

**CONSECUENCIAS SOBRE LA SALUD
DE MUJERES EN EDAD FÉRTIL TRAS
LA EXPOSICIÓN LABORAL A
PLAGUICIDAS**



Universidad de Sevilla

BOUCHRA DAHIRI KHATTABI | Facultad de Farmacia



Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Farmacia



Grado	Grado en Farmacia
Título	Consecuencias sobre la salud de mujeres en edad fértil tras la exposición laboral a plaguicidas
Nombre	Bouchra Dahiri Khattabi
Fecha	Julio de 2018
Departamento	Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal
Nombre del tutor	Isabel María Moreno Navarro
Tipología del proyecto	Experimental

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, Dña. Isabel Moreno Navarro, la dedicación y el trabajo, por dejarme formar parte de este proyecto y ayudarme a descubrir la Toxicología. Por confiar en mí desde el principio, hace ya casi dos años, cuando empecé como alumna interna y apoyarme para continuar con mi formación.

Al profesor D. Juan Bautista, por permitirme trabajar en su laboratorio de forma desinteresada. A mis compañeros en este proyecto, José Martín-Reina y María Elena Velasco por las horas pasadas juntos y su apoyo continuo. Al personal del Servicio de Laboratorios del Hospital de Osuna y del Centro de Salud de Marinaleda, en especial a D. Isaías Fernández. A la Profesora Dña. Ana Fernández por trasladarme los conocimientos en estadística necesarios para la interpretación de los resultados obtenidos. Al personal del Servicio de Radiosítopos y de Espectrometría de Masas del CITIUS.

A las mujeres que han participado en el proyecto, sin ellas esto no hubiera sido posible.

A todas las personas que comenzaron y han estado hasta el final de esta etapa conmigo.

Por último, quiero agradecer a mi madre por animarme todos los días a cumplir mis sueños, a mi padre y a mis hermanos, por el apoyo y por ayudarme a llegar hasta este momento. A Esther, por escucharme y apoyarme como una hermana más siempre. Y gracias a mi hermana, Ilhem, por confiar en mí desde el primer segundo, recorrer junto a mí este camino y sobre todo, no dejarme desistir nunca.

Índice	
Agradecimientos	3
Resumen	5
Palabras clave	5
Introducción	6
1. Concepto de plaguicida	6
2. Clasificación de plaguicidas	6
3. Consumo de plaguicidas	7
4. Reglamentación actual	8
5. Exposición a plaguicidas	10
6. Mecanismos de acción y efectos tóxicos de los principales plaguicidas	11
7. Efectos tóxicos de los plaguicidas en población femenina	15
Objetivos	16
Metodología	17
1. Selección de la población de estudio	17
2. Bioquímica sérica	19
3. Actividad enzimática de las colinesterasas eritrocitaria y plasmática	19
4. Peroxidación lipídica (LPO)	20
5. Grado de exposición a los metales seleccionados en sangre	20
Resultados y discusión	22
1. Encuestas epidemiológicas	22
2. Bioquímica sérica	25
3. Actividad enzimáticas de las colinesterasas eritrocitaria y plasmática	28
4. Peroxidación lipídica (LPO)	29
5. Grado de exposición a los metales seleccionados en sangre	30
Conclusiones	31
Bibliografía	32

Resumen

Los plaguicidas son sustancias que previenen, destruyen o controlan plagas. A estos compuestos están expuestos muchos trabajadores del sector agrícola, principalmente aquellos encargados de aplicarlos. El objetivo principal de este estudio fue determinar el grado de exposición a plaguicidas y metales en una muestra poblacional de mujeres trabajadoras en la recolección de frutas y verduras frente a trabajadoras de una fábrica de elaboración de conservas. Se han llevado a cabo estudios a distintos tiempos de exposición, identificando posibles factores asociados a dicha exposición y las posibles consecuencias sobre su salud. Para ello, y tras firma del consentimiento informado, se les recogió información mediante encuestas epidemiológicas para realizar una valoración del estado general de salud. Además se tomaron muestras de sangre destinadas al estudio de la bioquímica sérica, estudio de los niveles de peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo, análisis de la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria y la colinesterasa plasmática como marcadores de exposición a organofosforados y análisis de niveles de metales en sangre. Se observó una diferencia significativa en los niveles de peroxidación lipídica en suero entre las mujeres trabajadoras del campo y las de la fábrica, en los dos períodos de muestreo. Sin embargo, la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria no presentó diferencias significativas entre ambos grupos de mujeres. Finalmente, de los metales estudiados sólo se detectaron Al, Mn, Cu, Zn y Pb. Estos resultados forman parte de un estudio a largo plazo, por lo que las conclusiones serán preliminares hasta la finalización del estudio. De momento se confirma la relación entre la exposición laboral a plaguicidas y la alteración de algunos parámetros como son la peroxidación lipídica o valores de glucosa, urea o creatinina.

Palabras clave: plaguicidas, lipoperoxidación, metales, acetilcolinesterasa, mujeres

Introducción

1. Concepto de plaguicida

El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2002) define los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte”.

2. Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas se pueden clasificar de diferentes maneras atendiendo a diferentes características. Normalmente, los plaguicidas se clasifican según el tipo de plaga al que estén destinados, siendo los más importantes de esta clasificación los fungicidas, herbicidas, rodenticidas e insecticidas (Martin-Reina et al., 2017). Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza una clasificación atendiendo a la capacidad de producir daño tras una exposición aguda a uno de ellos, que también podríamos definir como el daño en la salud de una persona tras una o varias exposiciones en 24 horas. Esta clasificación se realiza basándose siempre en el concepto de dosis letal media (DL50), siendo ésta la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica por peso corporal (mg/kg), necesaria para matar al 50% de animales de experimentación (usualmente ratas de laboratorio) en los que se ensaya el efecto letal

(tabla 1), o concentración letal media (CL50) usada cuando la exposición es a través del agua y el aire (Ramírez y Lacasaña, 2001; Pineda, 2007; Del Puerto et al., 2014). Ambos valores dependen de conceptos como el estado en el que se encuentre el plaguicida, la vía por la que entre en el organismo y otros conceptos endógenos del afectado como son el sexo, la edad, la dieta... (López, 1993).

Clase	Toxicidad	Ejemplo
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión
Clase IB	Altamente peligrosos	Carbofurano
Clase II	Moderadamente peligrosos	Paraquat
Clase III	Ligeramente peligrosos	Glifosato

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según la OMS, basada en la DL50

Otra clasificación que se realiza de los plaguicidas es según su estructura química, dando lugar a diversas familias como pueden ser los organoclorados o los organofosforados, siendo estos algunos de los más conocidos por ser los más utilizados a lo largo de la historia, aunque cada vez están más en desuso por sus propiedades tóxicas.

También se pueden hacer otras clasificaciones de los plaguicidas atendiendo a otras características como puede ser su vida media de efectividad, clasificándose así en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Briggs, 1992).

3. Consumo de plaguicidas

España es el país europeo que más plaguicidas consume en la agricultura en términos absolutos: 77.216 toneladas en 2015; por delante de Francia, Italia y Alemania, con 67 mil, 63 mil y 48 mil toneladas, respectivamente. El Real Decreto 1311/2012 regula la utilización de plaguicidas para reducir su uso, sin embargo, el consumo en España ha aumentado: en 2012, año de la norma, se vendieron 63.490 toneladas, un 20% menos que en 2015. Los herbicidas son los plaguicidas más ampliamente utilizados, representando más del 60% de todos los plaguicidas usados en agricultura (Vidal-Dorsch, 2012).

Con respecto a Andalucía, junto con ambas Castillas, es la comunidad que más terreno de cultivo tiene, con 3.543.456 hectáreas. El consumo de plaguicidas en nuestra región supone un 33% del total del territorio nacional y, al igual que en el resto de España, los herbicidas son los más usados con una media de 6.980 toneladas en 2012 según el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2013).

