

MEMORIA FINAL

Biomonitorización de cobre en recolectores de aceitunas andaluces y posibles consecuencias sobre su salud.

Rocío Sánchez Ruiz¹, Carmen Chamorro-López¹, Alfredo G. Casanova², Jose Martín-Reina¹, Raúl Aguilera-Velázquez¹, Ana I. Morales², Juan D. Bautista³, and Isabel M. Moreno¹

¹Department of Nutrition and Bromatology, Toxicology, and Legal Medicine, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain

²Toxicology Unit, Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	1/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 1/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

INDICE

Resumen del proyecto.....	4
1. Introducción.....	5
2. Referencias.....	11
3. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	14
4. Material y Método.....	16
4.1 Población de estudio.....	16
4.2 Recolección y procesamiento de muestras.....	19
4.3. Evaluación de la peroxidación lipídica mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA).....	21
4.4. Evaluación de la oxidación proteica mediante la cuantificación grupos carbonilo.....	21
4.5 Evaluación de la Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD).....	21
4.6. Evaluación de la Actividad de la Catalasa (CAT).....	21
4.7. Cuantificación de la Concentración Total de Antioxidantes.....	22
4.8. Determinación de Metales.....	22
4.9. Evaluación de Biomarcadores de Daño Renal.....	23
4.9.1. N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAG).....	23
4.9.2. Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL).....	23
4.9.3. Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 7 (IGFBP7).....	23
4.10. Análisis Estadístico.....	23
4.11 Análisis de Correlación.....	24
5. Resultados.....	25
5.1 Población de estudio.....	25

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	2/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 2/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

5.2 Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, actividades enzimáticas, antioxidantes totales.....	27
5.3 Evaluación de los niveles de Cu y otros metales relevantes para el estudio	31
5.4 Evaluación de biomarcadores de daño renal temprano.....	32
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	38
8. Transferencia de resultados.....	40
9. Perspectivas Futuras.....	51
Anexos	
Anexo I.....	53
Anexo II.....	70
Anexo II.....	72

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	3/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 3/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

RESUMEN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El objetivo principal de este proyecto ha sido llevar a cabo un estudio epidemiológico entre trabajadores del campo encargados de la recogida de aceitunas en zonas olivereras de Andalucía (DO Estepa), para estudiar los posibles daños producidos por la exposición indirecta a cobre, derivada del tratamiento principal para combatir el repilo en los olivos con fungicidas a base de cobre. Esta exposición ha sido muy poco considerada hasta la fecha en este tipo de trabajadores. El período de reclutamiento de los participantes se llevó a cabo durante la campaña de recogida, gracias a la colaboración de la médico del trabajo del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales (Preventiam). Durante la consulta de seguimiento de la salud, se nos permitió informar a los trabajadores (tanto agrícolas como los NOE) de los objetivos del proyecto y obtener su consentimiento informado. Las muestras de orina y sangre de los participantes, recogidas en el mismo momento, se procesaron inmediatamente para la obtención de plasma y suero y se conservaron a -20°C hasta su uso. La orina se destinó a la monitorización de marcadores de daño renal temprano (proteinuria, Nacetil-D-glucosaminidasa, lipolina asociada a gelatinasa neutrofila y Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 7 (IGFBP7)). Las muestras de sangre se destinaron a la evaluación de las actividades de las enzimas marcadoras de estrés oxidativo SOD, CAT, antioxidantes totales y los niveles de peroxidación lipídica y oxidación proteica. El objetivo final es que estos biomarcadores se puedan usar para la prevención de las patologías asociadas a una exposición laboral indirecta a cobre habida cuenta que el exceso de cobre puede causar un daño multiorgánico debido a la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno a través de la reacción de Fenton, siendo uno de los órganos diana el riñón pudiendo causar un daño renal por exposición crónica. En función de los resultados obtenidos, se puede afirmar el efecto de la exposición indirecta a plaguicidas (fungicidas incluidos) sobre el riñón, observándose un daño renal subclínico a nivel tubular. Además, se observa una tendencia al alza en los marcadores de estrés oxidativo que unido al descenso de los niveles control de metales que intervienen en la defensa antioxidante, indica una alteración de este mecanismo de acción de agentes tóxicos.

Palabras clave: Agricultor, olivos, cobre, plaguicidas, fungicidas, estrés oxidativo, daño renal temprano

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	4/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 4/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

1. INTRODUCCIÓN

Los trabajadores agrícolas se encuentran entre las poblaciones laborales más vulnerables debido a factores de riesgo sociales y culturales asociados con frecuencia a su etnia, estatus migratorio, clase social y ubicación rural (Martín-Reina et al., 2021). En este sentido, se enfrentan a diferentes condiciones ambientales, como la exposición al calor y deshidratación, pesticidas, metales pesados, y no siempre cuentan con una protección completa.

Los pesticidas son sustancias ampliamente utilizadas para preservar los cultivos (Peres et al., 2006; Hassanin et al., 2017). La exposición a estos puede contribuir a diversos cambios bioquímicos que, en algunos casos, pueden dar lugar a efectos adversos agudos y crónicos en los seres humanos, incluidos efectos neurotóxicos, cáncer, alteraciones reproductivas y endocrinas, daño neurológico y disfunción del sistema inmunológico, entre otros (Omland, 2002; Hassanin et al., 2017). La exposición a estos pesticidas puede ocurrir tanto a nivel ocupacional como ambiental. En el caso ocupacional, la población expuesta suele ser trabajadores rurales o de invernaderos, así como trabajadores de fabricación, mezcla o aplicación (Groot y Van't Hooft, 2016; Gangemi et al., 2016). Por otro lado, la población general puede verse afectada por la exposición ambiental, a través del consumo de alimentos y/o agua contaminada o el uso de pesticidas en el hogar o al vivir cerca de campos fumigados (Gangemi et al., 2016). Además, en situaciones de la vida real, se observa comúnmente el uso de múltiples pesticidas, lo que se relaciona con una mayor incidencia de intoxicaciones y muertes por sus posibles efectos sinérgicos (Martín-Reina et al., 2021). En este sentido, el tipo y la gravedad de los efectos adversos para la salud de los pesticidas están determinados por la categoría química individual, la dosis y la duración de la exposición, la vía de exposición y el uso de equipo de protección personal (Martín-Reina et al., 2021). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1990), la exposición continua a largo plazo a los pesticidas provoca alrededor de 772000 nuevos casos de enfermedades al año (Hassanin et al., 2017).

Además de los pesticidas, los trabajadores rurales también pueden estar expuestos a metales pesados y metaloides (Quinteros et al., 2016). Estos elementos se caracterizan por su toxicidad aguda y crónica a dosis muy bajas, pero con una vida media biológica muy larga por su no biodegradabilidad (Farcas et al., 2013; Quinteros et al., 2016). Los metales pesados son constituyentes naturales de la corteza terrestre y persisten como contaminantes ambientales, ya que no pueden degradarse ni destruirse (Quinteros et al., 2016). Sin embargo, la mayoría de los contaminantes de metales pesados provienen de actividades antropogénicas como derrames químicos accidentales, vertidos de aguas residuales domésticas e industriales no

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	5/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 5/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

tratadas, vertido directo de desechos al suelo y residuos de algunas fuentes agrícolas (Kamal, 2004; Micó et al., 2006; Quinteros et al., 2016), ya que los pesticidas y fertilizantes a menudo pueden contener metales pesados (Quintero et al., 2016).

Así, derivados del cobre como el sulfato de cobre se han utilizado comúnmente en la agricultura para el control de enfermedades. En el caso de las aceitunas, el cobre es el fungicida principal autorizado para el control del "Repilo", una infección fúngica que causa pérdidas económicas significativas en el sector de las aceitunas. Su aplicación a largo plazo conduce a la acumulación de cobre en los suelos, junto con trazas remanentes acumuladas en las hojas, representando un riesgo para la salud de los trabajadores.

El cobre es un elemento traza esencial y, fisiológicamente, desempeña un papel en los sistemas biológicos, como el transporte de electrones, sirviendo como cofactor para muchas enzimas involucradas en reacciones redox (Jomova y Valko, 2011; Jomova et al., 2012; Dahiri et al., 2023). Además, el cobre desempeña un papel protector contra el daño oxidativo a través de la ceruloplasmina y la metalotioneína (Sevcikova et al., 2011; Dahiri et al., 2023). Sin embargo, el cobre también puede inducir estrés oxidativo mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden oxidar bases, crear roturas de hebras de ADN o unirse a moléculas que contienen tioles, como la glutatión. Esta unión podría disminuir los niveles de glutatión mediante la activación de cascadas de señalización de MAPK (Jomova y Valko, 2011; Mattie y Freedman, 2004; Dahiri et al., 2023). La exposición prolongada indirecta al cobre está asociada con problemas de salud graves, como enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, trastornos hepáticos y aterosclerosis, aunque existe escasez de investigaciones que respalden la nefrotoxicidad asociada con este metal (Pantic et al., 2019).

Además, los metales y metaloides pueden estar presentes en el agua potable o en la dieta, como en mariscos, pescado, carne, arroz o incluso vegetales (Weyde et al., 2021; Dahiri et al., 2022). Otra fuente de exposición está vinculada a hábitos de estilo de vida, como fumar, consumir alcohol o abusar de drogas, e incluso la inhalación de aire contaminado (Weyde et al., 2021; Dahiri et al., 2022). Elementos traza esenciales como manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn) desempeñan un papel importante en los procesos biológicos humanos, como la protección contra el daño oxidativo, la señalización celular o la apoptosis (Karakis et al., 2021; Lee et al., 2021; Dahiri et al., 2022). Por ejemplo, el Zn es un componente de muchas proteínas, lípidos y carbohidratos, con un papel esencial en el desarrollo inmunológico, con una función antioxidante mediante la protección de grupos sulfhidrilo de proteínas contra el ataque de radicales libres, y mediante la reducción de la formación de radicales libres por

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	6/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 6/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FFHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

antagonismo de metales como Fe o Cu (Dahiri et al., 2023). Además, el Zn inhibe la NADPH oxidasa y reduce la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que la deficiencia de Zn se ha vinculado con niveles elevados de estrés oxidativo mediante la mayor oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Jomova and Valko, 2011; Dahiri et al., 2023). Otro constituyente necesario de muchas proteínas sería el Mn, que desempeña un papel esencial en el metabolismo, participando en enzimas mitocondriales y en la superóxido dismutasa (SOD), aunque una exposición excesiva se ha relacionado con neurotoxicidad (Bjørklund et al., 2017; Dahiri et al., 2022). Otro metaloide con un papel antioxidante sería el Se, ya que es un cofactor esencial para GPx, selenoproteína P y tioredoxina reductasa, que participan en la eliminación de radicales libres y el mantenimiento del equilibrio redox (Guo et al., 2018; Zakeri et al., 2021; Dahiri et al., 2023).

Los mecanismos de acción descritos para diversos pesticidas y metales involucran la generación de estrés oxidativo, lo que aumenta la producción de radicales libres que pueden acumularse en la célula y dañar macromoléculas biológicas como el ARN, el ADN y las proteínas reparadoras del ADN, entre otras, afectando la capacidad antioxidante, los mecanismos de defensa y aumentando la peroxidación lipídica. Se cree que estos cambios celulares están vinculados al desarrollo de enfermedades a largo plazo, incluyendo la carcinogénesis, la neurodegeneración y trastornos que afectan los sistemas cardiovascular, respiratorio, renal, endocrino y reproductivo.

Además, se ha postulado que los agroquímicos como pesticidas, fertilizantes, metales pesados y condiciones como el estrés térmico y la deshidratación ocupacional son factores de riesgo para enfermedades renales crónicas. A nivel mundial, la prevalencia de la enfermedad renal crónica está en aumento y se ha convertido en un importante problema de salud global, contribuyendo significativamente a las tasas de mortalidad. Este aumento se atribuye a las dificultades en la filtración sanguínea en individuos con enfermedades renales, lo que conduce a la acumulación de desechos en el cuerpo y al desarrollo potencial de otros problemas de salud crónicos, como enfermedad cardiovascular, enfermedad ósea mineral y anemia, entre otros. Es imperativo realizar una evaluación exhaustiva de las repercusiones asociadas con la exposición ocupacional a agroquímicos para evaluar con precisión los riesgos asociados y desarrollar estrategias efectivas para medidas preventivas. Aunque la mayoría de los estudios epidemiológicos sobre la exposición a pesticidas se centran en la exposición directa de los trabajadores agrícolas que manipulan y aplican pesticidas en el campo (exposición directa), hay una notable falta de investigación sobre la exposición indirecta en trabajadores que

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	7/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 7/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

recolectan frutas y verduras después del período de espera recomendado por los fabricantes de pesticidas antes de volver al campo. Estos trabajadores están crónicamente expuestos de manera indirecta a niveles traza de pesticidas (Martin-Reina et al., 2021).

En España, la evaluación de la salud obligatoria para los trabajadores se establece como una política pública y se aconseja realizarla anualmente. Sin embargo, este requisito se aplica exclusivamente a los agricultores involucrados en la manipulación y aplicación de estos productos, excluyendo a aquellos que participan en la recolección de frutas.

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 (INSST, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 70% de las intoxicaciones por plaguicidas en el mundo resultan de una exposición laboral, causando daños a millones de trabajadores agrícolas cada año (Dalmolin et al., 2020). De hecho, la Organización Internacional del Trabajo clasificó la actividad agrícola como uno de los tres sectores profesionales más peligrosos junto con la minería y la construcción (FAO, ILO, UITA, 2007).

La normativa en materia de Prevención de Riesgos Laborales (PRL) se ha ido desarrollando, y multiplicando, con el fin de conseguir lo que la Ley de PRL describe (B.O.E., 1995). De acuerdo con esta ley y dentro de la especialidad de la higiene industrial, y, más concretamente, en lo referido a los agentes químicos, desde el año 1995, se ha desarrollado una batería importante de normativas, con el fin de evitar que la salud de los trabajadores se vea mermada en su puesto de trabajo como consecuencia de una exposición inadecuada a ellos. En base a esta normativa, se han desarrollado nuevos protocolos de protección dirigidos a agricultores. Sin embargo, hay algunos trabajos agrícolas tradicionales como la recolección manual de frutas y verduras que no están suficientemente protegidos por esta legislación. La mayoría de las leyes sobre Salud y Seguridad en el Trabajo se refieren a los trabajadores que transportan, almacenan y aplican plaguicidas (Martin-Reina et al., 2021).

Pero no solo la legislación, sino también la mayoría de los estudios epidemiológicos se centran en los efectos de los plaguicidas en agricultores que manejan estos químicos, y no en recolectores de frutas y verduras. Esta situación es aparentemente normal, ya que los fabricantes establecen un período de tiempo de seguridad, tras la aplicación del producto, en

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	8/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 8/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FFHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



el que el trabajador debe evitar entrar en contacto con el mismo. Pasado este tiempo, el fabricante garantiza que el campo, el cultivo tratado y el medio ambiente están libres de residuos de biocidas y que no existe riesgo de exposición. Sin embargo, la EFSA publicó en 2014 la "Guía sobre la evaluación de la exposición de operadores, trabajadores, residentes y transeúntes" en la evaluación de riesgos para productos fitosanitarios donde indica que los términos "Coeficientes de transferencia" (TC) (la transferencia de residuos de la superficie de la planta a la ropa o la piel del trabajador), "Residuos foliares desplazables" (DFR) (cantidad de residuos que se eliminan del follaje después de ser aplicado) y Reingreso (cuando el trabajador, operador, transeúnte o residente va nuevamente al lugar donde se ha aplicado) deben considerarse para comprender el riesgo de exposición a plaguicidas después de su aplicación (EFSA, 2014). Este documento se reflejó posteriormente en los "Criterios de Evaluación de la estimación de la exposición a productos fitosanitarios de los operarios, trabajadores, residentes y transeúntes" (Ministerio de Sanidad, 2017) y recogido en "Prevención de Riesgos Durante el uso de productos Fitosanitarios" (INSST, 2017). Teniendo esto en cuenta y teniendo en cuenta que el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST) demostró la presencia de residuos de plaguicidas en los guantes externos de los agricultores que estaban recolectando tres cultivos de invernadero una vez pasado el tiempo seguro para la reentrada (Abril Muñoz, 2017), se podría concluir que hay riesgo a exposición química de fitosanitarios en personas que re-entran en cultivos para hacer tareas de recolección.

Aquellos trabajadores expuestos en su ambiente laboral a estas sustancias son una población que proteger. Así, existe una abundante legislación relativa a la protección del trabajador que manipula los plaguicidas (transporte, almacenamiento y aplicación), sin embargo, no se le da suficiente importancia a la protección de aquellos trabajadores encargados de la recolección de verduras y frutas. En España, el INSST, es 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. Y son los técnicos de prevención de riesgos laborales (TPRL) los encargados del difícil reto de conseguir que el trabajador no tenga accidentes, ni enferme como consecuencia de su trabajo; en este caso concreto que el trabajador no enferme debido a la exposición a agentes químicos (B.O.E., 1997).

Una de las misiones fundamentales de la figura del TPRL es preguntarse si, en ambientes

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	9/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 9/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

laborales donde la exposición a distintos tipos de productos (químicos y/o biológicos) es indirecta, dicha exposición está controlada y, lo más importante, si esta exposición indirecta no afecta a la salud de los trabajadores.

Situaciones donde surgen estas preguntas las encontramos en diferentes campos, como, por ejemplo: en el sector médico, la exposición indirecta de personal médico a productos químicos como el formaldehído, glutaraldehído o anestésicos; o como en el caso del presente estudio donde nos hemos centrado en la exposición laboral indirecta a fungicidas basados en Cu. Es por ello, que conocedores de la amplia normativa y documentación que ya existe sobre la peligrosidad de la exposición directa a plaguicidas, relativa principalmente a los trabajadores que los aplican, hemos querido extender el estudio y profundizar más en resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, donde se observó por primera vez daño renal subclínico en una población de mujeres en un entorno rural con exposición crónica indirecta a pesticidas. Para profundizar en estos hallazgos, el presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar si la exposición indirecta a pesticidas, específicamente a un fungicida a base de cobre, induce alteraciones en los parámetros bioquímicos. Así, se evaluaron biomarcadores de estrés oxidativo, así como niveles de metales como Cu, Mn, Se y Zn, y biomarcadores tempranos de daño renal en hombres encargados de la recolección de aceitunas. Estos resultados se compararon luego con una cohorte de hombres no expuestos ocupacionalmente a estos productos químicos pero que viven en el mismo entorno.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	10/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 10/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

2. REFERENCIAS

Abril Muñoz, I. (2017). Exposición a productos fitosanitarios durante la reentrada a cultivos tratados. In *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo* (Vol. 90). http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/PUBLICACIONES/PERIODICAS/Rev_INSHT/2017/SST_90_enlaces.pdf

Bjørklund, G.; Chartrand, M.S.; Aaseth, J. Manganese exposure and neurotoxic effects in children. *Environ. Res.* 2017;155:380–384.

