Legal. FByCB – UNL 2007: 121-123
10. Kruchowski S.C.; Fenocchio S.A. *"Estimación Preliminar de Daño citogenetico en una Población Ocupacionalmente Expuesta a Agroquímicos en la Provincia de Misiones"*, tesina de graduación, FCEQyN-UNaM año 1998. pag18
11. Mudry M.D.; Carballo M.A. Texto *"Genética Toxicológica"*. Ed. De los cuatro vientos. Buenos Aires. 2006. 256-350
12. Garte S. y Bonassi S. (2005). *"Linkining toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-Specialissue overview"*. Mutat. Res. 592, 3-5
13. Curci O. Texto *Toxicología. Cap. 18 Toxicología genética*. Pag. 377. Editorial La Prensa Médica Argentina. Buenos Aires. 2005
14. Bolognesi C. (2003). *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies*. Mutat. Res. 543, 251-272
15. Martínez-Valenzuela C.; Gómez-Arroyo C. *"Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas"*. Rev. Int. Contam. Ambient. 23 (4) 185-200, 2007. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM. México

16. Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V., 2004. "The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies". *Mutation Research* 566, 209–229.
17. Dulout F. N.; Grillo C. A.; Seoane A. I.; (1996). "Ensayos de genética toxicológica con base Citogenética". CECEBA, Cuaderno de Genética Nro. 4. Fac. Cs Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata.
18. Fenech M. (1997) "The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population". *Mutat. Res.*, 285: 35-44.-.
19. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, Tsuchimoto D, Tsuzuki T, Nakatsu Y. Source. "Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids". *Biol Chem.* 2006 Apr;387(4):373-9. Division of Neurofunctional Genomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka, 812-8582, Japan.
20. Pastor S., Creus A., Parrón T., Cebulska-Wasilewska A., Siffel C., Piperakis S. y Marcos R. (2001). "Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers". *Mutagenesis* 18, 249-258
21. Bolognesi C. (2003). "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies". *Mutat. Res.* 543, 251-272.
22. Valverde, M.; Lopez, M. C.; Lopez, I.; Sanchez, I.; (1997) "DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mejoco City". *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 147-152.-
23. Y.T. Szeto , I.F.F. Benzie , A.R. Collins , S.W. Choi , C.Y. Cheng, C.M.N. Yow, M.M.Y. Tse. – "A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies" – (2005). *Mutat. Res.*, 285: 22-28.-.
24. Vazquez Alvarado, P; Prieto García, F; Coronel Olivares, C; Gordillo Martínez, A; Hernandez Ceruelos, A. – "Daño Genotóxico de la Aplicación Clínica de Fluoruro". Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología Ciencias Alimentarias. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (3) 163-175, 2005
25. Pinhal, D; Marques de Miranda Cabral Gontijo, A; Valenzuela Reyes, V; Favero Salvadori, D "Viable human buccal mucosa cells do not yield typical nucleoids: Impacts on the single-cell gel electrophoresis/comet assay" – 2005. *Environ. Mol. Mutagen.* 28: 155 – 164.-

1. Publicaciones

Publicaciones: Indicar apellidos y nombres de todos los autores, entre comillas el título del artículo, luego subrayado el nombre de la revista, año, volumen, número, y páginas. Para libros subrayar el título, y consignar lugar, editorial, y año.

1.1. Libros resultados del proyecto de investigación

1.2. Capítulos de libros

1.3. Publicaciones en revistas de ciencia y técnica con referato externo:

1.3.1 Artículos publicados en revistas Internacionales

1.3.2 Artículos publicados en revistas Nacionales incluidas en el CAICYT

Padula DH; Martin MC: Mucositis bucal en trabajadores rurales en Misiones; Argentina, expuestos a agroquímicos: reporte de 3 casos. RAOA VOL 99n 2160-163. Abril-mayo 2011

1.3.2 Artículos publicados en revistas Nacionales con referato no incluidas en el CAICYT

Las revistas consideradas pueden ser en versión impresa o digital.

1.4 Publicaciones en congresos (con evaluación)

1.4.1 Con publicación de trabajos completos

1.4.2 Con publicación de resúmenes

Las Actas pueden ser en versión impresa o digital.