4. Reglamentación actual

En la actualidad, el reglamento europeo por el que se regula la normativa de existencia y uso de plaguicidas es la Nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de mayo del 2012 relativo a la comercialización y el uso de plaguicidas. Esta norma establece que los plaguicidas son necesarios para controlar organismos que puedan ser dañinos para animales, humanos y recursos naturales. También expone que estos plaguicidas suponen un riesgo para humanos, animales y medio ambiente debido a sus propiedades y el uso que se hace de ellos. Como es evidente, todos ellos deben ser usados según la normativa y asegurando un alto nivel de protección para la salud de humanos, animales y medio ambiente.

En España, el uso de plaguicidas y la exposición y los riesgos que estos suponen está controlado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, actual Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, que es el encargado de publicar las distintas normativas relacionadas con estos. La reglamentación española además de acogerse a la autorización según la normativa europea, también incluye un registro de plaguicidas según un Registro Nacional (Real Decreto 3349/83) y un listado de productos insecticidas y repelentes comercializados para enfermedades como son el Dengue, Chikunguya y Zika.

Existe también un listado de sustancias activas que siguen autorizaciones excepcionales por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), que cada año se autorizan durante un periodo no superior a 120 días, para algunos cultivos en concreto en determinadas comunidades autónomas. Por ejemplo, en Andalucía en el presente año se ha autorizado de forma excepcional el uso de

plaguicidas a base de benzoato de propanil al 48% para el control de las malas hierbas en los cultivos de arroz (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Social, 2018).

Cabe destacar el concepto de límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas, que se define como la concentración máxima de residuos de un plaguicida (mg/kg) que se permite legalmente sobre la superficie o la parte interna de los alimentos destinados al consumo humano y de piensos. La finalidad de establecer este criterio es conseguir que los alimentos derivados de los productos básicos sean toxicológicamente aceptables y se fijan según las buenas prácticas agrícolas (Comisión del Codex Alimentarius, 1997). Existen normas comunitarias para definir los LMR, siendo la norma europea el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y cuya finalidad principal es fijar estos límites para facilitar el mercado interior entre los países miembros de la Comunidad, así como proteger al consumidor y controlar el uso de los plaguicidas (Comunidad Europea, 2015).

Los plaguicidas pueden causar efectos tóxicos en el hombre, no sólo a través de la dieta. Aquellos trabajadores expuestos en su ambiente laboral a estas sustancias son una población a proteger. Así, existe una abundante legislación relativa a la protección del trabajador que manipula los plaguicidas (transporte, almacenamiento y aplicación), sin embargo, no se protege a aquellos trabajadores encargados de la recolección de verduras y frutas.

En España, el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo o Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo (INSSBT), el órgano científico-técnico especializado en la seguridad y la salud laboral, se encarga de la publicación de documentos denominados notas técnicas de prevención (NTP), en las que se especifican los peligros de los plaguicidas y los elementos necesarios para una protección tanto grupal como personal de los trabajadores. Algunos ejemplos son:

- NTP-1033. Productos fitosanitarios: prevención de riesgos durante su uso en la que se recogen distintos aspectos relacionados con la legislación del uso de plaguicidas con el fin de mejorar su uso.

- NTP-660. Control biológico de trabajadores expuestos a plaguicidas (I): aspectos generales y NTP-661. Control biológico de trabajadores expuestos a plaguicidas (II): técnicas específicas. Dos notas que hablan sobre el control biológico específico de los trabajadores que se encuentran expuestos a plaguicidas y las consecuencias y peligros que esta supone. Además, en la segunda se habla de las técnicas concretas dependiendo del tipo de plaguicida.

5. Exposición a plaguicidas

Las vías de entrada más frecuente para los plaguicidas son la cutánea, la respiratoria y la digestiva.

La peligrosidad que supone el uso y la exposición a plaguicidas se encuentra más centrado en los trabajadores encargados de su aplicación, pero podemos considerar una exposición laboral a plaguicidas a las actividades como la fabricación y formulación del plaguicida, su transporte y almacenamiento, su venta o su aplicación, ya sea a pie o a máquina en el campo y la aplicación aérea o en espacios cerrados (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, 2018). También consideramos exposición laboral a la que sufren los trabajadores de las zonas tratadas, es decir, aquellos trabajadores que se encuentran expuestos a diario a ellos, tanto en la recolección como en la manipulación posterior de los cultivos.

El riesgo al que se enfrentan los trabajadores viene definido, además de por el tipo de exposición, por las características de la exposición sufrida. Las características de la exposición pueden ser el tipo de producto, la forma en la que se presenta el mismo, el modo en el que se usa el plaguicida, los hábitos del aplicador como son las medidas de contención o protección usadas y las actividades posteriores al tratamiento (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, 2018).

6. Mecanismos de acción y efectos tóxicos de los principales plaguicidas

➤ Organofosforados

Los organofosforados son los insecticidas más usados en el mundo. Se trata de compuestos liposolubles y volátiles, resultando en una toxicidad variable debido a que estas características facilitan su absorción. Sus efectos varían dependiendo del grado de toxicidad y de la vía de entrada al organismo (Fernández et al., 2010).

El principal efecto tóxico de los organofosforados se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una enzima encargada de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina (ACh). La ACh es un importante neurotransmisor del Sistema Nervioso Central y Periférico, y su función es la transmisión del impulso nervioso. La consecuencia de la inhibición de la enzima resulta en una acumulación del neurotransmisor en el espacio sináptico, dando lugar a efectos neurotóxicos debido a la hiperexcitabilidad de tejidos, provocando síntomas como convulsiones, parálisis severa, hipersecreción glandular y fallo respiratorio, un conjunto de signos y síntomas denominado síndrome colinérgico, pudiendo derivar en coma y muerte, (Martín-Reina et al., 2017).

Diferentes autores han encontrado evidencias de la existencia de intoxicaciones tanto agudas como crónicas en la exposición laboral a estos plaguicidas. Las intoxicaciones agudas pueden derivar en síntomas que varían de leve a muy grave y pueden ser dolores de cabeza, náuseas, vómitos, bradicardia, miosis, dermatitis o quemaduras. Los problemas neurotóxicos están más relacionados con la exposición crónica, resultando en problemas cognitivos, motores, sensoriales (Roldán-Tapia et al., 2005; Joshaghani et al., 2007) y enfermedades neurodegenerativas como pueden ser el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Sánchez-Santed et al., 2016).

Kemp et al., (2008) definen el estrés oxidativo como “una diferencia entre la producción de agentes prooxidantes y agentes antioxidantes con la desorganización del circuito redox y daños macromoleculares”. Además de la inhibición de la AChE, los organofosforados tienen la capacidad de producir estos daños oxidativos debido a la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS).

El cerebro es particularmente susceptible al daño oxidativo debido a su alto

contenido en lípidos, alta demanda de energía y menos defensas antioxidantes en relación a otros órganos (Pearson y Patel, 2017).

Los organofosforados también afectan a receptores hormonales, actuando como ligando y dando lugar como consecuencia a una actividad como disruptor endocrino, produciendo alteraciones hormonales (Combarnous, 2017).

➤ **Carbamatos**

De la misma forma que los organofosforados, los carbamatos son insecticidas que inhiben la AChE. A diferencia de los organofosforados, la exposición a carbamatos da lugar a una toxicidad más corta ya que se metabolizan rápidamente (Silberman y Taylor, 2018).

La exposición puede dar lugar a una toxicidad tanto aguda como crónica, siendo la piel, los pulmones o la conjuntiva, algunas de las vías de entrada. Los síntomas, muy similares a los de una intoxicación por organofosforados, son hipersalivación, lagrimeo o problemas gastrointestinales (Silberman y Taylor, 2018).

➤ **Piretroides**

Los piretroides son relativamente menos tóxicos para los mamíferos que los organofosforados, por ello y por ser de amplio espectro, son de los plaguicidas más usados en la mayoría de los países como alternativa al uso de organofosforados (Lei et al., 2017).

Podemos diferenciar los piretroides tipo I, aquellos que tienen una estructura básica de éster carboxílico como ciclopropano y los tipo II, que además de la estructura básica poseen un grupo ciano (Bradberry et al., 2005).