B.O.E. (1995). Ley 31/1995, de 8 de Noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales. *Boletín Oficial Del Estado*, 269, 9. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1995-24292>

B.O.E. (1997). Real Decreto 39 / 1997 , de 17 de enero , por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención. TEXTO CONSOLIDADO. 1–38.

Dahiri, B.; Hinojosa, M.G.; Carbonero-Aguilar, P.; Cerrillos, L.; Ostos, R.; Bautista, J.; Moreno, I. Assessment of the oxidative status in mother-child couples from Seville (Spain): A prospective cohort study. *Free Rad Biol and Med.* 2023;207:308-319.

Dahiri, B.; Martín-Carrasco, I.; Carbonero-Aguilar, P.; Cerrillos, L.; Ostos, R.; Fernández-Palacín, A.; Bautista, J.; Moreno, I. Monitoring of metals and metalloids from maternal and cord blood samples in a population from Seville (Spain). *Sci Tot Environ.* 2023;854:158687.

Dalmolin, S. P., Dreon, D. B., Thiesen, F. V., & Dallegrave, E. (2020). Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 75(October 2019), 103304. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103304>

EFSA. (2014). Guidance on the assessment of exposure of operators, workers, residents and bystanders in risk assessment for plant protection products. *EFSA Journal*, 12(10), 1–55. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3874>

FAO, OIT, & UITA. (2007). *Trabajadores Agrícolas y su contribucion a la agricultura y el desarrollo rural sostenible*.

Farcas, A.; Matei, A.V.; Florian, C.; Badea, M.; Coman, G. Health effects associated with acute and chronic exposure to pesticides. In: En L.I., Simeonov, F.Z.; Macaev, B.G. S (eds).

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	11/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 11/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Environmental security assessment and management of obsolete pesticides in Southeast Europe. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 103–110

Gangemi, S.; Miozzi, E.; Teodoro, M.; Briguglio, G.; De Luca, A.; Alibrando, C.; Polito, I.; Libra, M. Occupational exposure to pesticides as possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (review). *Molec Med Rep.* 2016;14:4475-4488.

Groot M.J.; Van't Hooft, K.E. The hidden effects of dairy farming on public and environmental health in The Netherlands, India, Ethiopia, and Uganda, considering the use of antibiotics and other agro-chemicals. *Front Public Health* 2016;4:12.

Guo, H.; Wang, H.; Zheng, J.; Liu, W.; Zhong, J.; Zhao Q. Sensitive and rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC–MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method, *Forensic Sci. Int.* 2018;283:111–117.

Hassanin, N.M.; Awad, O.M.; El-Fiki, S.; Abou-Shanab, R.A.I.; Abou-Shanab, A.R.A.; Amer, R.A. Association between exposure to pesticides and disorder on hematological parameters and kidney function in make agricultural workers. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25:30802-30807.

INSST. (2017). *Prevención de Riesgos durante el uso de productos fitosanitarios* (INSSBT (ed.)).

<https://www.insst.es/documents/94886/538970/Prevenci%C3%B3n+de+riesgos+durante+el+uso+de+productos+fitosanitarios.pdf/a4ba5197-259f-4570-b01f-7de81810189b>

Jomova, K.; Baros, S.; Valko, M. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems, *Transit. Met. Chem.* 2012;37:127–134.

Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283:65–87.

Kamal, M. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ Int* 2004;29:1029–1039.

Karakis, I.; Landau, D.; Gat, R.; Shemesh, N.; Tirosh, O.; Yitshak-Sade, M.; Sarov, B.; Novack, L. Maternal metal concentration during gestation and pediatric morbidity in children: an exploratory analysis. *Environ. Health Prev. Med.* 2021;26:1–11.

Lee, K.S.; Kim, K.N.; Ahn, Y.D.; Choi, Y.J.; Cho, J.; Jang, Y.; Lim, Y.H.; Kim, J.I.; Shin, C.H.; Lee, Y.A.; Kim, B.N.; Hong, Y.C. renatal and postnatal exposures to four metals mixture and IQ in 6-year-old children: a prospective cohort study in South Korea. *Environ. Int.* 2021;157:106798.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	12/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 12/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

Martín-Reina, J.; Casanova, A.G.; Dahiri, B.; Fernández, I.; Fernández-Palacín, A.; Bautista, J.; Morales, A.I.; Moreno, I. Adverse health effects in women farmers indirectly exposed to pesticides. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18:5909.

Mattie, M.D.; Freedman, J.H. Copper-inducible transcription: regulation by metal and oxidative stress-responsive pathways, *Am. J. Physiol. Physiol.* 2004;286:293-301.

Micó, C.; Recatalá, L.; Peris, M.; Sánchez, J. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*. 2006;65:863–872.

Omland, O. Exposure and respiratory health in farming in temperate zones—a review of the literature. *Ann Agric Environ Med*. 2002;9:119–136.

Pantic, S.; Skodric, S.R.; Zlatibor, L.; Pantic, I. Neurotoxicity, nephrotoxicity, and hepatotoxicity of copper-based nanoparticles: potential implications in molecular medicine and neurosciences. *Rev Adv Mater Sci*. 2019;58:201-205

Peres, F.; Moreira, J.C.; Rodrigues, K.M.; Claudio, L. Risk perception and communication regarding pesticide use in rural work: a case study in Rio de Janeiro State, Brazil. *Int J Occup Environ Health*. 2006;12:400-407.

Quinteros, E.; Ribó, A.; Mejía, R.; López, A.; Belteton, W.; Comandari, A.; Orantes, C.M.; Pleites, E.B.; Hernández, C.E.; López, D.L. Heavy metals and pesticide exposure from agricultural activities and former agrochemical factory in a Salvadoran rural community. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24:1662-1676.

Sevcikova, M.; Modra, H.; Slaninova, A.; Svobodova, Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review, *Vet. Med. (Praha)*. 2011;56:537–546.

Weyde, K.V.F.; Olsen, A.K.; Duale, N.; Kamstra, J.H.; Skogheim, T.S.; Caspersen, I.H.; Engel, S.M.; Biele, G.; Xia, Y.; Meltzer, H.M.; Aase, H.; Villanger, G.D. Gestational blood levels of toxic metal and essential element mixtures and associations with global DNA methylation in pregnant women and their infants. *Sci. Total Environ*. 2021;787,147621.

WHO. World Health Organization in collaboration with UNEP: public health impact of pesticides used in agriculture. WHO Geneva, Switzerland 1990

Zakeri, N.; Kelishadi, M.R.; Asbaghi, O.; Naeini, F.; Afsharfard, M.; Mirzadeh, E.; Naserizadeh, S.K. Selenium supplementation and oxidative stress: a review, *PharmaNutrition* 2021;17:100263.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	13/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 13/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHhk289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha expuesto en el capítulo anterior, podríamos decir que los contaminantes ambientales son una seria amenaza para la salud humana, siendo un problema crítico de salud pública que necesita la implementación de medidas de protección, prevención e información. Atendiendo a lo descrito en la introducción, y partiendo de la hipótesis de que la exposición a plaguicidas es peligrosa para la salud de las personas, tanto en su uso directo, como en la exposición indirecta, hemos querido realizar un estudio de investigación en los hombres que se dedican a la recolección de aceituna, por los siguientes motivos:

- i. Porque en la recolección no se tiene la noción de peligrosidad de los plaguicidas aplicados anteriormente. Cuando se recoge, sí se tiene en cuenta el tiempo de espera indicado por el fabricante, pero no se tiene en cuenta el producto químico que se pudiera desprender en la recolección.
- ii. Porque de acuerdo con el punto anterior, de manera general no se utilizan equipos de protección individual, como si se estuvieran aplicando biocidas.
- iii. Porque en España existen muy pocos estudios epidemiológicos que investiguen la exposición laboral a plaguicidas de manera indirecta, y, los que existen, están centrados en trabajadores de invernaderos en Almería, expuestos durante los períodos de aplicación (García García et al., 2016; Lozano-Paniagua et al., 2018).
- iv. Porque uno de los pocos publicados (ANEXO I), lo ha llevado a cabo nuestro equipo de investigación con resultados donde se detectó daño renal temprano y alteración en los parámetros de estrés oxidativo en una población de mujeres recolectoras de la misma zona agrícola.
- v. Para intentar ayudar a los profesionales de la salud a detectar mejor a los pacientes en riesgo de sufrir algunas de estas patologías y poder prevenir y/o limitar los factores agravantes y tratarlos lo antes posible

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	14/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 14/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Hipótesis

Nuestra hipótesis parte del hecho constatado acerca de la persistencia del cobre en la naturaleza y del uso generalizado y habitual de fungicidas a base de cobre para el tratamiento de una de las enfermedades más extendidas del olivo a lo largo de nuestra comunidad autónoma como es el repilo del olivo. Es por ello, que creemos que el agricultor encargado de la recolección de la aceituna entra en contacto con niveles trazas de Cu, de forma continuada durante la campaña de recogida lo que podría llevar asociado efectos sobre su salud, que a largo plazo podría causar una enfermedad profesional.

Objetivos

Es por ello, que el objetivo principal de este proyecto es la detección de biomarcadores de exposición y/o efecto y la detección de los niveles de Cobre (Cu), en muestras de sangre y orina procedentes de agricultores durante la campaña de recogida de la aceituna. Llevaremos a cabo la determinación de biomarcadores de exposición que NO se encuentran marcados por los protocolos de Vigilancia de la Salud para el trabajador agrícola como son los marcadores de daño renal temprano y estrés oxidativo. Estos biomarcadores podrían usarse para el control preventivo de las posibles patologías asociadas con la exposición indirecta a cobre, poco estudiado hasta el momento, en una población muy poco considerada hasta ahora.

Objetivos Operativos

1. Monitorización de los niveles de cobre en muestras de sangre mediante ICP-MS, previa digestión de la muestra.
2. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), y antioxidantes totales y de los marcadores de estrés oxidativo, peroxidación lipídica (MDA) y carbonilos en las muestras de sangre.
3. Estudio de biomarcadores de daño renal (proteinuria) y de daño renal temprano (N-acetil-D-glucosaminidasa, lipolina asociada a gelatinasa neutrofílica y proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 7) en muestras de orina.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	15/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 15/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Población de estudio

El presente estudio se centró en una cohorte de agricultores expuestos de manera indirecta a fungicidas a base de cobre durante la cosecha de aceitunas en las regiones productoras de aceite de oliva de Estepa (n=41). Se utilizó otra cohorte con características similares, excepto por el tipo de actividad profesional, como grupo de control clasificado como grupo no expuesto ocupacionalmente (NOE) (n=32). Se llevó a cabo en la zona de Estepa (Sevilla, España). con el 70% de su superficie cubierta por olivares; este sector genera en la región 225 millones de euros al año y marca un hito en los esfuerzos por impulsar el desarrollo social y económico, situando la región a la altura de los estándares nacionales y europeos. La región productora de aceite de oliva de Estepa presenta características demográficas específicas relevantes para este estudio (Figura 1). La población está compuesta principalmente por individuos dedicados a actividades agrícolas, especialmente al cultivo de aceitunas. La región se caracteriza por una mezcla de explotaciones agrícolas pequeñas y medianas, con una notable concentración de fincas dedicadas al cultivo tradicional de aceitunas.

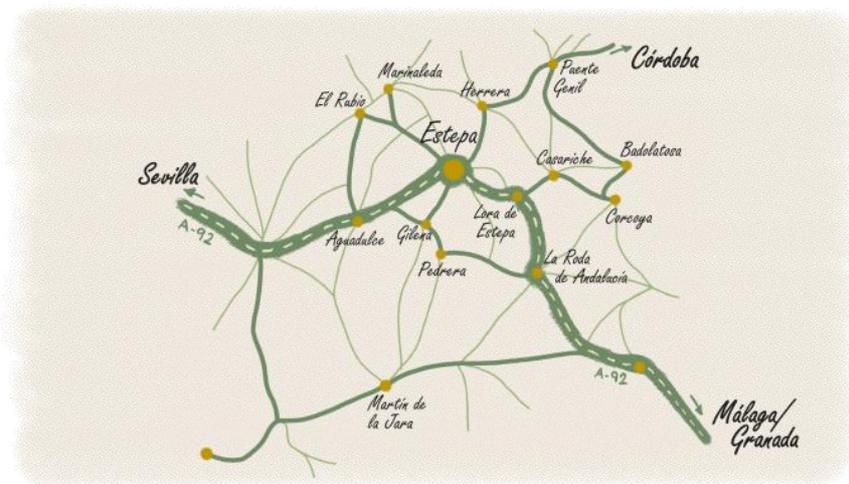


Figura 1. Mapa de la Denominación de origen de Estepa (región Estepa, Sevilla), tomado de <https://www.doestepa.com/denominacion-de-origen-prottegida-estepa/consejo-regulador/>

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	16/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 16/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

La edad promedio de la población se encuentra en el rango de 18 a 55 años, alineándose con el grupo de edad objetivo para la inclusión de participantes en este estudio. Los residentes de la región de Estepa suelen mantener una residencia estable durante períodos prolongados, contribuyendo a la homogeneidad de la muestra del estudio. Estos aspectos demográficos contribuyen colectivamente a la idoneidad de la región de Estepa para investigar los posibles impactos en la salud de la exposición indirecta a fungicidas a base de cobre entre los agricultores de aceitunas. La captación tuvo lugar durante la temporada de cosecha (septiembre-octubre), coincidiendo con las consultas de vigilancia de la salud. Durante estas consultas, se informó detalladamente a los trabajadores sobre los objetivos del estudio y se les solicitó que proporcionaran su consentimiento informado (ANEXO II) para participar. En cuanto al grupo de control, la aleatorización se determinó mediante la entrada de los participantes en consultas médicas de vigilancia de la salud. Los criterios de inclusión incluyeron hombres, agricultores (y no agricultores para el grupo de control), de 18 a 65 años de edad y residentes en el área de referencia durante al menos los últimos 2 años. Se excluyó del estudio a los trabajadores con enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión o cualquier tipo de insuficiencia renal o hepática, ya que estas condiciones podrían alterar potencialmente los niveles normales de biomarcadores considerados en este estudio. Esta exclusión tenía como objetivo minimizar los factores de confusión en los resultados. El rango de edad elegido se justifica para maximizar la homogeneidad de la muestra, permitiendo la obtención de un tamaño de muestra adecuado para resultados estadísticamente representativos.

Otro criterio de exclusión fue no residir en el área de referencia de las poblaciones cubiertas en la región de Estepa durante la duración del estudio. Se obtuvo la aprobación ética del Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Sevilla (código: 0984-N-22.junio 2022) y se cumplió con la Declaración de Helsinki para la Investigación en Salud Internacional. También se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes después de informarles sobre los objetivos del estudio y el derecho a retirarse en cualquier momento.

En el momento de la entrevista inicial y toma de muestras (Figura 2). se llevó a cabo una encuesta epidemiológica sobre la salud general de los trabajadores (Anexo III). Esta encuesta fue desarrollada por el equipo de investigación.

En la encuesta se recogen características epidemiológicas generales sobre cada uno de los participantes, desde lugar de procedencia y residencia, hasta problemas de salud, pasando por hábitos alimenticios y datos laborales que pudieran tener relevancia en el estudio.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	17/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 17/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			



Figura 2. Momento de la entrevista y relleno del cuestionario epidemiológico de los participantes



Figura 3. Momento de la toma de muestras

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	18/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 18/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

4.2. Recolección y procesamiento de muestras

Se recogieron muestras de sangre (≈20 mL) en tubos de colección al vacío con EDTA (Vacutainer®) y tubos de separación de gel de suero (Vacutainer®) y se colocaron en una nevera para su transporte al laboratorio. A su llegada, las muestras se procesaron de inmediato para evitar contaminación y hemólisis (Figura 2). Uno de los tubos con EDTA se utilizó para aislar el plasma mediante el método establecido por la Red Nacional de Bancos de Tejidos de España, según se describe en Dahiri et al., (2023). El plasma obtenido se transfirió a varios tubos de 1.5 mL y se almacenó a -80 °C hasta que se realizaron las mediciones. El tubo de separación de gel se utilizó para aislar el suero siguiendo el procedimiento descrito anteriormente por Dahiri et al., (2023). Estas muestras de suero solo se utilizaron cuando no estaba disponible el plasma para las mediciones. Las muestras de sangre entera se utilizaron para las mediciones de metales. Las muestras de orina (≈125 mL) se transportaron refrigeradas (4 °C) al laboratorio, donde se submuestrearon y almacenaron a -80 °C antes del análisis.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	19/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 19/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			



Figura 4. Fotos de la técnico contratada a cargo del proyecto procesando las muestras en el una vez llegadas al laboratorio.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	20/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 20/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHhk289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

4.3. Evaluación de la peroxidación lipídica mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA)

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 alícuotas de 2mL, en tubos eppendorf. Todas las muestras fueron conservadas en un congelador a -78°C hasta su utilización.

La evaluación de la peroxidación lipídica se llevó a cabo mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA), uno de los productos finales resultantes de un ataque oxidativo a los lípidos poliinsaturados y la razón por la cual el MDA se elige habitualmente como marcador de la peroxidación lipídica. Para este fin, se utilizó un Kit de Ensayo de Peroxidación Lipídica (MDA) (Cat. MAK085, Sigma-Aldrich®), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La reacción se realizó en una placa de 96 pocillos para análisis y la absorbancia a 532 nm se midió mediante espectrofotometría. Las unidades de medida para los valores de MDA son nanomoles de MDA por mililitro de suero.

4.4. Evaluación de la oxidación proteica mediante la cuantificación de grupos carbonilo

La oxidación proteica se estudió mediante la cuantificación de grupos carbonilo, siguiendo el protocolo indicado por Stadtman y Levine (2000). En resumen, la técnica se basa en la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y los grupos carbonilo presentes en la muestra en caso de oxidación proteica. Como resultado, se obtiene 2,4-dinitrofenilhidrazona, un producto coloreado. Los valores se expresaron en moles de grupos carbonilo por miligramo de proteína.

4.5 Evaluación de la Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD)

Para la evaluación de la SOD, se utilizó un Kit de Ensayo de Superóxido Dismutasa (Cat. 706002, Cayman®), y el ensayo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento del fabricante. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, y la absorbancia se leyó a 440-460 nm utilizando un lector de placas, expresándose en U por mL de suero.