2. Vinculación y Transferencia

2.1 Resultados en Títulos de propiedad intelectual logrados en el período

2.1.1 Patentes de Productos y Procesos registrados

2.1.2 Acciones de transferencia que resulten del Proyecto de Investigación y que estén acreditados a través de convenios, disposiciones, contratos, etc.

3. Formación de Recursos Humanos

3.1. Dirección de Tesis de Doctorado Concluidas

3.2. Dirección de Tesis de Doctorado en curso

3.3. Dirección de Tesis de Maestría Concluida

3.4. Dirección de Tesis de Maestría en curso

3.5. Dirección de Trabajo Final Integrador de la Especialización

Tesis de grado para Bioquímico. Javier Marx. Diciembre de 2011

3.6 Dirección de Trabajo Final Integrador de la Especialización

4. Premios

4.1. Premios Internacionales

4.2. Premios, reconocimientos y menciones, Nacionales

5. Ponencias y comunicaciones

Se trata de trabajos presentados a congresos, simposios, reuniones, etc. Al igual que en el caso de los artículos, se consignan todos los autores, el título de la comunicación o ponencia entre comillas, y subrayado el nombre del evento, agregando institución organizadora, lugar y fecha de realización.

6. Trabajos inéditos

7. Síntesis para la difusión de los resultados en Internet

Se espera que sintetice en forma breve y accesible para la difusión los avances y resultados del proceso de investigación, a fin de que estén disponibles para exhibirlos en la página web de la Secretaría de Investigación y Posgrado de la FHCS y de la SGCyT de la UNaM.

Firma Director de Proyecto

Aclaración:.....

Fecha de presentación del Informe de Avance – Final.....

Presentar 1 (una) copia en papel y acompañar en soporte digital incluyendo los Anexos.

Anexos

ANEXO I

Código	Mn/ 1000 cel. Porta 1	Mn/1000 cel Porta 2	Promedio Mn/1000 cel
5807	2	2	2
7763	3	2	2,5
2333	3	3	3
2847	2	1	1,5
5934	4	3	3,5
6313	3	2	2,5
7849	2	3	2,5
1205	1	2	1,5
8246	3	2	2,5
5556	2	3	2,5
9186	2	0,5	1,25
6345	1	3	2
3801	3	3	3
4899	3	3	3
5740	3	2	2,5
1007	2	2	2
2044	2	3	2,5
2471	2	3	2,5
0301	1	2	1,5
3756	2	2	2
3523	2	3	2,5
3186	2	2	2
9186	3	1	2
4377	3	2	2,5
2276	2	3	2,5
4661	1	2	1,5
5991	3	3	3
0945	2	2	2
9711	3	3	3
0027	3	2	2,5
6510	2	3	2,5
8786	2	1	1,5
5283	3	3	3
6917	3	4	3,5
1827	2	0	1
2073	3	3	3
Total	85	83,5	84,25
Mediana	2,36	2,31	2,50

**Tabla a: Frecuencia de
Micronucleos, Grupo
Expuesto a plaguicidas**

ANEXO II**Tabla b. Frecuencia de Micronucleos, Grupo NO Expuesto.**

Código	Mn/1000 cel porta 1	Mn/1000 cel porta 2	Promedio Mn/1000 cel
5291	0,5	1	0,75
0815	1	2	1,5
4590	0	0	0
5940	0,5	0,33	0,415
9999	1	1	1
7274	1	1	1
0099	0,5	1	0,75
9028	0	0	0
3436	1	2	1,5
4585	0,5	1	0,75
3070	1	1	1
5531	2	2	2
6930	1	1	1
8665	0	1	0,5
1706	1	2	1,5
5564	1	2	1,5
4427	0,5	1	0,75
3294	1	1	1
2731	1	2	1,5
1033	0	1	0,5
2092	1	1	1
3830	2	2	2
Total	17,5	26,33	21,915
Mediana	0,79	1,19	1,00

ANEXO III**Formulario de Consentimiento- El Soberbio. Noviembre 2010**

Proyecto: “Ensayo de Micronucleos, como Biomarcador de Genotoxicidad en Colonos Expuestos a Agrotóxicos”

Por la presente autorizo a que se me extraiga una muestra de células epiteliales de la mucosa oral, y a mi hijo, para la realización del ensayo de Micronucleos, comprendido en el estudio para determinar daño genotóxico producido por la exposición a plaguicidas que consiste en la extracción de una única muestra, por un método no invasivo, el cual no traerá ningún riesgo para mi salud y la de mi hijo.