Los piretroides incluyen efectos tóxicos como neurotoxicidad, toxicidad respiratoria o efectos tóxicos en la piel y en el sistema reproductor (Lei et al., 2017).

El mecanismo de acción principal de los piretroides se ejerce sobre los canales de cloro y sodio, resultando en una excitación de las células tanto nerviosas como musculares. Los piretroides disminuyen la activación de los canales de calcio voltajes dependientes (VGSC), disminuyendo la corriente producida. Dependiendo del tipo de piretroide, se produce un efecto u otro. Los piretroides tipo I dan lugar a un hiperexcitabilidad por una prolongación de la apertura del canal y en el caso de los tipo II, esta prolongación de apertura, que es mayor, resulta en una despolarización de la membrana y en un bloqueo de la conducción (Martín-Reina et al., 2017).

Los piretroides tipo II también tienen efecto sobre los canales de cloro. A concentraciones relativamente altas, los piretroides pueden afectar también a los receptores del GABA dando lugar a convulsiones (Bradberry et al., 2005).

Diferentes estudios muestran también que juegan un papel como disruptores endocrinos, teniendo un efecto sobre receptores tanto estrogénicos como androgénicos *in vitro*, que podría derivar en una alteración de la salud reproductiva de hombres adultos (Saillenfait et al., 2016).

➤ **Glifosato**

El glifosato es probablemente el herbicida más usado hoy en día en el mundo. Cuando se comenzó a usar en 1974, el glifosato era considerado de bajo peligro para mamíferos, sin embargo, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer o *International Agency for Research on Cancer* (IARC) lo considera desde 2015 un producto probablemente carcinogénico (Tarazona et al., 2017). A pesar de esto, tanto la Agencia Europea para las Sustancias Químicas, *European Chemicals Agency* (ECHA), como la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria o *European Food Safety Authority* (EFSA), han descartado que provoque cáncer en los humanos, por lo que la Unión Europea ha renovado la licencia del glifosato hasta el 2022 (Comisión Europea, 2017).

El glifosato actúa inhibiendo la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos solo presente en las plantas, algas, bacterias y hongos. Concretamente, el glifosato actúa sobre la sexta enzima de la ruta del shikimato, la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatotransferasa (EPSPS), inhibiéndola y reduciendo la síntesis de estos compuestos aromáticos.

La función del glifosato se basa en que esta ruta no está en los mamíferos, por lo que supone un buen objetivo para el desarrollo de sustancias antimicrobianas, antifúngicas y antiparasitarias (Greim et al., 2015).

En cuanto a su toxicidad en humanos, muchos estudios demuestran que el glifosato es tóxico para las células humanas placentarias. También está comprobado que puede actuar sobre la actividad de la aromatasas, actuando como disruptor endocrino (Salazar y Aldana, 2011). Además, se ha demostrado que el glifosato presenta genotoxicidad por provocar daños en la estructura del ADN y que puede producir toxicidad *in vivo* en células humanas (Monroy et al., 2005).

➤ **Elementos inorgánicos empleados como plaguicidas**

Los compuestos inorgánicos forman parte de diferentes sustancias que son usadas como fertilizantes o plaguicidas, estos compuestos inorgánicos como son los metales pesados pueden inducir algún tipo de daño en el organismo (El-Kady y Abdel-Wahhab, 2018).

Existen un gran número de metales pesados y metaloides que suponen peligro para la salud, entre los cuales se encuentran el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el manganeso (Mn) o el zinc (Zn). La exposición a estos metales viene dado por fuentes como la actividad agrícola, destacando que algunos fertilizantes contienen en su formulación hierro (Fe), Cd o cobre (Cu) y el Mn, que se emplea como regulador del pH para mejorar la fijación de otros plaguicidas y además, algunos plaguicidas que incluyen mercurio orgánico (Hg) o azufre (S) en su composición (tabla 2) (Florea y Büsselberg, 2006).

Plaguicida	Uso
Bromoxinil 20%	Herbicida
MCPA (ácido 4-cloro-2-toliloxiacético)	Herbicida
Dimetilditiocarbamato de zinc	Fungicida
Oxicloruro de cobre	Fungicida
Hidróxido cúprico	Fungicida
Acetato fenilmercúrico	Fungicida
pH NON SPUM (Mn 3%)	Regulador de pH

Tabla 2. Plaguicidas que contienen metales en su composición

Los metales pesados presentan la característica de permanecer en el cuerpo durante largos periodos de tiempo, induciendo efectos tóxicos tanto mutagénicos, como carcinogénicos y teratogénicos (Florea y Büsselberg, 2006).

7. Efectos tóxicos de los plaguicidas en población femenina

Cabe destacar, la relación observada entre la exposición a plaguicidas y efectos adversos en la fertilidad y la reproducción de mujeres jóvenes, así como la aparición de una menopausia temprana o abortos espontáneos (Mendola et al., 2008).

Además, numerosos estudios confirman también relaciones derivadas de la exposición a plaguicidas y la incidencia de cáncer de mama en aquellas personas en zonas rurales, todo esto explicado con el mecanismo que tienen las hormonas como el estrógeno, que son mimetizadas por plaguicidas y juegan un papel importante en la inducción de este tipo de cáncer (Santamaría-Ulloa, 2009).

Mayhoub et al. (2014) también encontraron relaciones entre la exposición ocupacional de mujeres a plaguicidas durante el embarazo y diferentes factores como nacimientos prematuros o niños nacidos con bajo peso.

Objetivos

El objetivo principal de este proyecto era determinar el grado de exposición a plaguicidas y metales en una muestra poblacional de mujeres rurales en edad fértil, comparando las trabajadoras del campo (recolección de frutas y verduras) frente a las trabajadoras de una fábrica de conservas (procesado posterior de frutas y verduras).

Para ello se ha hecho un seguimiento trimestral, identificando posibles factores asociados a dicha exposición y las posibles consecuencias sobre su salud.

Los objetivos secundarios a llevar a cabo fueron:

1. Selección y realización de una encuesta epidemiológica en la población de estudio.

2. Hacer estudio de bioquímica sérica, marcadores de función hepática (GPT/ALT y GOT/AST), marcadores de función renal (urea y creatinina), y hormonas tiroideas: hormona estimulante del tiroides (TSH) y tiroxina libre (T4L) y hormonas gonadotrópicas: folículo estimulante (FSH) y leutinizante (LH).

4. Estudiar la actividad enzimática de las colinesterasas plasmática y eritrocitaria.

3. Estudiar los niveles de peróxidos lipídicos en sangre como indicativo del estado oxidativo.

5. Cuantificar en muestras de sangre el grado de exposición a los metales seleccionados (Na, P, Mn, Cu, Zn, Al, Pb), mediante Espectrometría de Masas con Plasma acoplado Inductivamente (ICP-MS) previa digestión de la muestra.

Metodología

1. Selección de la población de estudio

Marinaleda es un pueblo situado en la provincia de Sevilla, en la cuenca del Genil en la comarca de Sierra Sur. Tiene una extensión de 24,8 km² y una población total de 2665 habitantes. De la población total, un 65'2% se encuentran en edades comprendidas entre los 20 y los 65 años, de los cuales 1299 son mujeres, representando un 49% de la población.

La elección del pueblo se basa en su organización política y social, que la hacen única e idónea para la consecución de los objetivos de esta memoria. Algunas de sus características principales son:

- Se trata de un municipio eminentemente agrícola, cuya economía se basa en la producción agropecuaria.
 - o El sector primario se basa en el trabajo en la finca “El Humoso”.
 - o El sector secundario está basado en la elaboración de productos agrícolas en la cooperativa “Marinaleda SCA”.
- Toda la población tiene un puesto de trabajo.
- Existe igualdad de salario para todos, sin importar el puesto que ocupe.

La cooperativa “Marinaleda SCA” supone uno de los ejes centrales de actividad en el pueblo. Se trata de una cooperativa existente desde finales de los años 70, controlada por los propios trabajadores.