4.6. Evaluación de la Actividad de la Catalasa (CAT)

Para evaluar la CAT, se seleccionó un Kit de Ensayo de Catalasa (Cat.707002, Cayman®), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la reacción de peroxidación de

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	21/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 21/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



la enzima catalasa con metanol en presencia de H₂O₂, lo que produce formaldehído, que se puede medir colorimétricamente utilizando el cromógeno 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald), generando un color púrpura. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos para el análisis, y la absorbancia se leyó en un lector de placas a 540 nm. Las unidades se expresan en nmol/min por mL de muestra.

4.7. Cuantificación de la Concentración Total de Antioxidantes

Los antioxidantes totales se cuantificaron utilizando el Kit de Ensayo de Antioxidantes (Cat. 709001, Cayman®) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes que se supone están presentes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS® (2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) a ABTS®+ por metamioglobina. La absorbancia se leyó a 750 nm o 450 nm en un lector de placas en mM.

4.8. Determinación de Metales

Se evaluaron las concentraciones de cobre (Cu), manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn) en muestras de sangre completa recogidas en tubos heparinizados. La digestión de la sangre se llevó a cabo utilizando el sistema Multiwave 3000 de Anton Paar. Los límites de detección se determinaron evaluando la concentración de cada elemento, correspondiente a una señal tres veces la desviación estándar de una serie de diez mediciones de la solución en blanco en el pico del elemento. Los límites de detección promedio en sangre fueron de 0.51 ng/mL para Cu, 0.21 ng/mL para Mn, 0.19 ng/mL para Se y 5.46 ng/mL para Zn.

Antes de la digestión completa, las muestras fueron sometidas a predigestión en presencia de HNO₃ y posteriormente incubadas con la adición de H₂O₂. El programa de digestión comprendió una rampa de potencia inicial de 0 a 800 W durante 10 minutos, seguida de una etapa continua de potencia a 800 W durante 20 minutos y una etapa final de enfriamiento de 15 minutos, durante la cual no se aplicó potencia. Se añadió agua y HNO₃ a las muestras para facilitar la digestión, y todas las muestras medidas se prepararon por triplicado.

Las mediciones espectrométricas de plasma acoplado inductivamente se realizaron utilizando un ICP-MS Agilent 7500c (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con un autosampler integrado y un sistema de reacción de octópodo (ORS). El ORS fue presurizado con helio en modo de colisión para la determinación de Mn, y argón en modo estándar para la determinación del resto. Se utilizaron conos estándar para muestreo y skimmer de Ni (diámetros internos de 1.0 y 0.7 mm, respectivamente). La introducción de la muestra se realizó con un nebulizador Babington PEEK (poliéter-éter-cetona) combinado con una cámara

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	22/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 22/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



de pulverización doble de tipo Scott de cuarzo (Agilent Technologies, Tokio, Japón). La cámara de pulverización se mantuvo fría con agua a 2 °C para garantizar la estabilidad de la temperatura y reducir la entrada de vapores en la antorcha. La antorcha ICP consta de un conjunto de tres cilindros, con un diámetro de inyector de 2.5 mm. Se utilizó durante todo el análisis la antorcha Shield. Todos los parámetros instrumentales se optimizaron diariamente mientras se aspiraba la solución de ajuste.

4.9. Evaluación de Biomarcadores de Daño Renal

La evaluación de biomarcadores de daño renal se centró en analizar diversos indicadores relacionados con la función renal y se llevó a cabo en colaboración con la Universidad de Salamanca. La proteinuria fue medida mediante el ensayo de Bradford (1976). Específicamente, se examinaron los siguientes biomarcadores:

4.9.1. N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAG)

La actividad de NAG, una enzima asociada con el daño tubular, se midió utilizando kits disponibles comercialmente [“N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) assay kit”, Diazyme, Poway, CA, USA], siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9.2. Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL)

Los niveles de NGAL, reconocidos como un marcador sensible para lesiones renales tempranas, se cuantificaron utilizando kits dedicados (“Human NGAL ELISA Kit 036CE”, BioPorto Diagnostics, Hellerup, Denmark), según los protocolos especificados por el fabricante.

4.9.3. Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 7 (IGFBP7)

La concentración de IGFBP7, otro biomarcador valioso indicativo de estrés tubular y posibles daños en el riñón, se determinó utilizando kits de ensayo establecidos según las pautas del fabricante.

Estos biomarcadores fueron seleccionados para proporcionar una comprensión integral de los posibles efectos renales resultantes de la exposición indirecta a fungicidas a base de cobre durante la cosecha de aceitunas.

4.10. Análisis Estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos para determinar posibles diferencias significativas entre los grupos expuestos y de control en cuanto a biomarcadores de estrés oxidativo, renales y

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	23/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 23/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



niveles de metales. Se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas, según corresponda, con un nivel de significancia establecido en $p < 0.05$.

4.11 Análisis de Correlación

Se realizaron análisis de correlación para explorar posibles asociaciones entre biomarcadores renales, parámetros urinarios y las concentraciones de metales detectados en muestras de sangre. Estos análisis buscaron dilucidar posibles interdependencias entre indicadores de salud renal y la exposición a cobre, manganeso, selenio y zinc.

Este enfoque integral para evaluar la salud renal tuvo como objetivo mejorar nuestra comprensión de los posibles impactos de la exposición indirecta a plaguicidas en la función renal, proporcionando valiosas perspectivas sobre las implicaciones de salud más amplias para las personas que trabajan en la industria de la cosecha de aceitunas.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	24/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 24/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

5. RESULTADOS

5.1 Población de estudio

Las características generales de los 73 participantes incluidos se detallan en la Tabla 1. Evaluamos a 41 agricultores varones dedicados a la recolección de aceitunas en comparación con el grupo NOE, que consta de 32 varones que residen en la misma zona geográfica, pero no están involucrados en actividades agrícolas. La edad media de los agricultores (n=41) fue de 43.82 (± 11.11) años, con un rango de 27 a 62 años, y para el grupo NOE fue de 44.29 (± 10.70) años, con un rango de 23 a 60 años. La mayoría de los agricultores han trabajado en el campo durante más de una década (66.67%). Estos agricultores no solo participan en la recolección de aceitunas, sino que también se dedican regularmente a la recolección de diversos cultivos a lo largo del año.

La mayoría de los participantes en ambos grupos carecen de educación superior (estudios universitarios), siendo la educación primaria el nivel predominante para los agricultores y la educación secundaria para el grupo NOE. En cuanto a los hábitos de tabaquismo, ambos grupos mostraron resultados similares, con aproximadamente el 60% de los participantes fumadores.

El estado de salud se evaluó en base a los síntomas autoinformados obtenidos del cuestionario epidemiológico. Varios síntomas neurológicos, como dolor de cabeza (12%) y mareos (12%), fueron descritos por los agricultores, aunque la mayoría (74%) no declaró ninguna enfermedad. Síntomas similares se informaron en el grupo NOE, donde el 57% de los participantes informaron alguna forma de enfermedad, siendo el dolor de cabeza (34%), los mareos (14%) y la alteración del sueño (11%) los más comúnmente descritos.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	25/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 25/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Tabla 1. Datos sociodemográficos de ambos grupos (agricultores y expuestos no ocupacionalmente (NOE)). EPP: equipo de protección personal.

Variables	Farmers (n=41)	NOE (n=32)	p value
Age (years)	43.82±11.11	44.29±10.70	0.8703
Years school (%)			
primary (6-12 years old)	54	29	
secondary (12-16 years old)	27	49	
Other	19	23	
Years worked in field (%)			
< 5	7.4	-	
5-10	25.92	-	
> 10	66.67	-	
PPE (%)			
Yes (mask + gloves)	82		
No	18		
Smoking habits (%)			
Non-smokers	55.56	60.00	
Smokers	44.44	40.00	

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	26/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 26/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

5.2 Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, actividades enzimáticas, antioxidantes totales.

Se evidencia un escenario recurrente en la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos NOE y agricultores. Sin embargo, se observó una tendencia sutil hacia una situación de estrés oxidativo más alta en los agricultores en comparación con el grupo control. En cuanto a la oxidación de lípidos, cuantificada por los niveles de TBARS (nmol/mL), los valores medios encontrados fueron 171.89 (± 108.01) y 142.48 (± 117.85) para agricultores y NOE, respectivamente (Figura 5A). Sobre la concentración de grupos carbonilo como nmol/mg prot, como marcador de oxidación de proteínas, los valores medios fueron $8.58 \cdot 10^{-6} \pm 2.07 \cdot 10^{-6}$ y $8.99 \cdot 10^{-6} \pm 3.13 \cdot 10^{-6}$ para los grupos de agricultores y NOE, respectivamente (Figura 5B). No se identificaron diferencias significativas entre los grupos en ambos parámetros. Para los niveles de actividad de catalasa (Figura 6A), se observaron valores medianos visualmente diferentes en los agricultores y los grupos NOE (47.92 \pm 26.52 y 41.66 \pm 25.24 nmol/min/mL, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. En cuanto a la actividad de SOD (Figura 6B), se midieron valores comparables en ambos grupos estudiados. No obstante, se detectó un valor ligeramente más alto en el grupo de agricultores (2.66 \pm 0.68 vs 2.38 \pm 0.62 U/mL). Sobre los niveles de antioxidantes totales medidos en muestras de sangre en ambos grupos, aunque no se identificaron diferencias significativas, la Figura 7 ilustra niveles medios notablemente más bajos en los agricultores en comparación con los participantes NOE (4.54 \pm 1.50 vs 6.37 \pm 1.60 mM). Esto indica una reducción en la capacidad antioxidante del 29% en el grupo de agricultores.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	27/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 27/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

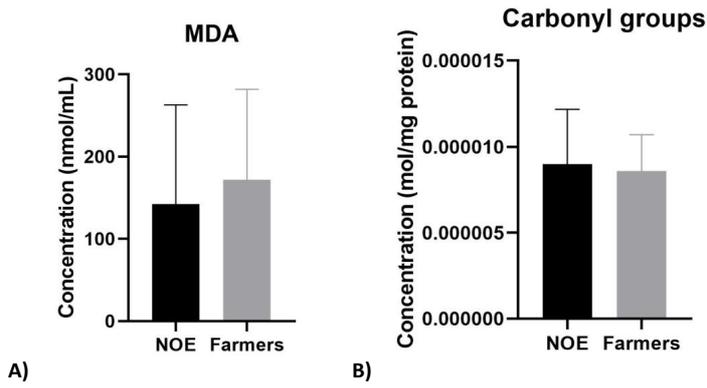


Figura 5. Niveles de MDA (nmol/mL) y grupos carbonilos (nmol/mg proteínas) como biomarcadores de estrés oxidativo en los dos grupos de estudio

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	28/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 28/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

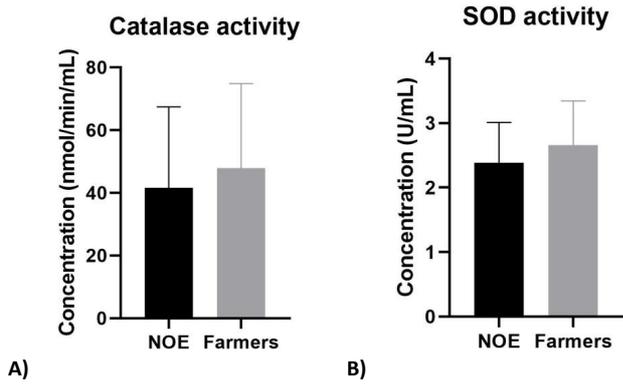


Figura 6. Niveles de actividad enzimática de Catalasa (nmol/min/mL) y Superóxido dismutasa (U/mL) en ambos grupos de estudio

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	29/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 29/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

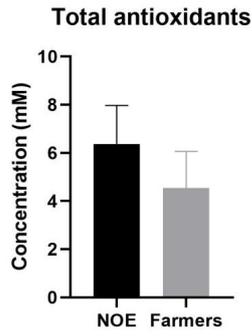


Figura 7. Niveles de antioxidantes totales (mM) de ambos grupos de estudio

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	30/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 30/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

5.3 Evaluación de los niveles de Cu y otros metales relevantes para el estudio

En relación con los niveles de metales, los cuatro metales medidos en las muestras de sangre del grupo de agricultores fueron significativamente más bajos que los encontrados en el grupo NOE (Tabla 2). Específicamente, Cu, Mn y Zn en el grupo NOE exhibieron niveles extremadamente más altos en comparación con los agricultores. El nivel medio de Cu en los agricultores fue de 757.86 (± 174.67) ng/g, representando una disminución de 1.15 veces en comparación con el valor medio detectado en el grupo NOE (875.00 ± 92.34 ng/g). La concentración media de Mn fue 1.3 veces menor en los agricultores que en el grupo NOE, con valores medios de 28.07 (± 6.30) ng/g y 34.24 (± 8.55) ng/g, respectivamente. De manera similar, los valores de Zn en el grupo NOE fueron 1.2 veces más altos que en el grupo de agricultores, con valores medios de 6653.18 (± 732.86) ng/g y 5551.72 (± 1196.10), respectivamente. Los niveles de Se en el grupo NOE fueron significativamente más altos en comparación con los agricultores, con valores de 127.25 (± 17.37) ng/g y 115.93 (± 18.04) ng/g, respectivamente.

Tabla 2. Valores de Cu, Mn, Se y Zn encontrados en las muestras de sangre en ambos grupos estudiados.

		Cu (ng/g)	Mn (ng/g)	Se (ng/g)	Zn (ng/g)
Farmers	Mean \pm SD	757.86 \pm 174.67	28.07 \pm 6.30	115.93 \pm 18.04	5551.72 \pm 1196.10
	Min	519.00	19.10	86.60	4080.00
	Median	750.00	27.10	115.00	5230.00
	Max	1230.02	50.00	143.00	9800.00
NOE	Mean \pm SD	875.00 \pm 92.34	34.24 \pm 8.55	127.25 \pm 17.37	6653.18 \pm 732.86
	Min	740.00	22.00	100.00	5000.00
	Median	855.00	34.20	126.00	6700.00
	Max	1130.21	66.12	164.20	8100.00
P value		0.0010	0.0007	0.0086	< 0.0001

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ		
	ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	31/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 31/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



5.4 Evaluación de biomarcadores de daño renal temprano

Como se observa en la Figura 4 la proteinuria y la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) no presentan diferencias en su excreción entre ambos grupos (agrícolas y controles). Sin embargo, como se observa en la Figura 5, la excreción de lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), que es un biomarcador de daño renal temprano, es estadísticamente superior en los agricultores; y lo es más aún la excreción de proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), el cual está resultando uno de los biomarcadores de daño renal temprano que más estudiado últimamente; y que está proporcionando capacidades predictivas diagnósticas muy buenas y muy sensibles.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	32/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 32/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

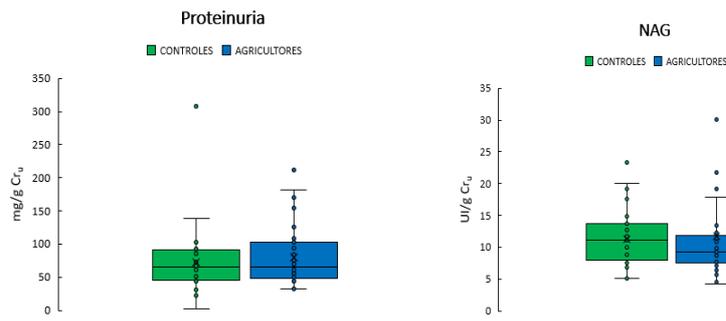


Figura 4. Niveles de proteinuria (mg/g Cr_u) y N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) (UI/g Cr_u) en ambos grupos de estudio

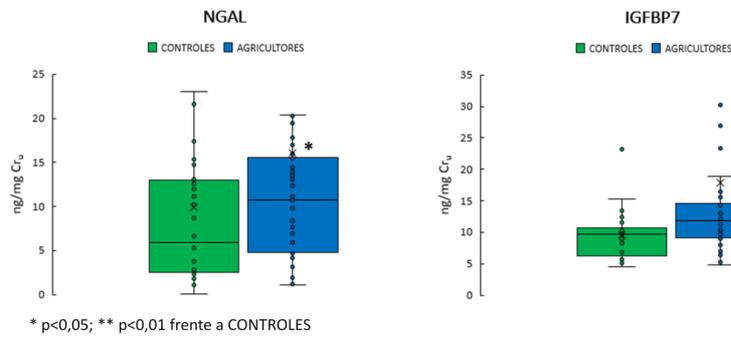


Figura 5. Niveles de lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (ng/g Cr_u) y de proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7) (ng/g Cr_u), en ambos grupos de estudio.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	33/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 33/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHJK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo presentan una interesante perspectiva sobre la posible influencia de la exposición laboral a plaguicidas, específicamente en agricultores dedicados a la recolección de aceitunas. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos NOE y los agricultores en varios parámetros evaluados, se identifican tendencias que sugieren una respuesta biológica sutil pero potencialmente relevante al estrés oxidativo en el grupo de agricultores.

En primer lugar, los niveles de TBARS, indicadores de oxidación lipídica, exhibieron una ligera elevación en los agricultores en comparación con el grupo NOE, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística. Esta tendencia podría indicar una mayor exposición al estrés oxidativo en los agricultores, posiblemente atribuible a la naturaleza de su trabajo, que implica la manipulación frecuente de plaguicidas.

La cuantificación de grupos carbonilo como marcador de oxidación de proteínas no reveló diferencias significativas entre los grupos, pero los valores, aunque similares, presentaron una ligera disminución en los agricultores. Este hallazgo podría sugerir una respuesta celular a la exposición crónica a pesticidas, incluso si no se refleja en diferencias estadísticas significativas.

La actividad de catalasa, una enzima clave en la eliminación de peróxidos, mostró una variación visualmente diferente entre los grupos, con valores ligeramente más altos en los agricultores. Aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, podría indicar una mayor demanda de sistemas antioxidantes en respuesta a la exposición crónica a plaguicidas.

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) también exhibió una tendencia a ser ligeramente más alta en los agricultores. Aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística, este patrón podría sugerir una adaptación fisiológica para contrarrestar la posible acumulación de especies reactivas de oxígeno.

Los niveles de antioxidantes totales en sangre fueron significativamente más bajos en los agricultores en comparación con el grupo NOE, indicando una disminución del 29% en la capacidad antioxidante del grupo de agricultores. Esta reducción podría ser indicativa de un desequilibrio en los sistemas antioxidantes, posiblemente agotados por la exposición crónica a plaguicidas.

En conjunto, aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística, las tendencias observadas en los biomarcadores sugieren la necesidad de una vigilancia continua y más

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	34/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 34/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

detallada de la salud de los agricultores expuestos a plaguicidas. La posible exposición al estrés oxidativo y la reducción en la capacidad antioxidante plantean interrogantes sobre los riesgos a largo plazo para la salud de esta población laboral específica, destacando la importancia de estrategias preventivas y protocolos de salud ocupacional.