También se me pedirá que complete un cuestionario antes o después de la toma de muestra, sobre mí, o mi hijo, mi familia y el lugar donde vivimos, que no lleve más de 10 minutos.

Declaro además conocer en qué consiste el Proyecto y mi participación es voluntaria.

Como adulto responsable:

- *He sido informado sobre los procedimientos del estudio descriptos en la formulación de consentimientos (que poseo una copia), me han sido explicados y que las dudas que he tenido me han sido aclaradas adecuadamente.*
- *Entiendo los posibles beneficios de participar en el estudio como así los riesgos.*
- *He tenido tiempo suficiente para reflexionar sobre mi decisión de participar en este estudio.*
- *Entiendo que puedo retirar a mi hijo o retirarme del estudio en cualquier momento.*
- *He sido informado que en el caso de tener dudas o preguntas sobre el estudio contactaré al grupo responsable de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales: persona de contacto: Dr. Carlos González : (03752)427687*
- *He sido informado que en caso de tener dudas o preguntas sobre la salud de mi hijo contactaré al Centro de Salud más cercano.*

Nombre del niño	Fecha	
Firma del Padre o tutor	Aclaración	Fecha
Firma de persona adulta	Aclaración	Fecha

Le he explicado este estudio a la persona autorizada a firmar y acuerdo en que lo ha comprendido.

Firma del investigador	Aclaración	Fecha
------------------------	------------	-------

ANEXO IV**ENCUESTA Y TOMA DE MUESTRAS****I DATOS PERSONALES:****APELLIDO Y NOMBRE:****DNI:**

Edad: Sexo: Talla: Peso: N° de hijos:

II: TIPO DE MUESTRA**1. Células mucosa oral****III: DATOS DE LA VIVIENDA Y CHACRA**

Región:	Departamento o Partido:	Localidad:
Tamaño de la Finca: hectáreas	Cultivos que se practican:	Mes del año:

IV: ESTADO DE SALUD

¿usted tiene alguna enfermedad o la ha tenido en los últimos meses?

SI Describir:.....

NO.....

¿Usted está tomando algún medicamento?

SI ¿Cuál?.....

NO

11. ¿Usted tiene alguna enfermedad hepática?

SI.....Describir:.....

NO

12. ¿Desnutrición?

SI

NO

13. ¿Enfermedades de médula ósea?

Anemias

Leucemias

14. ¿Tiene diabetes? Medicación: SI NO

Dieta: SI NO

¿Algún familiar tiene diabetes? SI NO

15. ¿Fuma?

Si... ¿Qué cantidad?

NO

16. ¿Toma alcohol?

SI¿Qué toma? ¿Qué cantidad?.....

NO

V: EXPOSICION A QUIMICOS**1. ¿Para qué utiliza químicos? (marque todas las mencionadas)**

A. Para controlar o mitigar plagas	C. Para protección de las cosechas
B. Obtener mejores rendimientos	D. No sabe

E. Otros: _____

2. ¿Conoce otras formas de controlar las plagas? (marque todas las mencionadas)

A. Control biológico	B. Manejo Integrado de Plagas.
C. Insecto estéril	D. Control orgánico
E. Otros: _____	

3. ¿Cuánto hace que trabaja con químicos?

A. Menos de 1 año	B. 1 a 10 años	C. 11 a 20 años	D. Más de 20 años
-------------------	----------------	-----------------	-------------------

4.

Desde que edad?

A. Menor de 15 años	B. 16 a 30 años	C. Mayor de 30 años
---------------------	-----------------	---------------------

5. ¿Quién prepara el químico? (marque todas las mencionadas)

A. La persona que responde	B. Productor
C. Personal contratado	D. No sabe/No contesta
E. Otros: _____	

6. ¿Cómo se protege cuando tiene que manipular el químico? (marque todas las mencionadas)

A. Guantes	B. Botas	C. Lentes	D. Pantalón especial
E. Camisa especial	F. Máscara	G. Otros:	H. Ninguno

7. ¿Qué condiciones climáticas tiene en cuenta para la aplicación del químico? (marque todas las mencionadas)

A. Viento	B. Lluvia	C. Calor
D. Humedad	E. No las tiene en cuenta	F. Otras

8. ¿A qué hora del día suele aplicar los agroquímicos? (marque todas las mencionadas)

A. Mañana temprano	B. Media mañana	C. Mediodía
D. Tarde temprana	E. Atardecer	F. Otras

9. ¿Cuáles son los químicos que usa

Nombre del químico	Método de aplicación:	Principio activo y Vehículo (si corresponde)	Cuándo	Cuántas veces

Consignar: Bactericida(A); Nematicida(B); Acaricida (C); Fungicida (D); Herbicida (E); Insecticida (F); Otro (G)

¿Sintió malestar?