La finca o cortijo “el Humoso” tiene una extensión de 1200 hectáreas, situado en la comarca de Sierra Sur a 11'5 km de Marinaleda donde se desarrolla la agricultura.

Según datos de 2015, la agricultura supone una de las principales actividades económicas. Hay tanto cultivos herbáceos, que suponen una superficie de 812 hectáreas, como cultivos leñosos, que tiene una superficie de 1207 hectáreas. En el caso de los cultivos leñosos, el principal es la aceituna. También hay cultivos herbáceos como el pimiento o la alcachofa.

En este estudio, concretamente, contamos con la participación de una muestra de mujeres de esta población, comprendidas en un rango de edad entre 18 y 45 años, que trabajan en la recolección de futas y verduras en la finca “El Humoso” y en la cooperativa “Marinaleda SCA”.

Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron: mujeres cuya edad esté comprendida entre 18 y 45 años; residentes en Marinaleda durante al menos los últimos 10 años, y que hayan firmado el informe de consentimiento y completado el cuestionario epidemiológico. Se excluyeron del estudio aquellas mujeres con hepatopatías o en tratamiento con anticoagulantes orales, ya que pueden interactuar con los plaguicidas. Además de aquellas que usen anticonceptivos hormonales y las que no tengan un ciclo menstrual regular. El objetivo de limitar la edad es centrarnos en el periodo fértil de estas trabajadoras expuestas de forma crónica a cantidades traza de plaguicidas.

Las participantes (n=40) se dividieron en dos grupos, aquellas que durante el estudio trabajan en la cooperativa (n=20) y las que trabajan en la finca (n=20), encargadas de la recolección. Durante los seis meses en los que se desarrolla el estudio, dividido en dos tomas de muestras, una inicial y otra tres meses después, algunas de ellas pasan de trabajar en la Finca a hacerlo en la cooperativa o al revés.

Inicialmente, se realizó una entrevista con las mujeres en la que se les informa sobre los objetivos del proyecto y se procede a la firma del consentimiento informado. Posteriormente, se realizaron dos extracciones de sangre y toma de muestra de orina. La primera de las extracciones se realizó en octubre del 2017 y la segunda de ellas se realizó en febrero de 2018.

En cada una de las tomas de muestras y en la entrevista inicial se llevaron a cabo encuestas epidemiológicas sobre la salud general de las mujeres. Estas encuestas han sido desarrolladas por el equipo de investigación para este proyecto en concreto, con el asesoramiento de la Dra. Horno, médico del trabajo y colaboradora del mismo.

En la primera de las encuestas se buscaba establecer un conocimiento base sobre cada una de ellas, desde lugar de procedencia y residencia, hasta problemas de salud, pasando por hábitos alimenticios y datos laborales que pudieran tener relevancia en el estudio. Los otros dos cuestionarios, realizados durante la toma de muestras, estaban más enfocados a problemas de salud tanto de carácter reciente como pasados o antecedentes familiares de algún tipo, así como posibles cambios observados entre ambas tomas, que se pudieran relacionar con la exposición a los plaguicidas.

2. Bioquímica sérica

La extracción de sangre se realizó en tubos de extracción por sistema de vacío BD Vacutainer®, con un tubo que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el anticoagulante de elección para las pruebas de hematología, por lo que se destinó uno para el análisis bioquímico general.

Esta prueba fue realizada en el laboratorio del Hospital de Osuna. En ella se analizaron parámetros bioquímicos generales como marcadores de función hepática (GPT/ALT y GOT/AST), marcadores de función renal (urea y creatinina), marcador de daño muscular (creatina quinasa), hormonas tiroideas (TSH y T4L) y hormonas gonadotrópicas (FSH y LH).

3. Actividad enzimática de las colinesterasas eritrocitaria y plasmática

La medición de la acetilcolinesterasa se realiza en muestras de sangre entera con anticoagulante (EDTA), extraídas tal y como se describe en el apartado 2 de esta metodología. La determinación se realizó siguiendo el método de Ellman et al. (1961) adaptado a microplacas por Clemente et al. (2010).

Para la obtención de eritrocitos, lavamos las muestras de sangre entera con una disolución de NaCl al 0.9% por 3 veces, previa centrifugación y rompemos las células con agua fría destilada y por último se resuspende el extracto del lisado de eritrocitos en una disolución de NaCl al 0.9%.

La actividad de la AChE se llevó a cabo utilizando como sustrato acetiltiocolina 9 mM y 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB 0,75 mM) como reactivo colorimétrico. La medición de la actividad enzimática se realizó en lector de microplacas a 410 nm, llevando a cabo una cinética durante 5 minutos haciendo medidas cada 30 segundos. La lectura se realizó en el CITIUS II (SGI Celestino Mutis), en un sistema de placa microtituladora o placa de microtitulación con el software Gen5.

Los resultados obtenidos se expresan en UI (mmol/h).

4. Peroxidación lipídica (LPO)

La extracción de sangre destinada a este estudio se realizó en tubos BD Vacutainer® que contenían un gel coagulante separador, que se destinó a la separación de la sangre con la finalidad de obtener suero. Para ello las muestras se centrifugaron hasta su completa separación, obteniendo una fase de suero y otra de paquete globular y una interfase, en la que se encontraban el gel. De las muestras de suero obtenidas, se hicieron dos alícuota de 2ml, en tubos eppendorf. Todas las muestras fueron conservadas en un congelador a -78°C hasta su utilización.

Para llevar a cabo la determinación de la oxidación lipídica, se sigue el protocolo de Esterbauer y Cheeseman (1990), el cual mide los niveles de malondialdehido (MDA) mediante el método del ácido tiobarbitúrico. Los reactivos utilizados en esta prueba son: ácido acético al 20%, una disolución acuosa 40 µM de TEP (1,1,3,3-tetraetoxi-propano, 97%), SDS (dodecilsulfato sódico) al 8%, butilhidroxitolueno (BHT) al 1% y ácido tiobarbitúrico (ATB), preparado al 0,8% (extemporáneo).

Los resultados obtenidos se expresan en nmol/mg proteínas.

5. Grado de exposición a los metales seleccionados en sangre

La medición de metales en sangre es realizada también en muestras de sangre entera con anticoagulante (EDTA) y el procedimiento llevado a cabo se realiza mediante digestión de la muestra en horno microondas y posterior determinación por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

El método que se usa es el método EPA 200.8 para la determinación de elementos traza.

La mineralización de las muestras se llevó a cabo en dos pasos, predigestión y posterior digestión las muestras. La predigestión se realizó durante un periodo de 24h, para lo que se tomó 1mL de sangre más 8 mL de HNO₃ al 65%. Posteriormente se llevó a cabo la digestión aplicando una segunda dilución con HNO₃ al 65%, resultando en una dilución 1:10.

La medida de los metales se llevó a cabo en el Servicio de Radioisótopos del CITIUS, el equipo usado fue un ICP-MS/MS de triple cuadrupolo/octopolo.

Los resultados obtenidos se expresan en ng/gramos de muestra.

Resultados y discusión

1. Encuestas epidemiológicas

De la encuesta inicial realizada obtuvimos algunos resultados epidemiológicos relevantes en cuanto a las características del grupo de mujeres participantes. Todas ellas nacidas en España, la gran mayoría residentes en Marinaleda (70%) y solo un 30% en Matarredonda (población a 1,6km de Marinaleda), ya que ambas constituyen el municipio de Marinaleda. Todas ellas han sido residentes durante más de 5 años. Uno de los criterios de inclusión que hemos usado en el estudio es la edad, en el rango de los 18 (por corresponderse con la mayoría de edad) a los 45, que hemos considerado la edad límite para la mujer fértil. Un 15% de las mujeres se encuentran entre 18 años y 28, el doble (30%) está entre 28 y 38 años y un 55% tiene de 38 a 45 años.