La evaluación de los niveles de metales en las muestras sanguíneas revela diferencias significativas entre los grupos de agricultores y NOE, proporcionando información valiosa sobre la exposición potencial a estos elementos en ambos grupos.

En particular, los niveles de cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en los agricultores fueron significativamente más bajos en comparación con el grupo NOE. Además, el selenio (Se) mostró niveles significativamente más altos en el grupo NOE en comparación con los agricultores.

Estas diferencias en los niveles de metales sugieren una potencial variación en la exposición ambiental entre los dos grupos. Es crucial considerar estas discrepancias en la exposición a metales al interpretar los resultados y al diseñar estrategias de gestión ambiental y de salud ocupacional para proteger la salud de la población agrícola. Estudios más detallados sobre las prácticas agrícolas específicas y la utilización de plaguicidas pueden aportar claridad sobre los factores que contribuyen a estas variaciones en los niveles de metales entre los grupos.

La variación en los niveles de metales entre los grupos de agricultores y NOE, como se discutió anteriormente, puede tener implicaciones importantes en la evaluación global de la salud de ambos grupos. Mientras que los biomarcadores de estrés oxidativo no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos, la disminución de los niveles de metales en los agricultores podría influir en los procesos fisiológicos asociados con el estrés oxidativo y la capacidad antioxidante.

Se observó una tendencia hacia una situación de estrés oxidativo más elevada en los agricultores, a pesar de que los biomarcadores específicos no alcanzaron significancia estadística. La relación entre la exposición a metales y el estrés oxidativo ha sido objeto de investigación, y la disminución de los niveles de metales antioxidantes, como el zinc y el cobre, podría contribuir a un desequilibrio en la capacidad antioxidante celular.

Los resultados también revelaron una reducción significativa en la capacidad antioxidante total en el grupo de agricultores. Este hallazgo puede estar vinculado a la disminución de los niveles de metales antioxidantes, lo que sugiere una posible correlación entre la exposición a

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	35/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 35/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

plaguicidas, la disminución de la capacidad antioxidante y la tendencia hacia el estrés oxidativo en los agricultores.

La exposición crónica a plaguicidas, aunque no se refleje directamente en los biomarcadores de estrés oxidativo estudiados, podría estar contribuyendo a cambios sutiles en la capacidad antioxidante y la homeostasis metabólica. La relación compleja entre la exposición a plaguicidas y los marcadores de salud subyacentes requiere un análisis más detenido y estudios longitudinales para comprender completamente las implicaciones para la salud a largo plazo.

En este contexto, la relación inversa entre los niveles de metales y la exposición a plaguicidas en los agricultores destaca la necesidad de estrategias de protección y gestión ambiental en el sector agrícola. Estos hallazgos resaltan la importancia de abordar no solo la exposición directa a plaguicidas, sino también la posible interacción con metales en el diseño de medidas preventivas y políticas de salud ocupacional.

Por otro lado, la observación de que la proteinuria y la NAG no presentan diferencias significativas en su excreción entre los grupos agrícolas y los controles es un hallazgo interesante y sugiere que, a pesar de la exposición crónica a plaguicidas, estos biomarcadores específicos de daño renal inicial no están alterados de manera significativa en los agricultores. Sin embargo, la alteración significativa de la excreción de NGAL y del IGBP7 en el grupo de agrícolas, ambos biomarcador de daño renal temprano indica que, a pesar de la ausencia de cambios en la proteinuria y la NAG, hay evidencia de daño renal temprano en los agricultores expuestos a plaguicidas.

La elevada excreción de NGAL y IGBP7 en el grupo de agricultores podría ser indicativa de lesiones en las células tubulares renales, ya que estos biomarcadores son específicos de la lesión tubular. La capacidad de estos biomarcadores para proporcionar capacidades predictivas diagnósticas muy buenas y sensibles destaca su utilidad potencial en la detección temprana de daño renal en poblaciones expuestas a plaguicidas.

La interacción compleja entre la exposición a plaguicidas, el estrés oxidativo y el daño renal temprano resalta la importancia de un enfoque integral en la evaluación de la salud de los agricultores. La combinación de biomarcadores de estrés oxidativo y daño renal proporciona una imagen más completa de los posibles efectos adversos de la exposición crónica a estos compuestos en la salud renal. Estos resultados subrayan la necesidad de estrategias preventivas y de monitorización continuo para proteger la salud renal de los trabajadores

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	36/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 36/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



agrícolas y resaltan la importancia de futuras investigaciones que exploren más a fondo los mecanismos subyacentes y las implicaciones clínicas de estos hallazgos.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	37/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 37/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

7. CONCLUSIONES

El objetivo del presente estudio ha sido la determinación de la posible exposición indirecta a pesticidas, en concreto a un fungicida a base de cobre, y la posible relación de esta exposición laboral a pesticidas con posibles alteraciones en parámetros bioquímicos, tales como los biomarcadores de estrés oxidativo y los de daño renal temprano y con niveles de metales relacionados con el estrés oxidativo por su función antioxidante. Para ello medimos los niveles de Cu por el doble interés que para el estudio supone, observándose que no sólo no hay niveles más elevados en sangre en los trabajadores expuesto a las trazas que puedan quedar en las hojas de sulfato de Cu, sino que se observan niveles significativamente más elevados en la población del grupo control. Esto mismo se observa en el resto de los metales estudiados (Mn, Se y Zn) todos ellos con una función antioxidante reconocida, lo que podría explicarse por una alta demanda de estos metales para compensar la posible situación de estrés oxidativo provocada por la exposición indirecta de forma crónica de estos trabajadores a plaguicidas. El estrés oxidativo se considera uno de los principales mecanismos de acción de patologías humanas inducidas por plaguicidas. En el presente trabajo, se observa una tendencia al alza de la oxidación lipídica y proteica, además de un ligero aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT y una disminución de los antioxidantes totales. Estos resultados justificarían por tanto los niveles detectados de los metales estudiados.

En las últimas décadas se han desarrollado biomarcadores de daño renal incluso a nivel subclínico. Estos biomarcadores (NAG, NGAL, IGFBP7) han demostrado ser útiles en el diagnóstico temprano del daño renal, incluso dando información acerca del tipo y progresión del daño. Se ha demostrado que son metabolitos que aparecen en la orina como resultado del daño estructural del riñón. Los biomarcadores estudiados en el presente trabajo nos dan información del daño tubular subclínico, pudiendo este daño progresar a una patología crónica renal. De hecho, la patología crónica renal de origen desconocido se ha convertido en una epidemia cuyas causas no se han podido identificar, pero se cree que puede estar influenciada por factores medioambientales, tales como la exposición a pesticidas.

Por lo tanto, en resumen, podemos concluir que en el presente estudio se demuestra el daño tubular subclínico en una población de agricultores de la provincia de Sevilla, que podría progresar a una patología renal crónica. Además, se observa una activación de la defensa antioxidante y un incipiente estado de estrés oxidativo. En vista de los resultados obtenidos en este estudio y teniendo en cuenta que los agricultores están expuestos a otro tipo de plaguicidas más allá de los organofosforados y carbamatos, sería conveniente implementar

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	38/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 38/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FFHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

nuevos biomarcadores para asegurar el correcto seguimiento de la salud de estos trabajadores, considerados población vulnerable.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	39/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 39/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

8. TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

La transferencia de los resultados hacia la comunidad científica se ha llevado a cabo a través de la asistencia a congresos científicos nacionales e internacionales.

1. Así se ha participado en el Congreso Internacional de la Sociedad Europea de Toxicología Ambiental y Química (SETAC), celebrado en Dublín (Irlanda) del 30 de abril al 4 de mayo de 2023 (Se adjuntan posters y certificado de asistencia)

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	40/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 40/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			



MONITORING OF CUPPER LEVELS FROM BLOOD IN A POPULATION OF OLIVE FARMERS FROM SEVILLE (SPAIN).

J.R. Aguilera-Velázquez¹, C. Chamorro-López¹, J. Martín-Reina¹, R. Sánchez-Ruiz¹, Juan Bautista², I. Moreno¹

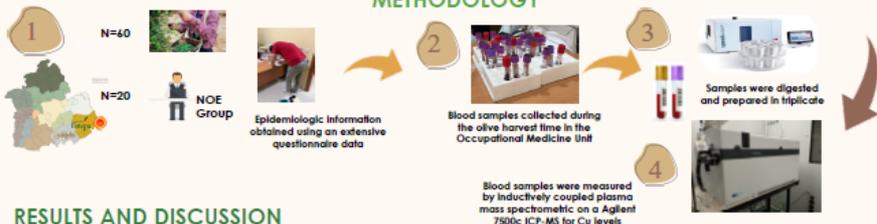
¹ Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain
² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain



INTRODUCTION

Cooper derivatives such as sulphate of copper have been commonly used in agriculture for disease control. In the case of olive, copper is the main pesticide authorized to control of "Repilo", a fungal infection, which causes great economic losses to the olive sector. Its long-term application lead to a copper accumulation in olive soils, together with the remaining traces accumulated in leaves, posing a risk worker health. Although copper is an essential trace element, its prolonged indirect exposition is associated with serious health problems such as neurodegenerative diseases, hepatic disorders, atherosclerosis, cardiovascular diseases or even renal disorders. Due to high temperatures in southern Andalusia, olive farmers are unable to wear personal protective equipment. In addition, these suspended particles containing copper could travel to nearby urban areas. The main objective of this study was to monitoring levels of copper in blood from a cohort of olive farmers from Sevilla (Spain).

METHODOLOGY



RESULTS AND DISCUSSION

We first examined both experimental groups in terms of their main demographical features (Table 1). No significant differences were observed between the exposed and non-occupational exposed (NOE) people in terms of age or smoking status. However, the groups contained different proportions in relation of years of schooling. Most of the farmers (66.67%) were working more than 10 years as olive farmers and they confirmed in a higher proportion (82%) the used of personal protective equipment. Levels of Cu in blood samples of farmers and NOE groups are showed in figure 1. The box and whisker plots depict the mean concentration range (in ng/g) of blood Cu in both groups. The average blood Cu level (757.84±174.67) of farmer was lower than the NOE group (875.00±92.34). The median values blood Cu level of both farmer group 750 (620; 847.5) and NOE group 855 (800; 932.5) varied significantly. These mean values are within reference values of Cu in healthy men (663-1327 ng/g).

Variables	Farmers (n=40)	NOE group (n=20)	p value
Age (years)	43.85±1.11	44.29±10.70	0.8703 n.s.
Years school (%)			
Primary school (6-12 years old)	54	29	
Secondary school (12-16 years old)	27	49	
Other	19	23	
Years worked in field (%)			
< 5	7.4	-	
5-10	25.92	-	
> 10	66.67	-	
Personal protective equipment			
Yes	49		
No	11		
Smoking status (%)			
Non-smokers	55.56	60	
Smokers	44.44	40	

CONCLUSIONS

This study showed significant differences in Cu levels in both groups studied, being higher in NOE than in farmers group, though in both cases levels were within the normal reference values in healthy men. These primary results will be completed in order to study the influence of the rural environment when comparing these two rural groups with a non-rural control group.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to all the participants in this study. This work was supported by the Instituto Andaluz de Prevención de Riesgos Laborales (CTC-2022140473)

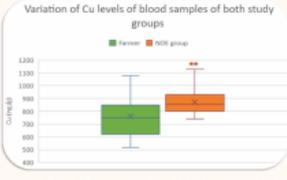


Figure 1. Variations in Cu concentration of blood samples of both study groups. Average blood Cu concentration are represented as mean ± SE. Median** values are represented as median (25th; 75th percentile) *p value < 0.01.

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	41/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I	12/12/2023 12:36	PÁGINA 41/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/





AFIT
ALIMENTOS
FUNCIONALES E
INVESTIGACIÓN
TOXICOLÓGICA
AGR 258

MONITORING OF HEAVY METALS LEVELS FROM BLOOD IN A RURAL POPULATION OF SEVILLA (SPAIN)



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

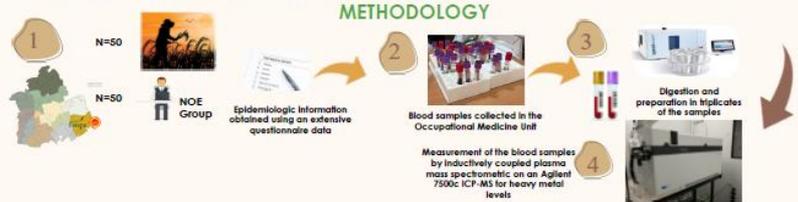
J.R. Aguilera-Velázquez¹, M. Hinojosa², J. Martín-Reina¹, P. Carbonero-Aguilar¹, Juan Bautista³, I. Moreno¹

¹ Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain
² Biophysics, Stockholm University, Sweden, Institutionen för biokemi och biophysik, 106 91 Stockholm
³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain

INTRODUCTION

Environmental pollution is a global problem today. The "One Health" concept, promoted by the EU, focuses on the interrelationship between environmental health, and human and animal health. Uncontrolled industrial activity, aggressive fertilization programs and even natural events such as fires or volcanoes release toxic substances into the environment, among them, heavy metals. The accumulation and transfer of these metals from soils, aquifers, or air to organisms cause serious damage to human and animal health. Metals such as Lead (Pb), Cadmium (Cd), Aluminium (Al) and Chromium (Cr) can cause serious health issues such as neurological disorders, liver problems, cardiovascular diseases, and even kidney complications. Very high concentrations of these metals are being detected in rural areas, which were considered "clean areas".
 The aim of this study was monitoring the concentration of Pb, Cd, Al and Cr in the blood of a cohort of agricultural and non-agricultural workers in the region of Estepa in the province of Sevilla, southern Andalusia.

METHODOLOGY



RESULTS AND DISCUSSION

We first examined both experimental groups in terms of their demographic data and personal habits (Table 1 and 2). No significant differences were observed between the exposed and non-occupational exposed (NOE) people in terms of age. In relation with the smoking status, it was observed a slightly difference between both groups, being the NOE group less smokers than the farmers. Most of the participants affirmed to eat meat, fish, and rice one or twice per week in a very similar proportion between groups. Levels of the metals studied in blood samples of farmers and NOE groups are showed in figure 1. The figure depict the mean concentration (in ng/g) of blood Al, Cd, Cr and Pb in both groups. The average blood Cr (27.0±11.6) and Cd (3.0±0.6) levels of NOE was significantly higher than the farmer group: 18.2±5.3 and 2.2±0.7, respectively. No significant differences were detected in the rest of metales studied in both groups. A wide ranges of all the metals studied were detected: Al range was 269-2090 and 360-1390 ng/g; Cd, ND-3.0 and ND-3.9 ng/g; Cr, 11.0-28.5 and 17.3-60.0 ng/g; Pb, 6.0-66.9 and 8.8-74 for farmers and NOE groups, respectively.

Variables	Farmers (n=50)	NOE group (n=50)	p value
Age (years)	41.88±12.29	44.61±10.50	0.8703 n.s.
Years school (%)			
Primary school (6-12 years old)	54	29	
Secondary school (12-16 years old)	25	55	
Other	21	16	
Smoking status (%)			
Non smokers	53	63	
Smokers	47	37	

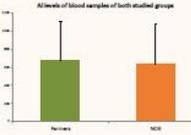
Variables	Farmers (n=50)		NOE group (n=50)		p value	
Dietary information (portion per week)	0	1-2	>2	0	1-2	>2
Meat consumption (%)	19.4	61.2	19.4	12.2	56.1	31.7
Fish consumption (%)	2.9	57.1	40	2.4	68.3	29.3
Rice consumption (%)	3	97	0	2.4	87.8	9.7

CONCLUSIONS

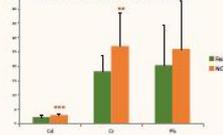
This study showed significant differences in Cd and Cr levels in both groups, being higher in NOE than in farmers, although in both cases the levels were within the normal reference values in healthy men. These preliminary results will be completed in order to study the influence of the rural environment when comparing these two rural groups with a non-rural control group.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to all the participants in this study. This work was supported by the Instituto Andaluz de Prevención de Riesgos Laborales (CTC-2022140473)



Al levels of blood samples of both studied groups



Metal levels of blood samples of both studied groups

Figure 1. Variations in metal concentrations of blood samples of both study groups. Average blood metal concentrations are represented as mean ± SE. **p value <0.01, ***p value <0.001.

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	42/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001	12/12/2023 12:36	PÁGINA 42/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/





4 May 2023

This letter is to verify that **Isabel Maria Navarro** (Universidad de Sevilla, Spain) participated at the SETAC Europe 33rd Annual Meeting in Dublin, Ireland from 30 April - 4 May 2023.

The following presentation was presented:

Presentation Type: Poster

Presentation Title: Monitoring of copper levels from blood in a population of olive farmers from Seville (Spain).

Session: Application of Biomonitoring Approaches to Support Surveillance of Chemical Exposure in the Environment

Authors: J.R.Aguilera-Velazquez, C.Chamorro-López, J.Martin-Reina, R.Sanchez-Ruiz, J.Bautista, I.M.M.Navarro

Bart Bosveld
SETAC Global Executive Director

SETAC Europe vzw | Avenue des Arts, 53-54, 1000 Brussels, Belgium | T +32 2 772 72 81 | setaceu@setac.org | RPR Brussel

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	43/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 43/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHhk289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	44/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 44/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

2. Además, se participó en las Jornadas FSTOXRISK 2023 celebrado en julio de 2023, donde acudieron además de la IP, las dos contratadas a cargo del presente proyecto para presentar los principales resultados hasta la fecha (Se adjuntan fotos de las presentaciones orales y certificado de asistencia de la IP y las dos contratadas).



Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	45/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 45/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



D. Julio Antonio Brito Santana con DNI 42812193Q, Director-Gerente de Fundación General de la Universidad de La Laguna.

HACE CONSTAR: Que según obra en los expedientes de la Fundación, D.ª Isabel María Moreno Navarro con DNI nº 28748803E, ha asistido a "1st Conference in food safety and toxic risks: impact of environmental contaminants on conventional and organic foods", desarrollado el 17/07/2023, con una duración total de 20 horas lectivas según programa adjunto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma en San Cristóbal de La Laguna, a la fecha del presente documento.