¿Qué síntomas tuvo?

(Para Los que no aplicaron agroquímicos)

10. ¿Cuándo fue la última vez que ingresó al cultivo/rozado/huerta?

11. ¿qué actividad realizó allí?

ANEXO V**Preparación del colorante naranja de acridina (NA) y coloración de los preparados**

1. Preparar una solución madre de concentración final 10 mg/ml en PBS (ej 100 mg. de NA en 10 ml de PBS). Guardar protegido de la luz y a temperatura ambiente.
2. Preparar una solución de trabajo 0,1 mg/ml en PBS (ej 10 μ l de colorante en 990 μ l de PBS), momentos antes de la coloración, guardar en lugar protegido de la luz, la solución de trabajo puede ser utilizada hasta tres días posterior a su preparado, siempre y cuando este protegida de la luz.
3. Agregar una pequeña cantidad de colorante sobre el extendido, cuyas células a estudiar fueron previamente fijadas, colocar un cubreobjeto, y dejar actuar el colorante por 10 minutos abrigado de la luz.

Nota:

- Tener máxima precaución con la manipulación del NA, debido a su gran poder mutagénico, recomendamos usar guantes de vinilo.
- Para la inactivación del colorante, así como la limpieza de los materiales y de los portaobjetos, se puede usar alcohol etílico al 80%
- El fluorocromo naranja de acridina se une al ácido nucleico ya sea en su forma nativa o desnaturalizada.

Mucositis bucal en trabajadores rurales de Misiones, Argentina, expuestos a agroquímicos: reporte de 3 casos

Oral mucositis in rural workers from Misiones, Argentina, exposed to agrochemicals: report of three cases

Resumen

Se reportan tres casos de mucositis bucal luego de la exposición ocupacional a agrotóxicos en individuos provenientes de zonas rurales de Misiones, Argentina, los que presentaron inflamación inespecífica y atrofia luego de aplicar pesticidas con difusores.

PALABRAS CLAVE: mucositis bucal, agrotóxicos, pesticidas, Misiones.

Summary

Three cases of oral mucositis in subjects with occupational exposure to agrochemicals in Misiones, Argentina, rural areas are reported. They showed unspecific inflammation and atrophy after pesticide spraying.

KEYS WORDS: oral mucositis, agrototoxic spraying, pesticides, Misiones.

PADULA,
DIEGO HERNÁN*
MARTÍN,
MARÍA CRISTINA**

*Titular de la Cátedra de Patología Bucal. Universidad Católica Nuestra Sra. de Asunción. Sede Regional Itapúa. Paraguay.

**Titular Universidad Nacional de Misiones. Jefa Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Pediatría de Posadas, Misiones, Argentina.

Introducción

Se define mucositis tóxica a la inflamación de la mucosas producida por químicos tóxicos para el organismo, pudiendo también utilizarse el término de estomatitis por agrotóxicos.¹ La mucositis es producida por los agentes o noxas químicas que actúan por vía interna y/o contacto, éstas ingresan principalmente a través de la inhalación: entre estos agentes se destacan el mercurio, el bismuto, la plata, el fósforo y la dilantina,² y los agrotóxicos, sea por sus productos activos (organofosforados, glifosatos, piretroides, etc), o por sus vehículos.

La OMS define como agrotóxicos a las sustancias destinadas a prevenir o controlar toda especie de plantas o animales indeseables abarcando también a sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, como defoliantes y desecantes.³

Las sustancias químicas inducen generalmente lesión celular por los siguientes mecanismos: por la combinación de las sustancias hidrosolubles con alguno de los componentes moleculares críticos u orgánulos celulares; a través de las toxinas liposolubles que podrían convertirse en metabolitos tóxicos reactivos provocando lesiones sobre las membranas celulares y lesión celular por enlace covalente directo² y por inhibición de la replicación de ADN, por ende, de la proliferación de las células de la mucosa en su estrato basal con la consecuente aparición de atrofia epitelial, precipitación del colágeno y eventualmente ulceración.³⁻⁵ Estas

alteraciones se manifiestan principalmente en el epitelio bucal, que junto al epitelio gastrointestinal bajo son los de mayor recambio celular y, por ende, el de mayor susceptibilidad a la citotoxicidad.