El hábito tabáquico supone un dato importante a tener en cuenta ya que es fuente de la presencia de algunos metales pesados como son el Cadmio (Cd), Cobre (Cu) o Aluminio (Al). Por ello habría que tenerlo en cuenta en la detección de los metales. Las no fumadoras suponen el 40% del total de las participantes, igual porcentaje que para el caso de las fumadoras, siendo el 20% restante el porcentaje de mujeres exfumadoras (figura 1). La mitad de ellas son no consumidoras de alcohol (50%), mientras que el resto se dividen en consumidoras esporádicas (20%) o habituales los fines de semana (30%) (figura 2).

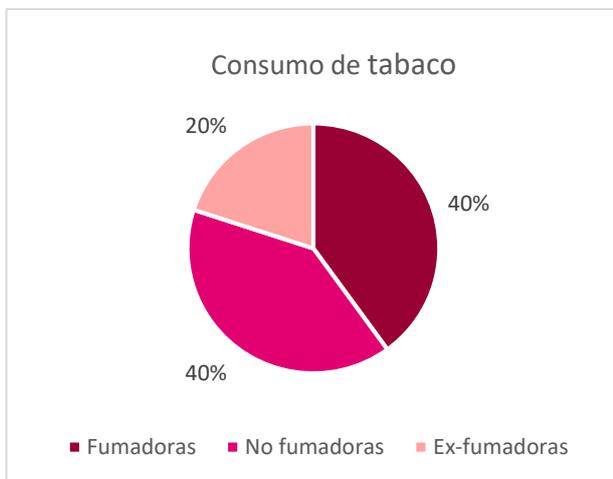


Figura 1. Porcentajes correspondientes al consumo de tabaco.



Figura 2. Porcentajes correspondientes al consumo de alcohol.

Otro dato de especial relevancia es la exposición a plaguicidas en el hogar, donde se concluye que casi el total (90%) de las mujeres hacen uso de insecticidas en spray, suponiendo esta una fuente de exposición a plaguicidas también. Un porcentaje menor, 50%, aseguran hacer empleo de repelentes sobre la piel, además de usar insecticidas. Finalmente, un 30% hace uso tanto de repelentes, como de insecticidas en spray, además de usar insecticidas en líquido o pastillas en enchufe.

En el momento del comienzo del estudio, un 45% de la muestra de mujeres desarrollaba su trabajo en la fábrica (cooperativa "Marinaleda SCA"), y el resto (55%) lo hacía en el campo (finca el Humoso). Al cabo de los tres meses (segunda toma de muestra), algunas de ellas pasaron de la fábrica al campo. El 80% de las mujeres llevaba más de 10 años trabajando en el campo y tan solo un 5% llevaba menos de 5 años. La mayoría de ellas realizan jornadas continuas de mañana (65%) y tan solo el 10% realizan una jornada partida, tanto en la fábrica como en el campo. El único uso de medidas de prevención que se realiza es el uso de guantes en el caso de casi todas las participantes (95%), en ambos grupos de estudio.

En relación a los datos obtenidos sobre el estado de salud, un 25% de las mujeres padecen o han padecido alguna enfermedad neurológica, como cefaleas o mareos. Numerosos estudios asocian la exposición a trazas de plaguicidas al desarrollo de síntomas como cefaleas, mareos o fatiga, por lo que esta exposición podría ser la desencadenante de estos síntomas (Jamal et al., 2002; Kamel et al., 2005). El 35% de las participantes han padecido síntomas respiratorios y digestivos. Sólo el 5% de las participantes presentaron tanto enfermedades neurológicas, digestivas como respiratorias. Los síntomas respiratorios son comunes entre los trabajadores expuestos a plaguicidas, comprobándose una relación entre la exposición a plaguicidas como los clorofenoles con el cáncer de pulmón (Zendehdel et al., 2014). Además se ha observado una posible relación entre esta exposición y enfermedades respiratorias crónicas como pueden ser el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Ye et al., 2013).

Con respecto a otras sintomatologías, el 10% de las participantes respondieron haber notado cambios en el ritmo intestinal. Tan solo un 5% notaron cambios en el peso en los tres meses entre la primera toma de muestra y la segunda. En la bibliografía

consultada, no se han encontrado efectos de los plaguicidas en el aumento del peso o en cambios en el ritmo intestinal, pero algunos autores (Bhaskar y Monhaty, 2014) han determinado que el mecanismo que desarrollan algunos plaguicidas como disruptor endocrino y concretamente, el hipotiroidismo y la hiperprolactinemia que inducen contribuye a un aumento de peso en estudios llevados a cabo en ratas.

Teniendo en cuenta que nuestro estudio está enfocado en una población femenina en edad fértil, se les incluyó en el cuestionario de salud la posible aparición de bultos en el pecho tratando de relacionarlo con el cáncer de mama. De todas las participantes, un 15% asegura haberlos notado en estos últimos 3 meses. Numerosos estudios muestran una posible relación entre la posibilidad de desarrollar cáncer de mama y la exposición a plaguicidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), siendo mayor la posibilidad mientras más temprana sea la exposición (Strumylaité et al., 2010). Para ver la posible influencia de la exposición laboral a plaguicidas y la fertilidad se les preguntó por si habían tenido dificultad para poder quedar embarazada, siendo afirmativa la respuesta en un 15% de los casos, de un total en el que tan solo un 10% son solteras, y el resto son casadas (60%), parejas de hecho (20%) o viudas (10%). Los estudios sobre la relación entre la exposición a plaguicidas y la fertilidad realizados en humanos hasta el momento se centran en hombres, ya que estos suponen mayoría en el personal encargado de la aplicación, y no tanto en las mujeres trabajadoras en la recolección. Sengupta y Banerjee (2014) concluyeron que, a pesar de no existir estudios a gran escala, la exposición a plaguicidas está muy relacionada con la infertilidad en general y con la disminución de los niveles de espermatozoides por debajo de los límites en los hombres expuestos. También se habla de una relación con abortos, partos prematuros o malformaciones, aunque sería necesaria una monitorización y más estudios con el fin de demostrarlos, ya que existen estudios de toxicidad demostrada en el sistema reproductor de numerosos animales (Sengupta y Banerjee, 2014).

2. Bioquímica sérica

En los análisis bioquímicos que se han realizado hemos obtenido diferencias significativas en algunos de los valores entre la primera y la segunda recogida de muestras.

En las tablas 3 y 4 se muestran resultados de los principales parámetros bioquímicos estudiados, en ambos grupos de estudio en las dos tomas de muestras realizadas. Cabe destacar que durante la primera toma se encontraron diferencias significativas entre las mujeres trabajadoras en el campo y las de la fábrica en los valores de glucosa, urea y creatinina pero en ambos casos, los valores medidos se encuentran dentro de los rangos normales (glucosa: 75 – 110 mg/dL, urea: 15 – 50 mg/dL, creatinina: 0.60 – 0.120 mg/dL). Por lo tanto, no podemos achacar a la exposición laboral a ningún contaminante la existencia de estas diferencias significativas, que es más una significancia estadística que real. En el mismo sentido podemos interpretar los resultados obtenidos en la segunda toma, en la que las medias de todos los parámetros medidos están dentro de los rangos normales, aunque existan diferencias significativas en algunos de ellos como por ejemplo la urea.

También se realizó el estudio de las hormonas tiroideas, tanto la estimulante del tiroides (TSH) como la tiroxina libre (T4L) (tablas 3 y 4), ambas involucradas en el metabolismo tiroideo y relevante debido a la relación que establecen autores como Bhaskar y Monhaty (2014) de la inducción de hipotiroidismo en ratones por su papel como disruptor endocrino. En la bibliografía consultada no existen resultados concluyentes sobre la relación con el hipotiroidismo en humanos pero sí sobre el papel que tienen como disruptores endocrinos.

En los estudios también se incluyó la medición de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) con el fin de establecer una relación más concluyente de la exposición laboral a los plaguicidas y los posibles resultados tanto en la fertilidad, como en el ciclo menstrual y la menopausia (tablas 3 y 4). Autores como Cooper et al. (2002) relacionan la exposición a plaguicidas con una aparición más temprana de la menopausia y las consecuencias que se derivan de ella, como una mayor mortalidad por enfermedades cardiovasculares.