D. Julio Antonio Brito Santana

Apartado de correo 456. Universidad de La Laguna
35200 San Cristóbal de La Laguna
Santa Cruz de Tenerife, España
T: +34 922319200 F: +34 922319197 info@fg.ul.es
NIF G38083408. Inscrita en el Registro de Fundaciones Canarias con el nº15
www.fg.ul.es

Este documento ha sido firmado electrónicamente por:	
G38083408 Fundación General de la Universidad de La Laguna	19/07/2023 20:00:11
Autenticidad verificable en: https://sede.fg.ul.es/csv/16819F34-FB38-45AF-9A65-61E7FE02D69	
 	
15810F24-FB38-45AF-0A65-61E7FE02D69	
El presente documento ha sido descargado el 21/07/2023 16:51:45	Referencia: A23030051,0680594

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	46/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 46/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			



D. Julio Antonio Brito Santana con DNI 42812193Q, Director-Gerente de Fundación General de la Universidad de La Laguna.

HACE CONSTAR: Que según obra en los expedientes de la Fundación, D.ª Carmen Chamorro Lopez con DNI nº 15412028G, ha asistido a "1st Conference in food safety and toxic risks: impact of environmental contaminants on conventional and organic foods", desarrollado el 17/07/2023, con una duración total de 20 horas lectivas según programa adjunto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma en San Cristóbal de La Laguna, a la fecha del presente documento.

D. Julio Antonio Brito Santana

Apartado de correos 456. Universidad de La Laguna
 38200 San Cristóbal de La Laguna
 Santa Cruz de Tenerife, España
 T: +34 922319200 F: +34 922319197 info@fg.ulil.es
 NIF G38083406. Inscrita en el Registro de Fundaciones Canarias con el n°15
 www.fg.ulil.es

Este documento ha sido firmado electrónicamente por:	
G38083406 Fundación General de la Universidad de La Laguna	19/07/2023 20:00:12
Autenticidad verificable en: https://sede.fg.ulil.es/cv/38026CAF-BF24-4925-AFE7-FB61D67058F3	
 	
38026CAF-BF24-4925-AFE7-FB61D67058F3	
El presente documento ha sido descargado el 24/07/2023 10:33:12	Referencia: A23030051/0680650

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	47/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 47/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			



D. Julio Antonio Brito Santana con DNI 42812193Q, Director-Gerente de Fundación General de la Universidad de La Laguna.

HACE CONSTAR: Que según obra en los expedientes de la Fundación, D.ª Rocío Sánchez Ruiz con DNI nº 20062102F, ha asistido a "1st Conference in food safety and toxic risks: impact of environmental contaminants on conventional and organic foods", desarrollado el 17/07/2023, con una duración total de 20 horas lectivas según programa adjunto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma en San Cristóbal de La Laguna, a la fecha del presente documento.

D. Julio Antonio Brito Santana

Apartado de correos 456. Universidad de La Laguna
38200 San Cristóbal de La Laguna
Santa Cruz de Tenerife, España
T: +34 922319200 F: +34 922319197 info@fg-ull.es
NIF G38083408. Inscrita en el Registro de Fundaciones Canarias con el nº15
www.fg.ull.es

Este documento ha sido firmado electrónicamente por:	
G38083408 Fundación General de la Universidad de La Laguna	19/07/2023 20:00:12
Autenticidad verificable en: https://sede.fg.ull.es/cpv/8CD7DFD3-28F1-4FED-9BC4-F5BC25B39D42	
	
8CD7DFD3-28F1-4FED-9BC4-F5BC25B39D42	
El presente documento ha sido descargado el 24/07/2023 12:08:38	Referencia: A23030051/0680708

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	48/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 48/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud

1st Conference in food safety and toxic risks: impact of environmental contaminants on conventional and organic foods (A23030051)
20 horas lectivas

PROGRAMA

- Lunes, 17 de julio de 2023:

APERTURA DEL CONGRESO.

 - 14:30 – 16:00 h. Recepción, entrega de acreditaciones y de póster.
 - 16:00 – 16:40 h. Conferencia Inaugural: Las algas como nuevo recurso alimentario. Ponente: Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti (Director del Banco Español de Algas y profesor de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

MESA REDONDA: SEGURIDAD ALIMENTARIA Y CONTAMINACIÓN (16:40 – 18:25 h). Moderan: Dr. Fernando Guillén Pino y Dra. Soraya Paz Montelongo.

 - 16:40 h. La seguridad alimentaria en Canarias. Ponente: Dr. Arturo Hardisson de la Torre (Catedrático de Toxicología, Universidad de La Laguna).
 - 17:10 h. Estudios de las alteraciones producidas por ciguateras. Ana Raquel Díaz (IPNA-CSIC).
 - 17:40 h. Las normas de calidad en los laboratorios de inspección alimentaria. Ponente: Dailis González-Weller (Laboratorio de Inspección de Salud Pública, Servicio Canario de Salud, Gobierno de Canarias).

VISITA GUIADA Y "PICOTEO"

 - 19:45 – 21:00 h. Visita guiada por el Casco Histórico
- Martes, 18 de julio de 2023:

MESA REDONDA: PRODUCTOS NATURALES Y ECOLÓGICOS (9:00 – 10:45h). Moderan: Dra. Alicia Boto Castro.

 - 9:00-9:30 h. Del suelo a la mesa: el valor nutricional de frutos de procedencia agroecológica. Jana Alonso y Mercedes Hernández (IPNA-CSIC).
 - 9:30-9:55 h. Nuevos protectores de cosechas de bajo impacto ambiental para una mayor seguridad alimentaria. José Manuel Pérez de Lastra (IPNA-CSIC).
 - 9:55-10:25 h. Alternativas sostenibles en la protección de cultivos: Biopesticidas botánicos. Carolina Pérez Reyes (ULL).

SESIÓN DE PÓSTER Y COFFEE BREAK (10:45 – 11:15 h).

 - Sección de Seguridad Alimentaria.
 - Sección de Productos Naturales y Ecológicos.
 - Sección internacionalización, Innovación Educativa y Divulgación.

MESA REDONDA: INTERNACIONALIZACIÓN, INNOVACIÓN EDUCATIVA Y DIVULGACIÓN (11:15 – 13:00 h). Moderan: Dra. Cintia Hernández Sánchez.

 - 11:15 – 11:45 h. Título por definir. Ponente: Dr. Guadalupe Hernández (Universidad de La Laguna).
 - 11:45 – 12:15 h. La calidad
- Miércoles, 19 de julio de 2023:

MESA REDONDA: CIENCIA Y SALUD (9:00 – 10:45h). Moderan: Dr. Fernando Guillén Pino y Dra. Soraya Paz Montelongo.

 - 9:00 – 9:30 h. Título por definir. Ponente: Dr. Jordi Ibañez (Médico especialista en Medicina del Deporte, Clínica Planas, Barcelona).
 - 9:30 – 10:00 h. Medicina ambiental: tóxicos presentes en el ser humano. Ponente: Dr. Antonio María Pasciutto (Presidente de la Sociedad Italiana de Medicina Ambiental).
 - 10:00 – 10:30 h. La bioconstrucción como entorno de habitabilidad sostenible y saludable. Ponente: Santiago Perandones (Especialista en Bioconstrucción).

SESIÓN DE PÓSTER Y COFFEE BREAK (10:45 – 11:15 h).

 - Sección de Seguridad Alimentaria.
 - Sección de Productos Naturales y Ecológicos.
 - Sección internacionalización, Innovación Educativa y Divulgación.

COMUNICACIONES ORALES (11:15 – 12:15 h).

CLAUSURA Y ENTREGA DE PREMIOS (12:15 – 13:00 h).

PRESENTACIÓN
Primer congreso de Toxicología y Seguridad Alimentaria realizado por el Área de Toxicología de la Universidad de La Laguna, en colaboración con otras empresas y entidades, tanto públicas como privadas, del sector de la alimentación y aspectos relacionados.

Con este evento se pretende tratar temas de candente actualidad, como son la seguridad alimentaria, la agricultura ecológica y sostenible, la construcción y diseño de edificaciones biosostenibles, entre otras mesas de candente actualidad.

Este documento ha sido firmado electrónicamente por:	
G38083408 Fundación General de la Universidad de La Laguna	19/07/2023 20:00:12
Autenticidad verificable en: https://sede.fg.ull.es/cav/SC07DFD3-28F1-4FED-98C4-F58C25839042	
	
SC07DFD3-28F1-4FED-98C4-F58C25839042	
El presente documento ha sido descargado el 24/07/2023 12:08:38	Referencia: A23030051/0680708

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	49/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 49/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

3. En la actualidad, se está preparando un artículo científico para publicar los resultados en la revista Journal of Rural Health (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/17480361>).

Este artículo está ahora mismo en fase de preparación por lo que no es posible adjuntarlo a la memoria. Se encuentra a falta de dar el formato de la revista y la última revisión por parte de la ip.

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	50/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 50/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando los resultados obtenidos, así como la salud en general de los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas, se podrían explorar las siguientes líneas futuras de actuación:

1. **Estudios Epidemiológicos Integrados:** Realizar estudios epidemiológicos más amplios e integrados que aborden no solo la salud renal, sino también otros aspectos de la salud general de los trabajadores agrícolas. Esto permitiría evaluar de manera integral los impactos de la exposición a plaguicidas en sistemas orgánicos adicionales.
2. **Evaluación de Efectos a Largo Plazo:** Investigar los efectos a largo plazo de la exposición crónica a plaguicidas en la salud general. Esto incluiría no solo la presencia de enfermedades crónicas específicas, sino también la calidad de vida, la función cognitiva y otros indicadores de bienestar general.
3. **Desarrollo de Programas de Monitorización Continua:** Establecer programas de monitorización continuo que evalúen no solo los biomarcadores de estrés oxidativo y niveles de metales, sino también otros indicadores de salud, como los biomarcadores de daño renal temprano. Esto permitiría una comprensión más completa de cómo la exposición a plaguicidas afecta la salud a lo largo del tiempo y facilitaría la implementación oportuna de medidas preventivas.
4. **Enfoque en Medidas de Prevención Primaria:** Priorizar medidas de prevención primaria que reduzcan la exposición a plaguicidas desde la fuente. Esto podría incluir la promoción de prácticas agrícolas sostenibles, el uso de plaguicidas menos tóxicos y la implementación de tecnologías agrícolas más seguras.
5. **Investigación sobre Mecanismos de Acción:** Profundizar en la investigación de los mecanismos de acción a nivel molecular y celular para comprender cómo los plaguicidas inducen el estrés oxidativo y la disrupción de los niveles de metales y para identificar los procesos específicos que conducen a la elevada excreción de biomarcadores como NGAL e IGFBP7. Esto proporcionaría objetivos específicos para estrategias terapéuticas y preventivas.
6. **Intervenciones de Salud Ocupacional:** Desarrollar e implementar intervenciones de salud ocupacional dirigidas a reducir la exposición a plaguicidas y mitigar los efectos adversos en la salud. Esto podría incluir prácticas agrícolas más seguras, capacitación

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	51/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 51/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

sobre el uso adecuado de equipos de protección personal y medidas para reducir la carga tóxica.

7. **Educación Continua:** Continuar y reforzar los programas educativos dirigidos a los trabajadores agrícolas sobre los riesgos asociados con la exposición a plaguicidas y las prácticas seguras. Esto puede incluir la promoción del uso adecuado de equipo de protección personal y la conciencia sobre la importancia de la salud a largo plazo.
8. **Participación Comunitaria:** Fomentar la participación comunitaria en la toma de decisiones relacionadas con la salud ocupacional y la regulación de plaguicidas. La participación activa de la comunidad puede ayudar a impulsar cambios significativos y sostenibles.

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	52/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 52/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

ANEXO I. Artículo previo realizado en una población femenina residente en la misma área de residencia



Article
Adverse Health Effects in Women Farmers Indirectly Exposed to Pesticides

Jose Martin-Reina ^{1,†}, Alfredo G. Casanova ^{2,†}, Bouchra Dahiri ¹, Isaias Fernández ³, Ana Fernández-Palacin ⁴, Juan Bautista ⁵, Ana I. Morales ^{2,*} and Isabel Moreno ¹

- ¹ Department of Nutrition, Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, 41012 Sevilla, Spain; josemartinreina@hoo.es (J.M.-R.); bouadakh@gmail.com (B.D.); imoreno@us.es (I.M.)
- ² Toxicology Unit, Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSA), University of Salamanca (USAL), 37007 Salamanca, Spain; alfredogcp@usal.es
- ³ Estepa Clinical Management Unit, Andalusian Health Service, C/ Médico Antonio Vilches s/n, 41560 Sevilla, Spain; isaiasm.fernandez.usal@juntadeandalucia.es
- ⁴ Area of Preventive Medicine and Public Health, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani, s/n, 41009 Sevilla, Spain; alp@us.es
- ⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, 41012 Sevilla, Spain; jbaui@us.es
- * Correspondence: amorales@usal.es; Tel: +34-923-294-400 (ext. 1862)
- † The authors wish to acknowledge that Jose Martin-Reina and Alfredo G. Casanova contributed as co-first authors to this paper.

check for updates
 Citation: Martin-Reina, J.; Casanova, A.G.; Dahiri, B.; Fernández, I.; Fernández-Palacin, A.; Bautista, J.; Morales, A.I.; Moreno, I. Adverse Health Effects in Women Farmers Indirectly Exposed to Pesticides. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 5909. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115909>

Academic Editors: Miguel Montes Guzmán and María Esteban López
 Received: 24 March 2021
 Accepted: 27 May 2021
 Published: 31 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract Farmers are among the most vulnerable populations because of the exposure to low levels of pesticides. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities are considered as biomarkers of pesticides poisoning. However, biomarkers of oxidative stress are also playing an important role in toxicity of these contaminants. Further, increased activities of gamma-glutamyltransferase, alanine aminotransferase, urea and creatinine have been linked with hepatic and nephrotoxic cell damage, respectively. The aim of this study was to ascertain if the indirect exposure to pesticides leads to some biochemical parameter changes. Thus, cholinesterase activities, oxidative stress status (lipid and protein oxidation), hepatic function (AST and ALT levels), hormonal function (TSH, T4, FSH, LH and AMH), renal function (serum creatinine and urea), as well as possible subclinical kidney damage (urinary proteins and biomarkers of early kidney damage) were evaluated in farmer women who collect fruits and vegetables comparing with a group of women non-occupational exposed to pesticides but living in the same rural environment. Samples were taken periodically along one year to relate the observed effects to a chronic exposure. Our main results showed for the first time a subclinical kidney damage in a rural setting with indirect chronic exposure to pesticides.

Keywords: cholinesterase; oxidative stress; early kidney damage; pesticides; women farmers

1. Introduction

Agrochemicals, including pesticides, are extensively used in agriculture practices to kill pests that harm crops, enhancing agricultural productivity. These chemicals are potentially toxic to some organisms, including humans, and need to be safely used and properly disposed [1]. However, due to their indiscriminate use in a number of applications there is a high risk of exposure to these pesticides through occupational and non-occupational settings [2]. Agricultural workers are among the most vulnerable working populations due to social and cultural risk factors frequently associated with their ethnicity, immigration status, social class and rural location. In addition, these potential risks factors can be exacerbated by occupational hazards associated with agricultural work [3]. The three major routes of pesticide entry into a farmer's organism are inhalation, ingestion and dermal absorption. Exposure to low-levels of pesticides is known to produce a variety of biochemical changes, some of which may be responsible for the adverse biological effects

Int. J. Environ. Res. Public Health **2021**, *18*, 5909. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115909> <https://www.mdpi.com/journal/ijerph>

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	53/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001		12/12/2023 12:36	PÁGINA 53/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

reported in humans [4]. Furthermore, in a real-life situation it is commonly observed the use of multiple pesticides which are related to higher incidence of pesticide poisonings and deaths. The interaction of two or more chemicals may exhibit synergistic effects that could potentially cause damage to various organ systems of the body. The type and severity of adverse health effects of pesticides are determined by the individual chemical category, the dose and the duration of exposure, the exposure route and the use of personal protective equipment (PPE) [3,5,6].

Chronic and acute exposures to pesticides are assessed by the levels of their biomarkers, which are cholinesterase enzymes, acetylcholinesterase activity (AChE) in red blood cells and butyrylcholinesterase activity (BChE) in plasma. BChE is reduced more rapidly and intensely than AChE, reflecting acute exposure to toxic agents. AChE is, in fact, a more accurate biomarker of chronic and low-intensity exposures [7,8]. Both enzymes level in blood are considered as biomarkers of the exposure to organophosphate and carbamate pesticides [1]. However, oxidative stress plays an important role in toxicity of a wider range of pesticides including pyrethroid and carbamate insecticides and herbicides as glyphosate [7,9]. In addition to increasing the production of free radicals, exposure to these pesticides can also affect antioxidant capacity and defense mechanisms, as well as increase lipid peroxidation. The by-product most often measured is malondialdehyde (MDA), one of the main lipid hydroperoxides produced by the peroxide degradation of polyunsaturated fatty acids [8,10]. Thus, oxidative stress has been proposed as a mechanism linking exposure to pesticides to increased risk for the development of diseases such as cancer, renal and neurodegenerative diseases [11–13] and reproductive disorders [14–16]. Further, alterations in the hematological parameters such as decrease size of red blood cells, higher platelets and white blood cell (WBC) counts and increased activities of gamma-glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin has been shown to be linked with hepatic cell damage in human occupationally exposed to the pesticide [4,17,18]. Conversely, nephrotoxic changes as evidenced by elevated levels of plasma urea, uric acids and creatinine in workers occupationally exposed to pesticides have also been reported [2,19]. Other hematological parameters such as biomarkers of the thyroid function have been less studied but there is some increasing evidence that occupational exposure to agricultural pesticides may affect thyroid function. Thus, it has been observed a significant decrease in serum levels of thyroid-stimulating hormone (TSH) and significant increases in free thyroxine (FT4) and total triiodothyroxine (TT3) in farmers from Brazil [2,20].

It is necessary to delve into the evaluation of the impact of occupational exposure to agrochemicals in order to estimate the risk and develop effective strategies to prevent these health problems. The increased use of pesticides other than organophosphates makes it necessary to look for new biomarkers beyond the classics used in agricultural health surveillance protocols. Most of the epidemiological studies about pesticides exposition are focused on agricultural workers who handle and apply the pesticides on the field (direct exposure) but there are hardly any studies about indirect exposition of workers who collect the fruit and vegetables after the waiting period recommended by pesticide manufacturers before the re-entry on the field. They are chronically exposed indirectly to pesticides trace levels [3]. Alterations in fertility, procreation and development of offspring caused by chronic pesticides exposure made women one of the most vulnerable populations; however, there are only few epidemiologic studies about it.