Concomitantemente los glifosatos pueden producir disminución de la actividad del sistema inmunológico por interferir en la producción de citoquinas de las células mononucleares;⁶ de esta manera el cuadro inflamatorio aumenta dado que al aumento de la penetración de microorganismos por la disminución del espesor del epitelio se suma una mayor actividad microbiana favorecida por una disminución de la eficiencia de las células mononucleares.

Los pacientes observados presentaron como lesiones elementales manchas rojas difusas por eritema, atrofia, erosión y ulceración con sintomatología subjetiva de ardor, xerostomía y alteración del gusto, los síntomas se iniciaron entre 24 y 48 horas después de haber aplicado agrotóxicos en sus chacras con difusores generalmente sin elementos de protección, como máscaras, anteojos, etc. y se extendió por 15 a 30 días si el paciente dejó de exponerse a los agrotóxicos. Al continuar la exposición la lesión que permaneció principalmente fue la atrofia, que a su vez fue la última en desaparecer.

Caso clínico

Se presentan como casos clínicos tres pacientes.

Fecha de recepción:
Febrero 2011

Fecha de aceptación y versión final:
Marzo 2011

Caso 1

Paciente de sexo femenino de 58 años de edad, que relata haber utilizado 5 días atrás piretroides aplicados con un pulverizador, presentando eritema y atrofia, grado I según la clasificación de mucositis de la OMS, en dorso y cara ventral de lengua de 24 horas de evolución (Figs. 1 y 2); en paladar duro erosión (Grado II OMS) irregular bien delimitada (Fig. 3); con sintomatología subjetiva de ardor en las zonas eritematosas y dolor en las pérdidas de sustancia con alteración del gusto, las lesiones involucionaron espontáneamente en tres semanas una vez que la paciente dejó de utilizar el producto mencionado.

Caso 2

Paciente de sexo masculino de 46 años de edad, que relata haber utilizado glifosato aplicado con difusor sin elementos de protección 7 días atrás, presentando eritema (Grado I OMS) en mucosa yugal (Fig. 4) y velo de paladar (Fig. 5), con sintomatología subjetiva de ardor y alteración del gusto; relata el paciente que cada vez que utiliza el producto la sintomatología aparece días después e involuciona espontáneamente cuando deja de utilizarlo.

Caso 3

Paciente de 38 años relata haber utilizado glifosatos con difusor en su chacra sin protección 2 semanas atrás por aproximadamente 8 horas, sintiendo inicialmente mareos con malestar general y luego de 48 horas ardor en cavidad bucal principalmente en dorso de lengua con alteración del gusto, al día de la consulta la sintomatología subjetiva ha desaparecido observándose en dorso de lengua línea media tercio medio, lugar donde relataba ardor, atrofia de bordes irregulares bien delimitada (Fig. 6).

Discusión

No se refieren en la bibliografía internacional casos de mucositis tóxica luego de la exposición a agroquímicos. Este tipo de lesiones se describen en pacientes con tratamiento oncológico con radioterapia o quimioterapia, siendo el mecanismo fisiopatológico de la aparición de las lesiones, la inhibición de la replicación celular⁷ por daño directo al ADN, evidenciado principalmente en las mucosas según describimos antes. La OMS clasifica las lesiones observadas en los pacientes después del tratamiento oncológico y son las que utilizamos en este reporte, no habiendo otras.

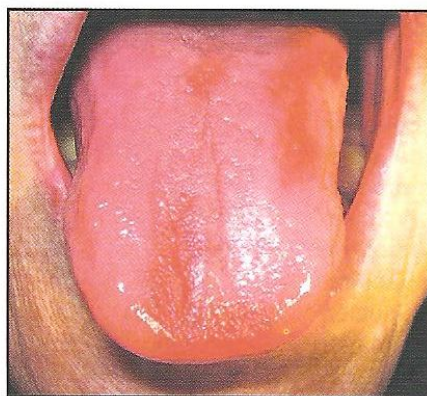


Fig. 1. Mancha roja por eritema y atrofia en cara dorsal de lengua.