	<i>Campo</i>		<i>Fábrica</i>	
	Media	SD	Media	SD
Glucosa (mg/dL)	94,56	13,92	81,09	7,08
Urea (mg/dL)	36,22	8,47	22,00	4,82
Creatinina (mg/dL)	0,84	0,17	0,69	0,10
Creatinina quinasa (U/L)	168,33	104,63	115,82	66,21
Fosfatasa alcalina (U/L)	57,89	16,87	58,73	14,11
Tirotropina (mUI/mL)	1,32	0,85	1,62	1,02
Tiroxina (libre) (ng/dL)	1,17	0,08	1,21	0,20
Folitropina (FSH) (mUI/mL)	29,31	35,39	25,72	39,62
Lutropina (LH) (mUI/mL)	21,97	24,09	18,85	20,13

Tabla 3. Medias y desviaciones de los resultados bioquímicos obtenidos en la primera recogida de muestra.

	<i>Campo</i>		<i>Fábrica</i>	
	Media	SD	Media	SD
Glucosa (mg/dL)	78,55	14,50	76,63	6,72
Urea (mg/dL)	29,55	4,32	21,13	2,59
Creatinina (mg/dL)	0,72	0,09	0,63	0,08
Creatinina quinasa (U/L)	124,36	75,05	105,38	33,37
Fosfatasa alcalina (U/L)	68,00	28,95	65,13	14,41
Tirotropina (mUI/mL)	1,59	0,79	1,60	0,70
Tiroxina (libre) (ng/dL)	1,16	0,13	1,21	0,29
Folitropina (FSH) (mUI/mL)	23,44	40,34	49,19	61,52
Lutropina (LH) (mUI/mL)	16,86	21,78	25,95	23,21

Tabla 4. Medias y desviaciones de los resultados bioquímicos obtenidos en la segunda recogida de muestra.

El Ministerio de Sanidad tiene editado un protocolo de vigilancia de la salud para trabajadores que están expuestos a plaguicidas. Este protocolo basa su control biológico en la determinación de las colinesterasas plasmática y eritrocitaria y los niveles de transaminasas, tanto aspartato transaminasa (AST/GOT) como alanina transaminasa (ALT/GPT) (Cabanillas et al., 1999). Por ello, se ha incluido en el presente estudio la medida de la actividad de estas enzimas (el resultado de las colinesterasas se puede ver en el apartado siguiente).

En concreto la AST y la ALT son indicadoras de posibles daños hepáticos que podría producir la exposición a plaguicidas. En nuestro caso, no se obtienen diferencias significativas entre los valores de las mujeres trabajadoras en el campo y la fábrica, en ninguna de las dos tandas de muestras (figuras 3 y 4).

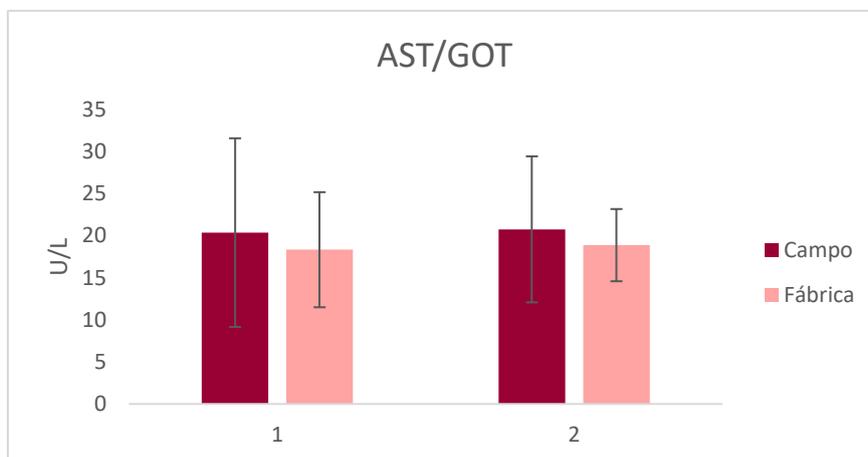


Figura 3. Media de los valores de AST/GOT obtenidos en la muestra de mujeres tanto en la tanda 1 como en la 2, en campo y fábrica.

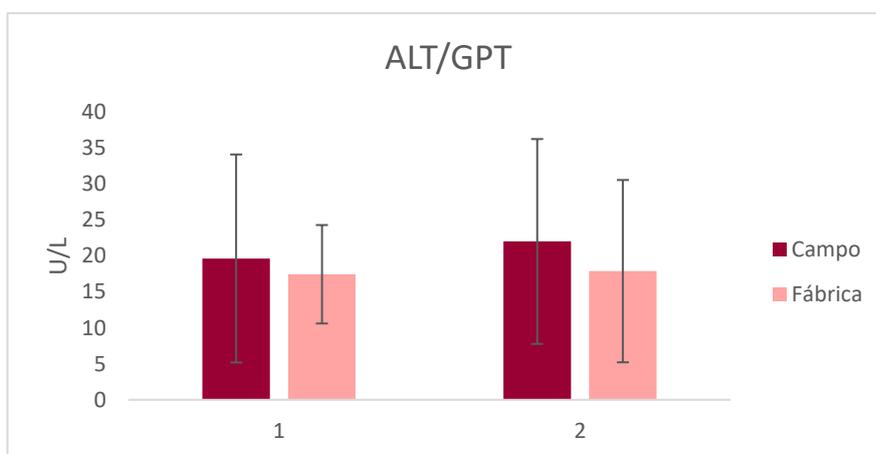


Figura 4. Media de los valores de AST/GOT obtenidos en la muestra de mujeres tanto en la tanda 1 como en la 2, en campo y fábrica.

Autores como Reyes-Gordillo et al. (2017) relacionan una producción prolongada de ROS con daños hepáticos, pudiendo utilizarse como biomarcadores de estos la actividad de estas enzimas. Debido a que uno de los mecanismos de acción más comunes de los plaguicidas es la producción de ROS, esto podría desencadenar el desarrollo de enfermedades hepáticas.

3. Actividad enzimáticas de las colinesterasas eritrocitaria y plasmática

El estudio de la actividad de estas enzimas se utiliza como biomarcador laboral a la exposición de organofosforados y carbamatos, recogidos en el protocolo de vigilancia de la salud anteriormente mencionado. Las colinesterasas son inhibidas reversiblemente por los carbamatos e irreversiblemente por los organofosforados, siendo la colinesterasa plasmática comúnmente usada para medir toxicidad aguda, mientras que la eritrocitaria es empleada para la exposición crónica. El protocolo de vigilancia de la salud incluye la medida de estas enzimas junto con la AST y la ALT, por ello en el presente estudio se han incluido ambas cuyos resultados se reflejan en la figuras 5 y 6.

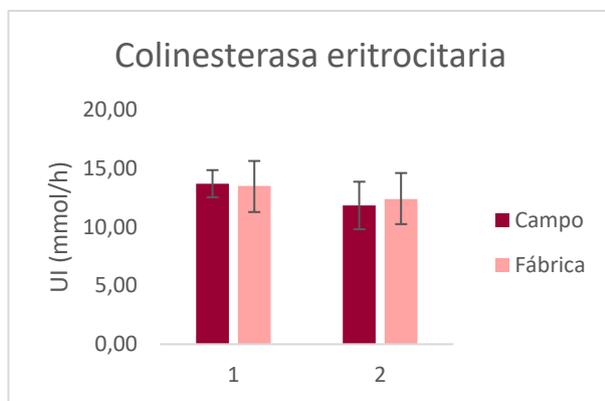


Figura 5. Valores de colinesterasa eritrocitaria para las dos recogidas de muestras para las trabajadoras del campo y la fábrica.