In Spain, the health evaluation of workers is mandatory as public policy, and it is recommended once a year. Specifically, the health of pesticide applicators is evaluated only by general clinical tests, such as markers of hepatic function (AST and ALT) and cholinesterase activities, in spite of being only organophosphate and carbamates exposure biomarkers. However, these tests are not mandatory for farmers who collect the fruits and vegetables who also are indirectly exposed to pesticides in their work. The few published Spanish epidemiologic studies are focused on greenhouse pesticides sprayers [5,6,10]. Taking these premises in consideration, this study was conducted with the aim of ascertaining if also

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	54/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 54/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

the indirect exposure to pesticides leads to some biochemical parameter changes. Thus, cholinesterase activities, oxidative stress status (lipid peroxidation and protein oxidation), hepatic function (AST and ALT levels), hormonal function (TSH, T4, FSH, LH and AMH) and renal function (serum creatinine and urea), as well as possible subclinical kidney damage (urinary proteins and biomarkers of early kidney damage) were evaluated in farmer women who collect fruits and vegetables comparing with a group of women non-occupational exposed to pesticides but living in the same rural environment.

To our best knowledge, no study has been done on these all parameters together by taking into account this indirectly exposed population of harvest farmer women.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

All chemicals, including acetylthiocholine iodide, butyrylthiocholine, thiobarbituric acid and 2,4-dinitrophenylhydrazine were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Study Population

A longitudinal study was conducted on a cohort of 39 women in fertile age from Marinaleda (Sevilla, Spain). Marinaleda is a small town with an area of 24.8 km² and a total population of 2665 inhabitants. Of the total population, 65.2% are between 20 and 65 years of age, of which 1299 are women, representing 49% of the population. Its political and social organization makes it unique and suitable for the achievement of this study. The economic activity of this town is based on agriculture where jobs are distributed among the male and female population being women in charge to collect the fruits and vegetables in the field or work in the factory where these fruits and vegetables are canned. The selection of participants was non probabilistic in a snowball sampling. A final sample of 39 women (age between 18 and 45 years) were asked to be part of this longitudinal study. In this case, 22 of them, directly involved in collection of fruits and vegetables in the field, were classified as farmers and the 17 remaining participants who work in the canned factory and live in the same rural environment were classified as non-occupational exposed (NOE) group. The study was carried out over a year (from October 2017 to October 2018), during which samples were collected every three months in order to study the effects of the chronic indirect exposure to pesticides. The chronogram of sampling, the crops collected at this time and the pesticides most used for these crops are listed in Table 1. Women with a clinical diagnosis of chronic diseases were excluded. A preliminary questionnaire was specifically designed for the study to record the personal and occupational information of all the participants. Ethical clearance was obtained from the Coordinating Committee of Ethics of Biomedical Research of Andalusia (Spain) (code: 0231-N-17/6 February 2017) and was in agreement with the Declaration of Helsinki for International Health Research. Written informed consent was also obtained from all the participants after being informed about the objectives of the study and the right to drop out of the study at any time.

2.3. Sample Collection

Blood samples (~15 mL of venous blood) were obtained from all the participants every three months along the study period. The blood samples were kept in heparinized and nonheparinized tubes and kept in an ice box until transported to the laboratory (just a few hours after the samples collection). Both plasma and serum were separated from the blood and kept refrigerated until their use. The whole blood samples were used for the hematological test while plasma and serum samples were used for the biochemical analysis.

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ		
	ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	55/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 55/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Table 1. Chronogram of sampling, crops collected and the pesticides most used along the whole study.

Date of Sampling (Day/Month/Year)	Crop Collected in the Previous Three Months	Pesticides Applied	Target Pest
5 October 2017	Pepper Garlic Artichoke	Pendimethalin Fluazifop-P-butyl λ-Cyhalothrin	Herbicide Herbicide Insecticide
8 February 2018	Garlic Artichoke Broccoli Green beans Olives Wheat	Bromoxynil Fluazifop-P-butyl Glyphosate Dimethylamine Diflufenican Chlortoluron Tritosulfuron Imidacloprid λ-Cyhalothrin Mancozeb Azoxystrobin Copper oxychloride	Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Insecticide Insecticide Fungicide Fungicide
6 June 2018	Pepper Garlic Artichoke Broccoli Green beans Olives Wheat Cotton Zucchini Chickpeas Sunflowers Chamomile	Cycloxydim Fluazifop-P-butyl Pendimethalin Glyphosate Imazamox Dimethylamine Fluometuron Ethofumesate Fluroxypyr Napropamide Tritosulfuron Bromoxynil Pinoxaden λ-Cyhalothrin Chlorpyrifos Deltamethrin Beta-cyfluthrin Propanoic acid Chlorothanil Copper oxychloride Azoxystrobin Tebuconazole	Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Herbicide Insecticide Insecticide Insecticide Insecticide Fungicide Fungicide Fungicide Fungicide
10 October 2018	Pepper Garlic Artichoke	Pendimethalin Fluazifop-P-butyl λ-Cyhalothrin	Herbicide Herbicide Insecticide

2.4. Assay of Cholinesterase's Activities

Red blood cells AChE activity was measured as described by Ellman et al. (1961) [21] and adapted for microplates, as described by Guimarães et al. (2007) [22]. Briefly, acetylthiocholine iodide (AcSCh) 9 mM was used as substrate and 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) 0.75 mM (DTNB) acid as chromogen. The optical density at 415 nm was measured each 30 s for 3 min using an ELISA plate reader (Synergy HTX, BIO-TEK, Winooski, Vermont, U.S.A). Enzyme activity is expressed as U/L.

Plasma cholinesterase (BChE) was determined by measuring the rate of hydrolysis of butyrylthiocholine (BuSCh) 24 mM instead of AcSCh and 0.5 mM DTNB as chromogen according to the same method mentioned above. Enzyme activity is expressed as U/L.

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	56/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 56/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



2.5. Hematological and Biochemical Analysis

The following hematological parameters were determined using a hematology analyzer (Sysmex XN-1000, Norderstedt, Germany) in whole blood collected in heparinized tubes: red blood parameters (number of red blood cells, $\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobin (g/dL), hematocrit (%), white blood parameters [total number of leukocytes, $\times 10^3/\mu\text{L}$, total number ($\times 10^3/\mu\text{L}$) and percentage of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes and basophils] and platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Biochemical parameters were measured on fresh serum samples using a clinical analyzer (Vital Scientific-Selectra XL, Spankeren, The Netherlands) following standard procedures for clinical biochemistry. The measured parameters included: glucose, total proteins (g/dL), lipid profile: total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglycerides; liver function test: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) (units for all these tests are U/L); and renal function test: creatinine (mg/dL) and urea (mg/dL).

2.6. Hormonal Analysis

Thyroid hormone levels were measured on fresh serum samples by paramagnetic particles, chemiluminescent immunoassay using a CL-1000i analyzer (Mindray, Shenzhen, China). The measured hormones were levels of thyroid-stimulating hormone (TSH) ($\mu\text{UI/mL}$) and free thyroxine (FT4) (ng/dL). The reference values were 0.270–5.500 $\mu\text{UI/mL}$ for TSH and 0.93–1.70 ng/dL for FT4.

Sex hormone levels [luteinizing hormone (LH), folliclestimulating hormone (FSH)] were assayed in serum using a clinical chemiluminescence immunoassay analyzer (CL-1000i, Mindray, Shenzhen, China). Units for these tests are $\mu\text{UI/mL}$. Anti-Müllerian hormone (AMH) levels were measured on serum samples using the Beckman Coulter AMH Gen II ELISA according to the manufacturer’s instructions. All assays were measured using an ELISA plate reader (Synergy HTX, BIO-TEK, Winooski, Vermont, USA). The minimal detectable AMH concentration with the AMH Gen II assay is 0.9 pmol/L (as advised by the manufacturer) and samples with undetectable levels were recorded as 0.9 pmol/L.

2.7. Oxidative Stress Biomarkers

Lipid peroxidation products were quantified in serum samples by the thiobarbituric acid (TBA) method [23]. Malondialdehyde (MDA) is formed as an end-lipid peroxidation product which reacts with the TBA reagent under acidic conditions to generate a pink colored product. Values were presented as nmol TBARS/mg proteins.

Protein carbonyl content, a biomarker of protein oxidation, was assayed with the method described by Levine et al. (1990) [24] using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2 M HCl, 20% trichloro acetic acid (w/v), and 6 M guanidine hydrochloride. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein, using the extinction coefficient $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8. Urinary Early Kidney Damage Biomarkers

Proteinuria was measured with the Bradford assay [25]. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity was quantified using a commercial kit [“N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) assay kit”, Diazyme, Poway, CA, USA] following the manufacturer’s instructions. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) was measured by commercial ELISA (“Human NGAL ELISA Kit 036CE”, BioPorto Diagnostics, Hellerup, Denmark), according to the manufacturer’s instructions; and for the quantification of Kidney injury molecule-1 (KIM-1), the kit “KIM-1 (human) ELISA Kit #ADI-900-226” (Erzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) was used. Albumin was quantified using the “Human Albumin ELISA Quantitation Set E80-129” kit, and the “Human Transferrin ELISA Quantitation Set E80-128” kit was used to determine transferrin, both from Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA. Both procedures require the “ELISA Starter Accessory kit E101” kit, which provides the necessary reagents for the determination of both proteins. All biomarkers values in

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	57/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 57/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	

humans were factored by urinary creatinine concentration with the objective of normalizing the effect of urine concentration [26]. The urinary creatinine required for the normalization of all biomarkers was measured using the commercial kit “Quantichrom creatinine assay kit” (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

In addition, these biomarkers do not have reference values established as “normal” or “physiological”, a battery of urinary samples from a control group consisting of 16 healthy women (non-working in any of the activities described in point 2.2. and non-residents in Marinaleda) with demographic, anthropometric and biochemical characteristics statistically similar to the women in the groups’ “farmers” and “NOE” (data not shown) was included.

2.9. Statistical Analysis

Descriptive statistics were generated for demographic parameters in the farmers group and NOE group. Outliers were identified using the Grubbs test [27]. Frequencies and percentages for all the categorical parameters were compared between both groups using Pearson’s chi-squared or Fisher’s exact test. In the case of continuous quantitative variables, firstly, it was studied whether the data in the groups followed a normal distribution, applying Shapiro-Wilk’s test. After that, an unpaired student’s t test was used to compare the mean values of the quantitative characteristics (demographic parameters, oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity, biochemical and hematological parameters) between the farmers and NOE groups. On the other hand, the comparison of the urinary excretion of the biomarkers of kidney damage described in point 2.8. between the three groups was carried out with an ANOVA test coupled with a Scheffe post-hoc test (for normal and homoscedastic data, the latter evaluated with Levene’s test) or a Games-Howell post-hoc test (for normal and non-homoscedastic data); or a Kruskal-Wallis test (for non-normal data) with Bonferroni correction as post-hoc test. Finally, and with the aim of establishing the possible relationship between exposure to pesticides and the development of subclinical kidney damage in Marinaleda workers and residents, Spearman correlation studies (for non-normal data, evaluated with the Kolmogorov-Smirnov test) were carried out between excretion of the different biomarkers evaluated at all sampling times and the blood levels of cholinesterase, acetylcholinesterase, lipoperoxidase and protein oxidation.

The criterion for significance was set at $p < 0.05$. All the statistical analysis was performed using the IBM SPSS statistics software version 24.0 (International Business Machines, Armonk, NY, USA). Microsoft Office Excel 2016 and PowerPoint 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA) were used to create the artwork and illustrations presented.

3. Results

3.1. Characteristics of the Studied Population

Characteristics of the study population are shown in Table 2. Twenty-two women farmers involved in recollection of vegetables and fruits were evaluated in comparison with the NOE group formed by 17 women who work in the canned factory in the same town at least in the last 10 years in order to ensure that they were not previously involved in farming activities. All the women were working in their jobs at least in the last 5 years. Farmers are working regularly along the year collecting the different kinds of crops depending on the time of year, their exposure is considered as chronic exposure. Nonsmokers were the majority of the women from both groups. Most of the participants in both groups are non- or sporadic (only in special events) alcohol consumers, only 22% and 36% were weekend alcohol consumers in farmers and NOE groups, respectively.

Health status and neurological endpoints were assessed taking into account the self-reported symptoms collected through the epidemiological questionnaire. A variety of neurological symptoms, including headache (25%) and dizziness (25%), gastrointestinal and respiratory symptoms (35%, respectively) have been reported in women farmers. These symptoms were significant as compared to NOE participants. The health status was assessed along the monitoring period through three more questionnaires. There were no significant differences in neurological, gastrointestinal or respiratory symptoms collected

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	58/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 58/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



between the same participants and only 5% of farmers informed about a weight gain after the first sample collection.

Table 2. General characteristics of farmers and non-occupational exposed (NOE) groups. n.c.: not calculable; PPE: personal protective equipment. Data are expressed as number of patients [n, (%)].

	Farmers (n = 22)	NOE (n = 17)	p-Value
Age			
18–28 years	3 (13.6)	3 (17.6)	0.175
29–38 years	3 (13.6)	6 (35.3)	
39–45 years	16 (72.7)	8 (47.1)	
Smoking habits			
Smokers	8 (36.4)	6 (35.3)	1.000
Non-smokers	14 (63.6)	11 (64.7)	
Alcohol consumption			
Non-consumer	10 (45.5)	11 (64.7)	0.015
Sporadic	8 (36.4)	0 (0)	
Weekend	4 (18.2)	6 (35.3)	
Number of years working at that job			
<5	2 (9.1)	0 (0)	0.006
5–10	0 (0)	5 (29.4)	
>10	20 (90.9)	12 (70.6)	
Use of PPE			
Yes	22 (100)	15 (88.2)	0.184
No	0 (0)	2 (11.8)	
Type of PPE			
Mask	0 (0)	0 (0)	n.c.
Gloves	22 (100)	15 (88.2)	0.184
Glasses	0 (0)	0 (0)	n.c.

3.2. Effects on Cholinesterase’s Activities

The activities of AChE in erythrocyte and BuChE in serum have been estimated and represented in Figure 1. No statistically significant alterations in cholinesterase activity, neither AChE nor BuChE, were found in women farmers when compared to the NOE women group. However, it can be observed that AChE activity was slightly lower in farmers than in NOE group in the last three monitoring dates (February, June and October 2018). Thus, when comparing the AChE activity detected in the farmers group in these three dates there was a statistically significant decrease ($\approx 18\%$) ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) in relation with those detected in the first sampling date (October 2017).

3.3. Effects on Hematological and Biochemical Parameters

No significant differences were found in results from the hemograms when comparing farmers and NOE groups along all of the monitoring period.

Biochemical parameters are shown in Table 3. Women farmers presented a significant increase in serum levels of glucose when compared to NOE groups in 17 October ($p < 0.05$) and 18 October ($p < 0.001$). On the other hand, the levels of total proteins in women farmers were significantly reduced in relation to NOE women groups only in 18 February ($p < 0.001$). Regarding lipid profile, a very significant increase in HDL ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) along all the studied monitoring periods were observed in farmer women as compared with NOE groups. Interestingly, a decrease in LDL (18 June and 18 October) and triglycerides (18 February and 18 June) ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) was also observed, being the NOE group the population that presents a significant increase in lipid parameters even with values above of the reference values, suggesting abnormal accumulation of lipids. The liver function biomarkers assessed, AST, ALT and LDH didn’t show significant differences between both groups of population (farmers and NOE) in none of the four periods studied. Even

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	59/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 59/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



though serum urea and creatinine increased in different study periods in the farmers group compared to the NOE group, in no case they exceeded the reference values, so the results showed a preserved kidney function for both groups.

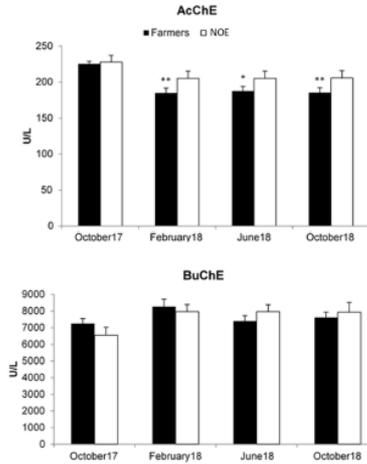


Figure 1. Activities of AChE in erythrocyte and BuChE in serum evaluated at different sampling times. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus farmers (October 17). AChE: acetylcholinesterase; BuChE: butyrylcholinesterase; NOE: non-occupational exposed.

3.4. Effects on Hormonal Analysis

Results for hormonal analysis (TSH, FT4, LH, FSH and AMH) are shown in Table 4. There is a great variability in results of all of these parameters in both studied groups (farmers and NOE) and between the different periods of the study (17 October, 18 February, 18 June and 18 October). Compared with the NOE group, only levels of FT4 and LH were significantly decreased in farmer women in June and October 2018, respectively. Levels of FT4 and TSH were within the reference values in both populations (farmers and NOE). Furthermore, levels of AMH in three monitoring periods measured were within enough levels of ovarian reserve.

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ		
	ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	60/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 60/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Table 3. Effects on biochemical and on liver and renal profile in farmers and in non-occupational exposed (NOE) groups. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus NOE group. ALT: alanine transaminase; AST: aspartate aminotransferase; HDL: high-density lipoprotein; LDH: lactate dehydrogenase; LDL: low-density lipoprotein.

	October 2017		February 2018		June 2018		October 2018		Normal Range
	Farmers	NOE	Farmers	NOE	Farmers	NOE	Farmers	NOE	
Glucose (mg/dL)	91.6 \pm 2.8*	81.7 \pm 1.7	79.0 \pm 3.1	76.7 \pm 1.6	75.8 \pm 1.5	77.4 \pm 1.6	82.1 \pm 4.9***	61.1 \pm 2.0	75–110
Total proteins (g/dL)	7.0 \pm 0.1	6.9 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	7.4 \pm 0.0	7.0 \pm 0.1***	7.4 \pm 0.0	7.6 \pm 0.1	7.4 \pm 0.1	6.5–8.0
Lipid profile									
Total cholesterol (mg/dL)	187.6 \pm 3.4	174.7 \pm 12.1	193.3 \pm 4.8	199.9 \pm 13.8	186.6 \pm 4.3	200.4 \pm 13.7	185.3 \pm 6.6	218.3 \pm 17.1	90–220
HDL (mg/dL)	55.0 \pm 2.7**	43.3 \pm 2.6	59.3 \pm 2.1***	42.4 \pm 2.8	60.2 \pm 2.3***	42.3 \pm 2.8	58.0 \pm 2.3**	46.8 \pm 1.6	35–65
LDL (mg/dL)	119.4 \pm 3.2	116.8 \pm 10.0	125.7 \pm 3.9	144.1 \pm 11.8	105.3 \pm 3.4**	144.2 \pm 11.8	100.4 \pm 5.1**	142.1 \pm 11.7	<129
Triglycerides (mg/dL)	137.5 \pm 11.2	128.2 \pm 10.0	135.9 \pm 9.1**	198.1 \pm 14.8	106.7 \pm 8.2***	198.2 \pm 14.7	136.4 \pm 9.6	148.9 \pm 20.1	50–200
Hepatic function biomarkers									
LDH (U/L)	401.8 \pm 11.6	376.7 \pm 15.9	371.0 \pm 10.7	373.3 \pm 14.4	353.7 \pm 10.1	373.9 \pm 14.3	412.7 \pm 11.0	437.7 \pm 13.3	230–460
AST (U/L)	20.6 \pm 2.4	19.1 \pm 1.5	23.0 \pm 2.3	19.3 \pm 0.9	17.2 \pm 1.3	19.4 \pm 1.0	18.3 \pm 1.1	21.0 \pm 1.1	10–37
ALT (U/L)	20.1 \pm 2.9	18.3 \pm 3.2	23.7 \pm 3.6	18.4 \pm 2.9	17.7 \pm 1.9	18.8 \pm 2.8	15.6 \pm 1.5	14.6 \pm 1.1	10–40
Renal function biomarkers									
Urea (mg/dL)	33.8 \pm 1.9***	22.0 \pm 1.2	30.1 \pm 0.7***	21.2 \pm 0.6	33.5 \pm 1.7***	21.6 \pm 0.7	34.0 \pm 1.2***	23.9 \pm 1.4	15–50
Creatinine (mg/dL)	0.8 \pm 0.0***	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0*	0.6 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.0	0.6–1.2

Table 4. Effects on hormonal levels in farmer women and in non-occupational exposed (NOE) groups. Data are expressed as the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus NOE group. AMH: anti-Müllerian hormone; FSH: follicle stimulating hormone; FT4: free thyroxine; LH: luteinizing hormone; n.m.: not measured; TSH: thyroid-stimulating hormone.