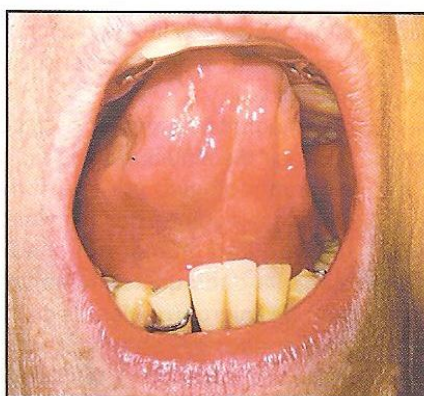


Fig. 2. Eritema y atrofia en cara ventral de lengua.

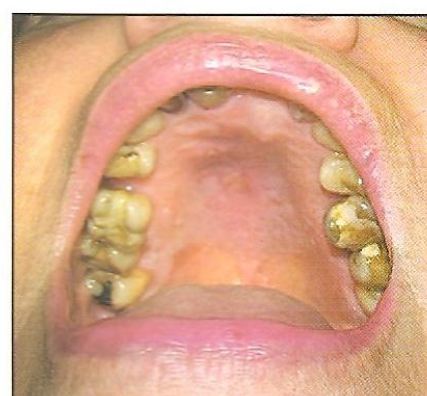


Fig. 3. Erosión y ulceración en paladar duro.



Fig. 4. Eritema difuso y tenue en mucosa yugal en paciente expuesto a glifosatos 7 días atrás.

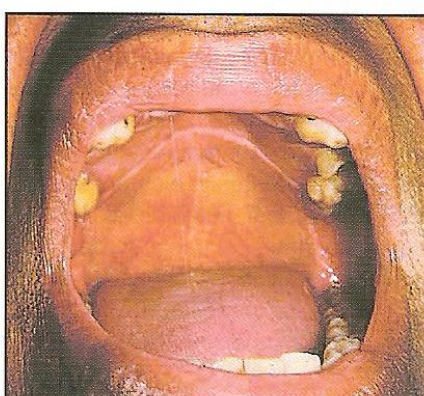


Fig. 5. Eritema difuso en velo de paladar en el mismo paciente expuesto a glifosatos 7 días atrás.

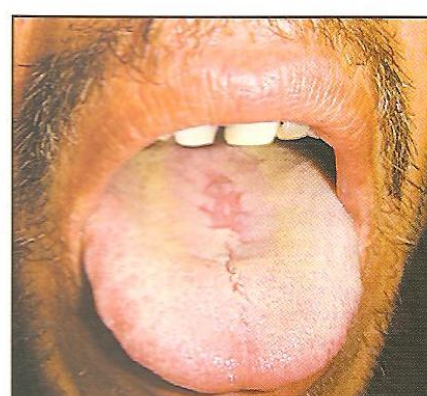


Fig. 6. Atrofia en dorso de lengua.

Sería relevante continuar el estudio con un diseño epidemiológico que intente relacionar la mucositis tóxica con la exposición previa a agrotóxicos en las zonas rurales considerando todas las variables, como tipo de sustancia, tiempo de exposición, duración de la exposición, genotipo de susceptibilidad individual, entre otras importantes.

Bibliografía

1. Puyalt Casado M, Jiménez Martínez C, Chimenos Küstner E, López López J, Juliá A. **A protocol for the evaluation and treatment of oral mucositis in patients with hematological malignancies.** *Med Oral* 2003;8:10-8.
2. Cotran RS, Kumar V, Robbins L. **Patología Estructural y Funcional.** 5ta Ed. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana 1996; p.14-5.
3. Guggenheimer J, Verbin RS, Appel BN, Schmutz J. **Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997;44:58-63.
4. Lockhart PB, Sonis ST. **Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histologic study.** *J Dermatol Surg Oncol* 1981;7:1019-25.

5. Squier CA. **Mucosal Alteration.** *NCI Monograph* 1990; 9:169-72.
6. Pico JL; Avila Garavito A, Naccache P. **Mucositis: Its occurrence, consequences and treatment in the oncology setting.** *The Oncologist* 1998;3:446-51.
7. Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López S, Carrasco A. **Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling.** *Chem Res Toxicol* 2010 Aug 9.
8. Baranger D, Castiglioni G, González C, et al. **Tabaco y agrotóxicos. Un estudio sobre productores de Misiones.** 1era Ed, Posadas Arg, EDUMAN, 2007. Apéndice A. p. 214.
9. Nakashima K, Yoshimura T, Mori H, Kawaguchi M, Adachi S, Nakao T. **Effects of pesticides on cytokines production by human peripheral blood mononuclear cells fenitrothion and glyphosate.** *Chudoku Kenkyu* 2002;15: 159-65.