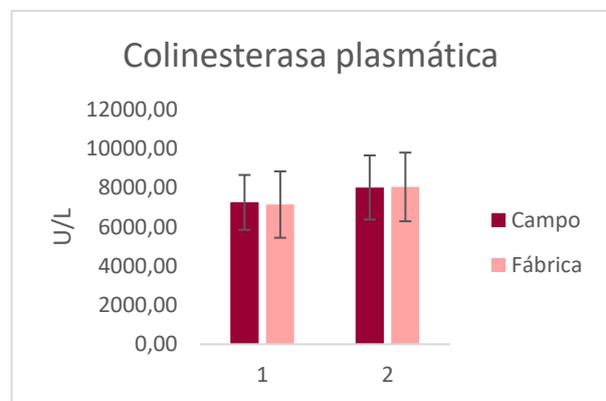


Figura 6. Valores de colinesterasa plasmática para las dos recogidas de muestras para las trabajadoras del campo y la fábrica.

Con respecto a las colinesterasas no se observan diferencias significativas entre los dos grupos de estudio durante las dos tomas de muestras. Además las medias de todos los valores se encuentran dentro de los rangos normales, siendo los valores de referencia 5.6 – 15.5 UI en el caso de la eritrocitaria y 4400 – 15500 UI/L para la plasmática. Esto puede deberse al escaso uso de este tipo de plaguicidas en la zona agrícola de estudio. Sin embargo, Fareed et al. (2017) sí observaron valores disminuidos de la actividad de ambas enzimas en trabajadores expuestos a organofosforados, estableciéndose así la relación entre la exposición a organofosforados y la disminución de la actividad enzimática.

A pesar de que el protocolo de vigilancia de la salud anteriormente mencionado hace hincapié en la medida de la actividad de estas enzimas de forma generalizada, queda probado que si los agricultores no hacen uso de estos plaguicidas (organofosforados y carbamatos), no resulta ser un buen indicador de la exposición laboral a plaguicidas. Esto es debido sobre todo a la tendencia actual a ser sustituidos por otros menos tóxicos como los piretroides. Por ello, sería interesante incluir dentro de los protocolos de vigilancia de la salud otros indicadores de toxicidad como, por ejemplo, marcadores de estrés oxidativo.

4. Peroxidación lipídica (LPO)

Un biomarcador específico de estrés oxidativo es la LPO, ya que el metabolismo aerobio genera una serie de ROS que atacan a todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo sustratos lipídicos, dando lugar a su oxidación. A su vez esto genera nuevos radicales libres que pueden reaccionar con otras moléculas rompiéndose el equilibrio entre defensa antioxidante y ROS, y que se genere por tanto una situación de estrés oxidativo.

Los valores obtenidos en la peroxidación lipídica muestran diferencias significativas cuando comparamos los valores de las mujeres trabajadoras en el campo y las de la fábrica, tanto en la primera ($p < 0.05$) como en la segunda tanda ($p < 0.01$) (figura 6).

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismo de acción de los plaguicidas, provocando un aumento de la producción de ROS responsables de la oxidación lipídica (Hilgert et al., 2018). En nuestro caso, podemos establecer una relación entre la exposición a plaguicidas en el caso de las mujeres trabajadoras en el campo con un aumento significativo en el valor de la LPO, siendo este uno de los biomarcadores más utilizados a lo largo de los años para establecer una posible exposición a plaguicidas. De la producción de ROS se deriva también la capacidad genotóxica de los plaguicidas al interaccionar estos con membranas celulares (Hilgert et al., 2018).

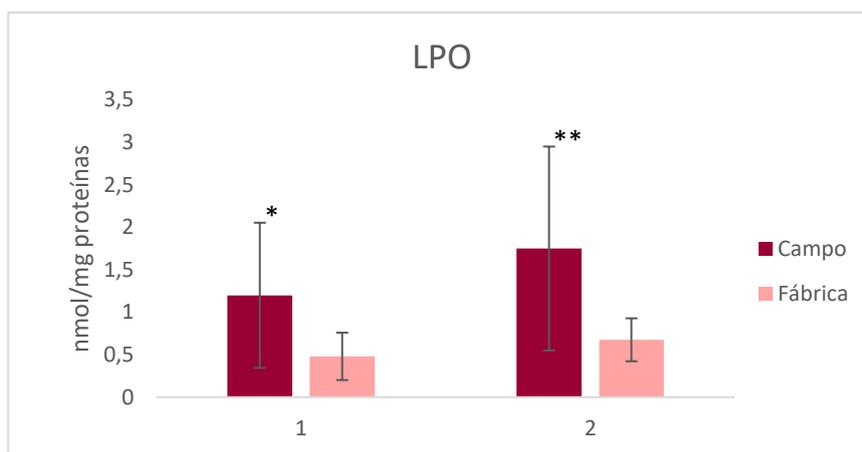


Figura 6. Comparación de niveles de LPO en suero de mujeres trabajadoras tanto en el campo como en la fábrica, en la primera como en la segunda extracción de sangre. En la primera toma se obtiene una significancia de * $p < 0.05$ y en la segunda, la diferencia significativa obtenida es de ** $p < 0.01$

5. Grado de exposición a los metales seleccionados en sangre

Los metales forman parte de numerosos plaguicidas y fertilizantes, siendo ambos una fuente de exposición importante (tabla 5). En los resultados obtenidos, no se muestran diferencias significativas entre las trabajadoras en el campo y las de fábrica. Los valores obtenidos de los elementos mayoritarios (Na y K) se encuentran dentro de los valores necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Muchos metales tienen la capacidad de permanecer en el organismo produciendo daños, en concreto, el Al y el Pb son metales neurotóxicos, cuya exposición puede derivar en problemas cognitivos en el caso de niños nacidos de mujeres que hayan estado expuestas (Forsyth et al., 2018).

	<i>Campo</i>		<i>Fábrica</i>	
	Media	SD	Media	SD
Al (ng/g)	837,27	276,59	1674,44	1009,59
Mn (ng/g)	77,33	10,67	63,00	9,46
Cu (ng/g)	966,62	128,60	939,56	130,12
Zn (ng/g)	5864,55	1122,68	5762,89	1184,46
Pb (ng/g)	56,75	9,03	54,74	8,59
Na (mEq/L)	141,64	2,06	140,11	2,37
K (mEq/L)	40,55	119,88	4,42	0,37

Tabla 5. Metales medidos en muestras de sangre en mujeres trabajadoras en el campo y en la fábrica.

Conclusiones

De todos los parámetros estudiado bioquímicos estudiados sólo hemos obtenido diferencias significativas entre ambos grupos de estudio en valores como la glucosa, la urea o la creatinina, estos dos últimos marcadores de daño renal. Sin embargo, a pesar de esas diferencias, en ambos grupos los valores medios se encontraban en los rangos normales. Por lo tanto, no podemos decir que realmente haya diferencias significativas relacionadas con la exposición a plaguicidas o con el ambiente laboral.

Sí se han encontrado diferencias significativas reales en los niveles de peróxidos lipídicos, siendo más elevados en las trabajadoras de campo que en las de la fábrica. Este hecho podría ser explicado por la exposición de estas mujeres durante su jornada laboral a plaguicidas, no sólo a los restos residuales que quedan en las verduras y frutas que recolectan, sino por los que se están aplicando en los cultivos aledaños. Por ello, creemos que se trata de un biomarcador no específico de ningún plaguicida en concreto y que se podría considerar el incluirlo en los protocolos de vigilancia de la salud como indicador de una exposición laboral a diferentes plaguicidas.

El hecho de no detectar una disminución en la actividad de las colinesterasas se puede concluir que la población objeto de estudio no está expuesta a niveles tóxicos de plaguicidas organofosforados y/o carbamatos. Tampoco se ha detectado daño hepático, ni renal, ni alteración en las hormonas tiroideas y gonadotrópicas. Los niveles de metales detectados en sangre entran dentro de los rangos habituales, procedentes en la mayoría de los casos de la dieta y por contaminación ambiental. Todos estos resultados son resultados preliminares dentro de un proyecto que abarca un seguimiento de esta población durante un año y el estudio de los niveles de otros plaguicidas en orina, por ejemplo el glifosato, que darán una visión más completa de la exposición y la posible relación con el estado de salud de las participantes.

Bibliografía

Bhaskar R, Mohanty B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: *In silico* and *in vivo* analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen Comp Endocrinol*. 2014; 205: 226-234.