	October 2017		February 2018		June 2018		October 2018		Normal Range
	Farmers	NOE	Farmers	NOE	Farmers	NOE	Farmers	NOE	
TSH (mIU/L)	1.33 \pm 0.16	1.86 \pm 0.27	1.87 \pm 0.17	1.61 \pm 0.16	1.41 \pm 0.12	1.62 \pm 0.17	1.88 \pm 0.18	2.70 \pm 0.78	0.27–5.30
FT4 (ng/dL)	1.16 \pm 0.01	1.27 \pm 0.06	1.18 \pm 0.03	1.22 \pm 0.07	1.04 \pm 0.02**	1.23 \pm 0.07	1.19 \pm 0.02	1.23 \pm 0.04	0.93–1.70
LH (U/L)	24.2 \pm 6.8	38.7 \pm 11.0	31.5 \pm 10.1	56.3 \pm 14.6	25.3 \pm 7.3	55.6 \pm 14.5	18.5 \pm 6.6***	97.8 \pm 12.4	<25 U/L
FSH (U/L)	19.1 \pm 4.7	51.8 \pm 28.4	21.6 \pm 5.4	29.3 \pm 5.5	17.0 \pm 4.1	29.2 \pm 5.5	12.8 \pm 3.2	42.6 \pm 4.3	3.8–8.8 U/L (follicular phase); 1.8–5.1 U/L (luteal phase); 4.5–22.5 U/L (menstrual cycle)
AMH (pg/mL)	n.m.	n.m.	1.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.7	0.7–2.3 ng/mL (enough levels of ovarian reserve)

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ		
	ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	61/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001		12/12/2023 12:36	PÁGINA 61/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



3.5. Effects on Lipid and Protein Oxidation

The activity of the biomarkers of oxidative stress studied in farmers and NOE women at the four study periods (October 2017, February 2018, June 2018 and October 2018) are shown in Figure 2. As compared to NOE groups, women farmers had significantly higher levels of TBARS and carbonyl groups in the two first sampling (17 October and 18 February) ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). In the last two samples it was observed a decrease in levels of TBARS and carbonyl groups in women farmers without significant differences in comparison to the values of NOE. There were no significant differences in levels of TBARS and carbonyl groups in the NOE group along the four sampling periods.

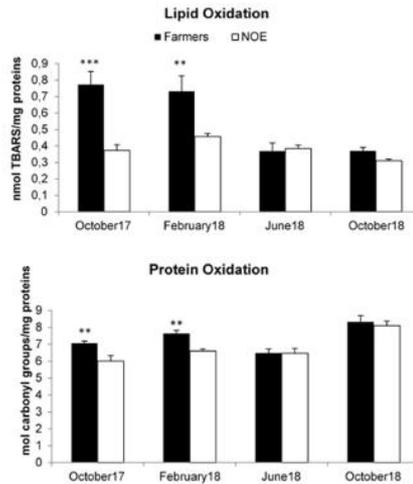


Figure 2. Activity of the biomarkers of oxidative stress at different sampling times. Data are expressed as the mean ± SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus NOE group. NOE: non-occupational exposed.

3.6. Effects on Early Renal Function Biomarkers

Urinary levels of the biomarkers of early kidney damage are shown in Figure 3. As can be observed, all the evaluated biomarkers presented at least at some of the sampling times high levels in their excretion with respect to the control group, on many occasions with high statistical significance ($p < 0.001$). Even though, in general, no statistically significant differences were detected between the farmers and NOE groups, a greater excretion of KIM-1 (in February and October 2018) was observed in the second group.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	62/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 62/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	

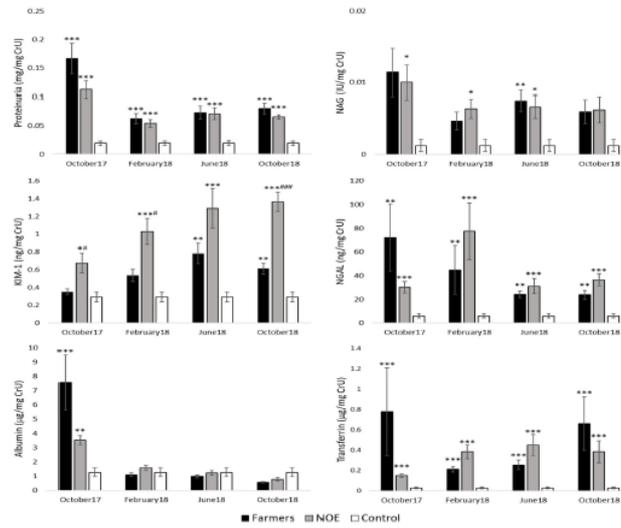


Figure 3. Urinary levels of the biomarkers of early kidney damage evaluated at different sampling times. Data are expressed as the mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control group. # $p < 0.05$; ## $p < 0.001$ versus farmers group. CrU: urinary creatinine; KIM-1: kidney injury molecule 1; NAG: N-acetyl-β-D-glucosaminidase; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NOE: non-occupational exposure.

In order to study if there was a relationship between kidney damage and pesticide exposure, a correlation study was carried out between kidney damage biomarkers and pesticide exposure (measured by AChE and BuChE) (Table 5). Our results showed that AChE, a biomarker of chronic and low-intensity exposures, correlated with a higher number of biomarkers of kidney damage in the farmers group compared to the NOE group. These data seem to show a relationship between exposure to pesticides (farmers group) and kidney damage. However, BuChE, a biomarker of acute exposure, in both groups correlates with two of the biomarkers of kidney damage evaluated. These data seem consistent with those obtained from BuChE, in which no significant differences were observed throughout the four samplings between the farmers and NOE groups.

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	63/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 63/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	

Table 5. Results of the correlation study carried out between the urinary biomarkers evaluated and blood parameters of exposure to pesticides. Data are expressed as Spearman’s correlation coefficient (ρ). Significance of the correlation: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. AChE: acetylcholinesterase; BuChE: butyrylcholinesterase; KIM-1: kidney injury molecule 1; NAG: N-acetyl- β -D-glucosaminidase; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NOE: non-occupational exposed.

Farmers		Proteinuria	Urinary NAG	Urinary KIM-1	Urinary NGAL	Urinary Albumin	Urinary Transferrin
Exposure to pesticides	Blood BuChE	-0.29 *	0.14	0.23	0.14	-0.26 *	-0.18
	Blood AChE	0.08	0.01	-0.43 ***	-0.33 **	0.38 **	-0.27 *
Oxidative stress	Blood lipoperoxidase	-0.09	-0.03	-0.09	-0.02	0.21	-0.47 ***
	Blood proteins oxidation	-0.22	-0.15	0.06	0.14	-0.09	0.12
NOE		Proteinuria	Urinary NAG	Urinary KIM-1	Urinary NGAL	Urinary albumin	Urinary transferrin
Exposure to pesticides	Blood BuChE	-0.14	-0.20	0.61 ***	-0.16	-0.36 ***	0.13
	Blood AChE	0.05	-0.08	-0.03	-0.36 **	0.04	-0.35 **
Oxidative stress	Blood lipoperoxidase	0.09	-0.16	0.08	0.05	0.20	0.08
	Blood proteins oxidation	-0.08	-0.02	0.09	-0.14	-0.27 *	0.17

4. Discussion

This work evaluated in two populations of rural women the biochemical, hematological, hepatic, hormonal and renal alterations induced by indirect exposure to ChE inhibitor pesticides, as well as the implication of oxidative stress in these effects. The study was carried out in Marinaleda (Seville). This town is surrounded by the fields where most of the population work, either sowing, applying pesticides or collecting the fruits. One group consisting of women farmers indirectly exposed to pesticides during harvesting and the other one formed by women non-occupationally exposed to these compounds due to their work in the canned factory of the town. Considering the low number of studies investigating the health of harvest farmers, especially women, our study provides important data on the effects associated with this indirect exposure to pesticides in this population group in comparison with the NOE group, and about the influence of the rural environment when comparing these two rural groups with a non-rural control group. The strength of the present study lies in the fact that all the parameters studied were assessed four times along the study in order to relate the observed effects to a chronic exposure.

During the sampling, farmer women were in the middle of the harvest time, collecting different cultures along the study. Our data showed that most of these women (88.9%) were chronically and indirectly exposed to pesticides during more than 10 years. All of them reported the use of PPE but only gloves because none of them reported the use of masks or glasses. Similar response was obtained in the NOE group about using PPE in their work in the factory. No significant differences were observed in BuChE activities along the four sampling when farmer and NOE are compared. However, AChE activity was found to be lower (10%, 8% and 10%) in the second, third and fourth sampling, in women farmers as compared to the NOE group, but was not found to be statistically significant. The inhibition observed in AChE activities along the sampling period, is very far from the Biological Exposure Index (BEI) that establish a 70% of AcChE activity an individual’s baseline as a reference value for exposure control, what means a 30% of decreased in the enzymatic activity (INSST, 2019). Even though both enzymatic activities are markers of early biologic effects related to OPs and carbamates exposure, AChE inhibition is more sensitive and preferred than BuChE, since it reflects the biological effects on the nervous system and shows a lower recovery rate, representing the inhibition of the neural AChE in a more realistic manner [1]. The inhibition of cholinesterases activities has been associated with cholinergic dysfunctions in pesticides-exposed workers [2], mainly in pesticide sprayers who are directly exposed to these compounds. Thus, significant reduction in the enzymatic activity (17%–26%) was observed in pesticide sprayers and in women plucking leaves in tea plantations from India [2,7,28]. Similar results were reported by Cestonaro et al.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	64/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 64/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



(2020) [1] in farmers from Brazil with a decreased enzymatic activity of 21% for AChE in comparison with NOE group. On the other hand, and more in agreement with our results, Vikkey et al. (2017) [29] observed that 88% of the cotton farmers from Benin displayed less than 20% AChE inhibition. Some authors have concluded that despite AChE activity being used to biomonitor exposure to pesticides in the human population, in some cases no differences in this enzymatic activity are found among exposed populations and NOE groups [8,30].

Another interesting finding of this study is that provided by the alteration of the biochemical parameters in the population groups studied. Even though weakly, AChE was significantly and inversely associated with glucose, showing that the chronic exposure to pesticides can also contribute to the increase in glucose levels [1]. Our results showed a significant increase in glucose levels in women farmers in comparison with the NOE group in two of the four sampling dates. However, despite the chronic exposure of this group, the measured levels of glucose did not represent a real hyperglycemia, probably since the pesticides employed are not only OPs and carbamates and that the exposure to these compounds is indirect. Further, our study also showed a significant increase in HDL levels as compared to NOE group, however, a trend of decreased in the levels of lipid profile including cholesterol, triglycerides and LDL comparing to NOE group indicating that the indirect exposure to pesticides in this population of women does not lead to an abnormal accumulation of lipid, altered metabolism, hepatic dysfunction or cardiac problems as it has been observed in previous studies in pesticide sprayers [2]. The long-term exposure to pesticides may increase the levels of AST, ALT and LDH, causing damage to liver function. In the present study no significant differences were observed in these parameters when comparing both groups (farmers vs. NOE). This fact with the significant increase in HDL levels lead us to conclude that there is no liver damage in this indirectly exposed population.

Some pesticides may interfere with the female hormonal function, which may lead to negative effects on the reproductive system through disruption of the hormonal balance necessary for proper functioning [14]. In the present study slightly lower levels in FT4 and LH were observed in farmers in comparison with the NOE group, but only in June and October 18 were statistically significant, respectively. Despite these differences, levels of FT4 both in farmer and NOE groups along the study were all within the normal reference values. Some authors have observed a relationship between significant increases in FT4 levels and pesticide exposure, suggesting that occupational exposure to pesticides may affect thyroid function [3,20]. In relation with LH levels, most of the values detected in both groups are higher than 25 U/L considered as a menopause indicator in elder women or a signal of ovarian malfunction or an early menopause in younger women.

Kidney damage from pesticides exposure has been referenced in various studies [11,31–34], however, most of them have been carried out in conditions in which chronic heat stress and dehydration have also been considered as etiopathogenic factors of renal damage. This could justify that in our study, kidney damage, measured by an increase in creatinine, was not evidenced since the study groups did not suffer from these conditions. Furthermore, the increase in creatinine is only evidenced when renal function has decreased by 50% [35], which is not the circumstance of our study. During the last two decades, new biomarkers have been identified that detect kidney damage independently of serum creatinine, even under subclinical circumstances. These biomarkers (KIM-1, NGAL, NAG, etc.), have demonstrated their ability to diagnose early kidney damage, give information on the type of injury and progression of damage. It has been proven that they are metabolic components or derivatives, degradation compounds or remnants of them that appear in the urine as a result of damage to kidney structures [36–39]. In this study we have identified different urinary biomarkers (protein, albumin, transferrin, KIM-1, NAG and NGAL), which are related to a subclinical tubular alteration [40–42]. The importance of this finding is that repeated tubular damage could progress to chronic kidney disease [43]. In fact, chronic kidney disease of unknown etiology is a global epidemic whose cause has

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	65/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 65/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



not identified a single factor, but many factors that can contribute to the etiology of the disease, including exposure to agrochemicals, particularly glyphosate and paraquat, are likely compound factors and may be the primary factors [34,44]. This is the first study to alert to the possibility of subclinical kidney damage in a rural setting with indirect exposure to pesticides.

On the other hand, this study presented results regarding the levels of intoxication biomarkers such as BuChE and AChE. These enzymes are important markers for the investigation of organophosphate pesticide poisonings after acute and chronic exposures, respectively [45]. Therefore, these data confirm the real impact of exposure to these compounds on kidney function. Another of the relevant findings in our study is that subclinical kidney damage appears both in women indirectly exposed to pesticides (farmers) and those exposed in a non-occupational way (NOE). These results suggest that the effect of pesticides could affect a general population in a rural environment based on agriculture and therefore, possible preventive measures should be extended to the entire population.

Oxidative stress as a possible mechanism of toxicity for pesticides has become a focus of toxicological research because it is considered as a critical pathophysiological mechanism in different human pathologies associated with pesticide exposure [30]. Oxidative damage may result in cellular adaptation, damage to cellular lipids, DNA, proteins and/or cellular death [3]. In the present study, lipid peroxidation and protein oxidation as biomarkers of oxidative stress were investigated among women farmers who are indirectly exposed to a mixture of pesticides and women who are not occupationally exposed to these compounds. MDA and TBARS as a direct measure of MDA have been used as a biomarker of lipid peroxidation and is one of the most reliable markers to determine oxidative stress in clinical situations [10,30]. Several studies reported increased MDA concentrations in applicators, farmers and sprayers exposed to different pesticides [2,4,8,10]. In this study MDA levels were higher in women farmers than in the NOE group, but only in two of the sampling dates (17 October and 18 February). Similarly, levels of protein oxidation measures as nmol of carbonyl groups were higher in farmers than in NOE group in samples from 17 October and 18 February. It has been demonstrated that oxidative stress is the main mechanism of acute intoxication from some pesticides, either individually or in a mixture, although the underlying molecular mechanisms are not clear [10,46]. This fact could explain the recovery observed in both in the farmer's biomarkers to the control levels along the study.

Despite these findings, the main limitation of the study is the low sample size. On the other hand, the results cannot be extrapolated to the general population, since the study has been carried out in women in fertile age from a rural setting. Thus, further research is necessary to strongly address the issue of pesticide toxicity in both genders' farmers and in a greater age range.