Dirección del autor

Alvear 2299
 (3300) Posadas, Misiones, Argentina
 e-mail: diegohpadula@yahoo.com.ar



OFICINA CENTRAL
 Junín 969 2º "A" Cap. Fed.
 Tel-fax: 4961-9260
 orthodont_arg@hotmail.com

SUCURSAL
 Montevideo 955 9º "A" Cap. Fed.
 Tel-fax: 4816-2436 . Tel.: 5279-9940
 orthodont@hotmail.com.ar



Los mejores productos de Ortodoncia y el mejor servicio



Marcelo Liberati Sistemas
 Programas de Gestión para consultorios y clínicas odontológicas.
 Programa de Auditoría Odontológica a medida.

Más de 4000 usuarios y 25 años de trayectoria nos avalan en el mercado nacional e internacional.

Descargue su versión demo de nuestro sitio
www.marceloliberati.com.ar

Melián 3258 11º "B" (1430) Capital Federal - Tel & Fax: (54-11) 4544-8239 4541-1345

FICHA EPIDEMIOLOGICA MUCOSITIS TÓXICA

APELLIDO Y NOMBRE

DNI:

LOCALIDAD

Nº MUESTRA

LUGAR DE NAC.

FECHA NAC

DOMICILIO

ANTECEDENTES FAMILIARES

	SI	NO	TIPO	PARENTESCO
CANCER				
MALFORMACIONES				

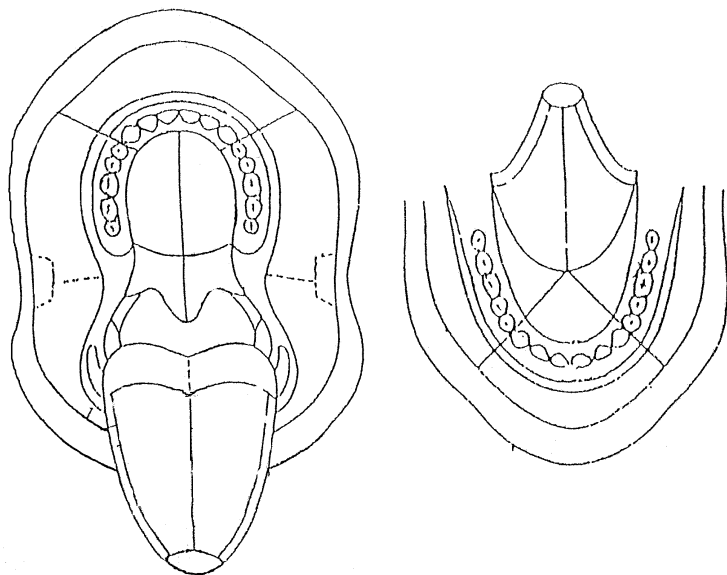
FACTORES DE RIESGO

	SI	NO	CANTIDAD DIARIA/ FRECUENCIA	CUAL?	POR CUANTO TIEMPO
FUMA					
ALCOHOL					
FARMACOS					

EXPOSICION

QUE PRODUCTO	ULTIMA APLICACION	CUANTO TIEMPO

DIAGNOSTICO CLINICO



OBSERVACIONES:

ESCALA DE TOXICIDAD SEGÚN WHO MUCOSITIS CRONICA

GRADO	SINTOMAS
0	Sin síntomas
1	atrofia ligera y sequedad del tejido
2	atrofia moderada y telangiectasia
3	atrofia marcada con sequedad total del tejido y telangiectasia severa
4	ulceración

ESCALA DE TOXICIDAD SEGÚN WHO MUCOSITIS AGUDA

GRADO	SINTOMAS
0	Sin síntomas
1	dolor moderado sin necesidad de analgesia
2	inflamación y exudado con dolor que puede requerir analgesia
3	se asocia con fibrinólisis y requiere el uso de narcóticos para paliar el dolor
4	presenta ulceración, hemorragia y/o necrosis del tejido)