Bradberry S, Cage S, Proudfoot A, Allister J. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicol Rev*. 2005; 24(2): 93-106.

Briggs SA. Basic guide to pesticides: their characteristics and hazards. EEUU: Taylor & Francis; 1992.

Cabanillas JL, Fernández M, Laynez F, Ledesma J, López A, Planas C, Serrano JL, Ventura A. Protocolo de vigilancia sanitaria específica: plaguicidas. 1999 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: <http://www.msc.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/plaguicidas.pdf>

Clemente Z, Busato R, Oliveira C, Cestari MM, Ramsdorf W, Magalhães V, Wosiack A, Silva H. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicon*. 2010; 55(2-3): 396-406.

Combarrous Y. Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *C R Biol*. 2017; 340(9-10): 406-409.

Comisión del Codex Alimentarius. Límites máximos del codex para residuos de plaguicidas. 1997 [en línea]. [Consultado en mayo 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/waicent/faostat/pest-residue/pest-s.htm#E10E3>

Comisión Europea. Frequently Asked Questions: Glyphosate. 2017 [en línea]. [Consultado en mayo 2014]. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_faq_glyphosate_20170719_final.pdf

Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Medidas preventivas en el manejo de plaguicidas, ficha divulgativa [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: [https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=4580&IDTIPO=100&RASTRO=c721\\$m](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=4580&IDTIPO=100&RASTRO=c721$m)

Comunidad Europea. Reglamento (CE) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de

plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. 2005 [en línea]. [Consultado en mayo 2015]. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2005/070/L00001-00016.pdf>

Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Social. Autorizaciones excepcionales de productos fitosanitarios. 2018 [en línea]. [Consultado en mayo 2015]. Disponible en: <http://www.iuntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescayderesarrollorural/areas/agricultura/sanidad-vegetal/paginas/productos-fitosanitarios-autorizaciones-excepcionales.html>

Cooper, Glinda S, Savitz, David A, Robert, Kit C. Organochlorine Exposure and Age at Natural Menopause. *Epidemiol* 2002; 13(6): 729-733.

Del Puerto AM, Suárez S, Palacio DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2014; 52(3): 372-387.

El-Kady A, Abdel-Wahhab M. Occurrence of trace metals in foodstuffs and their health impact. *Trends Food Sci Technol*. 2018; 75: 36-45.

Ellman G, Courtney K, Andres V, Featherstone R. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961; 7: 88-95.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-21.

Fareed M, Kesavachandran CN, Bihari V, Kamal R, Kuddus M. Oxidative stress and cholinesterase depression among farm workers occupationally exposed to pesticides in India. *J Environ Biol*. 2017; 38: 305-311.

Fernández D, Mancipe L, Fernández D. Intoxicación por Organofosforados. *Rev. Fac. Med*. 2010; 18 (1): 84-92.

Florea AM, Büsselberg D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals*. 2006; 19: 419-427.

Forsyth J, Saiful M, Masud S, Raqib R, Sajjadur M, Muehec M, Fendorf S, Lubyd S. Prevalence of elevated blood lead levels among pregnant women and sources of lead exposure in rural Bangladesh: A case control study. *Environ Res*. 2018; 166: 1-9.

Greim H, Saltmiras D, Mostert V, Strupp C. Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. *Crit Rev Toxicol*. 2015; 45(3): 185-208.

Hilgert C, Regina C, Troina F, Pimentel L, Lobo AJ, Iomara C, Da Silva G, Costa R, Curi R, Weidner S. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017; 148: 177-183.

Jamal GA, Hansen S, Pilkington A, Buchanan D, Gillham RA, Abdel-Azis M, Julu PO, Al-Rawas SF, Hurley F, Ballantyne JP. A clinical neurological, neurophysiological, and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides. *Occup Environ Med*. 2002; 59(7): 434-41.

Joshaghani HR, Ahmadi AR, Mansourian AR. Effects of occupational exposure in pesticide plant on workers' serum and erythrocyte cholinesterase activity. *Int J Occup Med Environ Health*. 2007; 20(4): 381-385.

Kamel F, Engel LS, Gladen BC, Hoppin JA, Alavanja MC, Sandler DP. Neurologic symptoms in licensed private pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(7): 877-882.

Kemp M, Go YM, Jones DP. Non-equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(6): 921-937.

Lei W, Wang DD, Dou TY, Hou J, Feng L, Yin H, Luo Q, Sun J, Ge GB, Yang L. Assessment of the inhibitory effects of pyrethroids against human carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017; 321: 48-56.

López CL. Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública*, 18. 1993. México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Martin-Reina J, Duarte JA, Cerrillos L, Bautista JD, Moreno I. Insecticide Reproductive Toxicity Profile: Organophosphate, Carbamate and Pyrethroids. *J Toxins*. 2017; 4(1): 7.

Mayhoub S, Berton T, Bach V, Tack K, Deguines C, Floch-Berneaud A, Demots S, Stéphan-Blachard E, Chardon K. Self-reported Parental Exposure to Pesticide during Pregnancy and Birth Outcomes: The MecoExpo Cohort Study. *PLoS One* 2014; 9(6): e99090.

Mendola P, Messer L, Rappazzo K. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril*. 2008; 89(1): 81-94.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Estadísticas Agrarias. Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios y Estadística quinquenal de utilización de productos fitosanitarios en la Agricultura. 2013 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx>

Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. 2012 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2012-11605>

Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM, Groot H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato / Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed *in vitro* to glyphosate. *Biomédica*. 2005; 25: 35-45.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. 2002 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: [+http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf](http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf)

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Reglamento (UE) nº 528/2012, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de biocidas [en línea]. [Consultado en Abril 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W1604S/w1604s04.htm>

Pearson J y Patel M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 2016; 1378(1): 17-24.

Pineda J. Plaguicidas: monitoreo efectivo de la exposición a carbamatos y organosfosforados. *Cienc Trab*. 2007; 9(26): 178 – 181.

Presidencia del Gobierno. Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas. 2003 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1984-1791&p=20030304&tn=0>

Ramírez JA y Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 2001; 4(2): 67-75.

Reyes-Gordillo K, Shah R, Muriel P. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Current and Future Therapy. Oxid Med Cell Longev. 2017.

Roldán-Tapia L, Parrón T, Sánchez-Santed F. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphate pesticides. Neurotoxicol Teratol. 2005; 27(2): 259-266.

Saillenfait AM, Ndiaye D, Sabaté JP. The estrogenic and androgenic potential of pyrethroids *in vitro*. Toxicol In Vitro. 2016; 34: 321-332.

Salazar NJ, Aldana ML. Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad Y Regulación. Rev Ciencias Biol T La Salud La Univ Son. 2011; 11: 23-28.

Sánchez-Santed F, Colomina MT, Herrero Hernández E. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. Cortex. 2016; 74: 417-26.

Santamaría-Ulloa C. El impacto de la exposición a plaguicidas sobre la incidencia de cáncer de mama. Evidencia de Costa Rica. Poblac. Salud Mesoam. 2009; 7(1): art 1.

Sengupta P y Banerjee R. Environmental toxins: Alarming impacts of pesticides on male fertility. Hum Exp Toxicol. 2014; 33(10): 1017-1039.

Silberman J y Taylor A. Toxicity, Carbamates. 2018 [en línea]. [Consultado en abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482183/>

Strumylaitė L, Mechonošina K, Tamašauskas Š. Environmental factors and breast cancer. Medicina (Kaunas). 2010; 46(12): 867-73.

Tarazona J, Court-Marques D, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. Arch Toxicol. 2017; 91(8): 2723-2743.

United States Environmental Protection Agency (EPA). Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry. 1994; method 200.8.

Vidal-Dorsch DE, Bay SM, Maruya K, Snyder SA, Trenholm RA, Vanderford BJ. Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. Environ Toxicol Chem. 2012; 31(12): 2674 – 82.

Zendehdel R, Tayefeh-Rahimian R, Kabir A. Chronic exposure to chlorophenol related compounds in the pesticide production workplace and lung cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(13): 5149-5153.