5. Conclusions

The present study showed for the first time that the indirect chronic exposure to pesticides lead to a subclinical tubular damage in a women rural setting that could progress to chronic kidney disease. In addition, the oxidative stress biomarkers measured were higher in the women farmer group with respect to NOE group at the beginning of the study, showing a recovery to control levels with time as indicative of acute intoxication. However, no significant differences were detected in cholinesterase activities, the classical biomarkers of pesticide exposure, between both groups studied. In view of the results obtained for this investigation, it may be concluded that farmers are exposed to a mixture of pesticides beyond organophosphates and carbamates, so it is necessary to implement new biomarkers in order to improve the monitoring of the health status in farmers to protect properly this vulnerable population.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	66/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 66/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Author Contributions: Conceptualization, I.M., J.B. and A.I.M.; methodology, I.M., J.B. and A.I.M.; formal analysis, B.D., I.F.; investigation, J.M.-R., B.D. and A.G.C.; data curation, A.F.-P.; writing—original draft preparation, J.M.-R.; writing—review and editing, A.I.M., A.G.C. and I.M.; supervision, J.B.; funding acquisition, I.M., J.B. and J.M.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Prevent Foundation, grant numbers FIUS: 3396/0828 and FIUS: 3706/0828.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Coordinating Committee of Ethics of Biomedical Research of Andalusia (Spain) (code: 0231-N-17/6 February 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors acknowledge the collaboration of the Hospital de Osuna in the analysis of hematological and biochemical parameters; and the disinterested participation of the women under study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cestonaro, L.V.; Garcia, S.C.; Nascimento, S.; Gauer, B.; Sauer, E.; Goethe, G.; Peruzzi, C.; Nardi, J.; Fao, N.; Piton, Y.; et al. Biochemical, hematological and immunological parameters and relationship with occupational exposure to pesticides and metals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 29291–29302. [CrossRef]
- Kori, R.K.; Hasan, W.; Jain, A.K.; Yadav, R.S. Cholinesterase inhibition and its association with hematological, biochemical and oxidative stress markers in chronic pesticide exposed agriculture workers. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2019**, *33*, e22367. [CrossRef]
- Curl, C.L.; Spivak, M.; Phinney, R.; Montrose, L. Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. *Curr. Environ. Health Rep.* **2020**, *7*, 13–29. [CrossRef] [PubMed]
- Wafa, T.; Nadia, K.; Amel, N.; Ikbal, C.; Insaf, T.; Asma, K.; Hedi, M.A.; Mohamed, H. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2013**, *48*, 1058–1069. [CrossRef]
- García-García, C.R.; Parrón, T.; Requena, M.D.M.; Alarcón, R.; Tsatsakis, A.M.; Hernández, A.F. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci.* **2016**, *145*, 274–283. [CrossRef]
- Hernández, A.F.; Parrón, T.; Tsatsakis, A.M.; Requena, M.D.M.; Alarcón, R.; López-Guarnido, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology* **2013**, *307*, 136–145. [CrossRef]
- Fareed, M.; Kesavachandran, C.; 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. [CrossRef]
- Jacobsen-Pereira, C.H.; Dos Santos, C.R.; Maraslis, E.T.; Pimentel, L.; Feijó, A.J.L.; Silva, C.I.; Medeiros, G.D.S.D.; Zeferino, R.C.; Pedrosa, R.C.; Maluf, S.W. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *148*, 177–183. [CrossRef]
- Cortina, C.C.; Fonnegra, L.M.F.; Pineda, K.M.; Muñoz, M.P.; Fonnegra, J.R.; Díaz, J.P.Z. Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: Revisión de tema. *Revista CES Salud Pública* **2017**, *8*, 121–133.
- Lozano-Paniagua, D.; Parrón, T.; Alarcón, R.; Requena, M.D.M.; Gil, F.; López-Guarnido, O.; Lacasaña, M.; Hernández, A.F. Biomarkers of oxidative stress in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *162*, 121–128. [CrossRef] [PubMed]
- Gunatilake, S.; Seneff, S.; Orlando, L. Glyphosate's Synergistic Toxicity in Combination with Other Factors as a Cause of Chronic Kidney Disease of Unknown Origin. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2734. [CrossRef]
- Kass, L.; Gomez, A.L.; Altamirano, G.A. Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2020**, *508*, 110789. [CrossRef] [PubMed]
- Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *268*, 157–177. [CrossRef]
- Bretveld, R.W.; Thomas, C.M.G.; Scheepers, E.T.J.; Zielhuis, G.A.; Roeleveld, N. Pesticide exposure: The hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2006**, *4*, 30. [CrossRef]
- Frazier, L.M. Reproductive Disorders Associated with Pesticide Exposure. *J. Agromed.* **2007**, *12*, 27–37. [CrossRef]
- Ma, Y.; He, X.; Qi, K.; Wang, T.; Qi, Y.; Cui, L.; Wang, F.; Song, M. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *J. Environ. Sci.* **2019**, *77*, 210–217. [CrossRef]
- Arnal, N.; Astiz, M.; de Alaniz, M.J.; Marra, C.A. Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 1779–1786. [CrossRef]

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ		
	ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	67/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 67/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



18. Manfo, F.P.T.; Mboe, S.A.; Nantia, E.A.; Ngoula, F.; Telefo, P.B.; Moundipa, P.F.; Cho-Ngwa, E. Evaluation of the Effects of Agro Pesticides Use on Liver and Kidney Function in Farmers from Buea, Cameroon. *J. Toxicol.* **2020**, *2020*, 1–10. [CrossRef]

19. Johnson, R.J.; Wesseling, C.; Newman, L.S. Chronic Kidney Disease of Unknown Cause in Agricultural Communities. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1843–1852. [CrossRef] [PubMed]

20. Bernieri, T.; Moraes, M.E.; Ardenghi, P.G.; Da Silva, L.B. Assessment of DNA damage and cholinesterase activity in soybean farmers in southern Brazil: High versus low pesticide exposure. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2019**, *55*, 355–360. [CrossRef]

21. Ellman, G.L.; Courtney, K.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95. [CrossRef]

22. Guimarães, A.; De Assis, H.S.; Boeger, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2007**, *68*, 57–62. [CrossRef]

23. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *RNA Intery.* **1990**, *186*, 407–421. [CrossRef]

24. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.-G.; Ahn, B.-W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464–478. [CrossRef]

25. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef]

26. Adedeji, A.O.; Pourmohamad, T.; Chen, Y.; Burkey, J.; Bickerton, S.J.; Sonee, M.; McDuffie, J.E. Investigating the Value of Urine Volume, Creatinine, and Cystatin C for Urinary Biomarkers Normalization for Drug Development Studies. *Int. J. Toxicol.* **2019**, *38*, 12–22. [CrossRef]

27. Analytical Methods Committee. Using the Grubbs and Cochran tests to identify outliers. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7948–7950. [CrossRef] [PubMed]

28. Dhananjayan, V.; Ravichandran, B.; Panjakumar, K.; Kalaiselvi, K.; Rajasekar, K.; Mala, A.; Avinash, G.; Shridhar, K.; Manju, A.; Wilson, R. Assessment of genotoxicity and cholinesterase activity among women workers occupationally exposed to pesticides in tea garden. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2019**, *841*, 1–7. [CrossRef]

29. Vikkey, H.A.; Fidel, D.; Elisabeth, Y.P.; Hilaire, H.; Hervé, L.; Badirou, A.; Alain, K.; Parfait, H.; Fabien, G.; Benjamin, F. Risk Factors of Pesticide Poisoning and Pesticide Users' Cholinesterase Levels in Cotton Production Areas: Glazoué and Savé Townships, in Central Republic of Benin. *Environ. Health Insights* **2017**, *11*. [CrossRef]

30. Zepeda-Arce, R.; Rojas-García, A.E.; Benitez-Trinidad, A.; Herrera-Moreno, J.E.; Medina-Díaz, I.M.; Barrón-Vivanco, B.S.; Villegas, G.P.; Hernández-Ochoa, L.; Heredia, M.D.J.S.; Bernal-Hernández, Y.Y. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. *Environ. Toxicol.* **2017**, *32*, 1754–1764. [CrossRef] [PubMed]

31. Hassanin, N.M.; Awad, O.M.; El-Fiki, S.; Abou-Shanab, R.A.I.; Abou-Shanab, A.R.A.; Amer, R.A. Association between exposure to pesticides and disorder on hematological parameters and kidney function in male agricultural workers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 30802–30807. [CrossRef] [PubMed]

32. Prudente, I.R.G.; Cruz, C.L.; Nascimento, L.D.C.; Kaiser, C.C.; Guimarães, A.G. Evidence of risks of renal function reduction due to occupational exposure to agrochemicals: A systematic review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *63*, 21–28. [CrossRef]

33. Sine, H.; El Grafel, K.; Alkhamal, S.; Achbani, A.; Filali, K. Serum cholinesterase biomarker study in farmers—Souss Massa region-, Morocco: Case-control study. *Biomarkers* **2019**, *24*, 771–775. [CrossRef]

34. Valcke, M.; Levasseur, M.-E.; Da Silva, A.S.; Wesseling, C. Pesticide exposures and chronic kidney disease of unknown etiology: An epidemiologic review. *Environ. Health* **2017**, *16*, 1–20. [CrossRef]

35. Bagshaw, S.M.; Bellomo, R. Early diagnosis of acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit. Care* **2007**, *13*, 638–644. [CrossRef]

36. Bonventre, J.V.; Vaidya, V.S.; Schmodder, R.; Feig, P.; Dieterle, F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 436–440. [CrossRef] [PubMed]

37. Sirota, J.C.; Klawitter, J.; Edelstein, C.L. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *J. Toxicol.* **2011**, *2011*, 328120. [CrossRef]

38. Vaidya, V.S.; Ferguson, M.A.; Bonventre, J.V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *48*, 463–493. [CrossRef]

39. Waikar, S.S.; Bonventre, J.V. Biomarkers for the Diagnosis of Acute Kidney Injury. *Nephron* **2008**, *109*, c192–c197. [CrossRef]

40. Casanova, A.G.; Vicente-Vicente, L.; Hernández-Sánchez, M.T.; Prieto, M.; Rihuete, M.I.; Ramis, L.M.; Del Barco, E.; Cruz, J.J.; Ortiz, A.; Cruz-González, L.; et al. Urinary transferrin pre-emptively identifies the risk of renal damage posed by subclinical tubular alterations. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *121*, 109684. [CrossRef]

41. Vicente-Vicente, L.; Sánchez-Juanes, F.; García-Sánchez, O.; Blanco-Gozalo, V.; Pescador, M.; Sevilla, M.A.; González-Buitrago, J.M.; López-Hernández, F.J.; López-Novoa, J.M.; Morales, A.I. Sub-nephrotoxic cisplatin sensitizes rats to acute renal failure and increases urinary excretion of fumarylacetoacetase. *Toxicol. Lett.* **2015**, *234*, 99–109. [CrossRef]

42. Vicente-Vicente, L.; Ferreira, L.; González-Buitrago, J.M.; López-Hernández, F.J.; Lopez-Novoa, J.M.; Morales, A.I. Increased urinary excretion of albumin, hemopexin, transferrin and VDBP correlates with chronic sensitization to gentamicin nephrotoxicity in rats. *Toxicology* **2013**, *304*, 83–91. [CrossRef] [PubMed]

43. Yu, S.M.-W.; Bonventre, J.V. Acute kidney injury and maladaptive tubular repair leading to renal fibrosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2020**, *29*, 310–318. [CrossRef]

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	68/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001		12/12/2023 12:36	PÁGINA 68/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



44. Orantes-Navarro, C.M.; Herrera-Valdés, R.; Almaguer-López, M.; López-Marín, L.; Vela, X.; Hernandez-Cuchillas, M.; Barba, I.M. Toward a Comprehensive Hypothesis of Chronic Interstitial Nephritis in Agricultural Communities. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2017**, *24*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Santarpia, L.; Grandone, I.; Contaldo, E.; Pisanisi, F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: A review of the literature. *J. Cachex. Sarcopenia Muscle* **2012**, *4*, 31–39. [[CrossRef](#)]
46. Lukaszewicz-Hussain, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2010**, *98*, 145–150. [[CrossRef](#)]

Nº Reg. Entrada: 2023999014892992. Fecha/Hora: 12/12/2023 12:36:55

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	69/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 69/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO-INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Donación de un cantidad de 25 mL de orina y 25 mL de sangre para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado "**Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud**," con el fin de valorar la exposición a estos tóxicos durante el trabajo normal de recolección de aceitunas. Las muestras una vez obtenidas serán analizadas en los laboratorios del Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla.

Importancia:

Este estudio podrá contribuir a:

Responder a través de estudios objetivos si el tiempo de espera que establece el fabricante es suficiente no sólo para el alimento sino también para aquellos trabajadores encargados de su recolección y manipulación. Para ello nos centraremos en la población trabajadora del olivar. De esta forma una vez obtenidos los resultados del estudio se podrá proporcionar la base para una mejora en la protección de los trabajadores.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- Una vez finalizado el desarrollo del proyecto la muestra será destruida según el plan de contingencia.
- Este proyecto cuenta con el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Sevilla

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Las muestras de orina se tomarán antes, durante y a la finalización de la recolección, la toma de muestra es no invasiva, por lo que no supondrá ningún riesgo/inconveniente para la participante. Las muestras de sangre se tomarán en el mismo momento que las de orina, serán tomadas por personal especialista y sólo la cantidad mínima necesaria para llevar a cabo los estudios planteados en el proyecto, no suponiendo ningún riesgo para la participante.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con la ip del proyecto Isabel M. Moreno.

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	70/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 70/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

“BIOMONITORIZACIÓN DE COBRE EN AGRICULTORES Y RELACIÓN CON SU SALUD”

Yo _____ (Nombre _____ y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio **“Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud,”**
- He recibido suficiente información sobre el estudio **“Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud,”**.
- He hablado con el profesional sanitario informador: Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de los datos que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* **“Biomonitorización de cobre en agricultores y relación con su salud,”**

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
informador

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

Código Seguro De Verificación	/9gxjds7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO		
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjds7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	71/79



JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 71/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHFK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

ANEXO III. Cuestionario epidemiológico entregado a todos los participantes de este estudio

POR FAVOR LEA CON ATENCIÓN LAS PREGUNTAS DEL SIGUIENTE CUESTIONARIO. EL USO DEL MISMO ES CONFIDENCIAL Y FORMA PARTE DE UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

AÑO DE NACIMIENTO:

CÓDIGO ALFANUMÉRICO IDENTIFICATIVO:

A. DATOS DE CLASIFICACIÓN

Lugar de nacimiento

- España 1
- Resto de Europa 2
- Centroamérica/Suramérica 3
- Magreb (Norte de África) 4
- Resto del mundo (especifique) 5

Lugar de residencia

- Comarca de Estepa (especifique) _____ 1
- Comarca de Antequera (especifique) _____ 2
- Comarca Puente Genil (especifique) _____ 3
- Otras (especifique) _____ 4

Tiempo de residencia en dicho lugar

- Menos de 5 años 1
- Más de 5 años 2

Edad

- Fecha de nacimiento _____

B. DATOS PERSONALES

Estado civil

- Soltero 1
- Casado 2
- Pareja de hecho 3

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	72/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 72/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

- Divorciado 4
- Viudo 5

Nivel de estudios

- No sabe leer ni escribir 1
- Estudios primarios incompletos 2
- Estudios primarios completos 3
- Estudios de secundaria incompletos 4
- Estudios de secundaria completos 5
- Estudios de Grado Medio FP 6
- Estudios de Grado Superior FP 7
- Estudios Universitarios 8
- Doctorado 9
- Estudios oficiales de especialización 10
- Ns/Nc 11

Consumo de Tabaco

- no fumador 1
- ex -fumador 2
- fumador (especifique nº cigarros al día)_____ 3
- fumador pasivo 4

Consumo de Alcohol

- no consumidor de alcohol 1
- consumidor esporádico (celebraciones...) 2
- consumidor habitual de fin de semana 3
- consumidor diario de alcohol (cervezas, vino, otros) 4

Actividad deportiva

- Sedentario 1
- Esporádico 2
- Activo (gimnasio, running, caminar...) 3

Exposición en el hogar relacionada con plaguicidas

- Empleo de repelentes sobre la piel 1
- Empleo de insecticidas en spray 2
- Empleo de insecticida líquido en enchufes 3
- Empleo de insecticida en pastillas en enchufes 4
- Otros 5

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	73/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 73/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Ventilación del hogar

- Diaria 1
- Cada dos días 2
- Semanal 3
- Esporádica 4

C. DATOS LABORALES

Sector actividad

- Agrícola 1
- Fábrica 2
- Otra (especifique)_____ 3

Antigüedad en el sector de actividad

- Menos de cinco años 1
- Entre cinco y diez años 2
- Más de diez años 3

Jornada de Trabajo

- Jornada reducida/media jornada 1
- Jornada partida (mañana y tarde) 2
- Horario irregular 3
- Jornada continua de mañana 4
- Jornada continua de tarde 5
- Turnos rotatorios 6

Uso de medidas de prevención

- Guantes 1
- Mascarilla 2
- Ambos 3
- Ninguna 4
- Otras 5

D. HÁBITOS ALIMENTICIOS

¿Qué tipo de alimentación sigue?

- Alimentación equilibrada 1
- Dieta rica en grasas 2

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	74/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 74/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

- Dieta rica en Hidratos de Carbono 3
 - Vegetariana 4
 - Otro tipo de dieta 5
- ¿Consume alimentos ecológicos en general?**
- Sí, siempre 1
 - Sí, algunas veces 2
 - Nunca 3
- ¿Consume frutas o zumos de frutas ecológicos?**
- Sí, siempre 1
 - Sí, algunas veces 2
 - Nunca 3
- ¿Cuántas frutas consume al día?**
- 3 o más 1
 - 1 -2 veces 2
 - Ninguna
- ¿Consume verduras ecológicas?**
- Sí, siempre 1
 - Sí, algunas veces 2
 - Nunca 3
- ¿Cuántas verduras crudas o cocidas consume al día?**
- 2 o más 1
 - 1 vez 2
 - Ninguna 3
- ¿Cuántas veces a la semana consume legumbres?**
- (especifique nº) _____
- ¿Cuántas raciones de cereales/pan toma al día?**
- (especifique nº) _____
- ¿Cuántas raciones de patatas toma a la semana?**
- (especifique nº) _____
- ¿Cuántas raciones de arroz toma a la semana?**
- (especifique nº) _____

Código Seguro De Verificación	/9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxj5d7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	75/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 75/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

¿Cuántas raciones de pasta toma a la semana?

- (especifique nº) _____

¿Consumes habitualmente alimentos integrales (galletas con fibra, pan integral, etc.)?

- Si 1
- No 2

¿Cuántas veces toma lácteos al día?

- (especifique nº) _____
- _____

¿Cuántas veces por semana come carne magra?

- (especifique nº) _____

¿Cuántas veces por semana come carne grasa o embutidos?

- (especifique nº) _____

¿Cuántas veces por semana come pescado?

- (especifique nº) _____

¿Qué tipo de pescado consumes más frecuentemente?

- Pescado azul (atún, caballa, sardina...) 1
- Pescado blanco (dorada, lubina, merluza..) 2
- Mariscos y moluscos 3

¿Cuántos huevos consume a la semana?

- (especifique nº) _____

¿Qué tipo de aceite o grasa utiliza con más frecuencia para aliñar?

- Oliva 1
- Aceites de semilla 2
- Mantequilla/ margarina/ tocino/ sebo 3

¿Qué tipo de aceite o grasa utiliza con más frecuencia para cocinar?

- Oliva 1
- Aceites de semilla 2
- Mantequilla/ margarina/ tocino/ sebo 3

¿Cuántas veces al día consume azúcar o alimentos azucarados?

- (especifique nº) _____

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	76/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 76/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

¿Cuántos vasos de agua bebe al día?

- (especifique nº) _____

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	77/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 77/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

E. ANTECEDENTES PERSONALES

Señale si ha padecido alguna enfermedad:

- Neurológica: 1
- Cardio-vascular: 2
- Respiratoria: 3
- Digestiva: 4
- Hepática/Vesícula Biliar: 5
- Renal: 6
- Endocrinológica: 7
- Infecciosa: 8
- Osteo-Muscular: 9
- Reuma: 10
- Alergia (en caso afirmativo indique a qué): 11
- Dermatológica 12
- Ocular 13

Señale si alguna vez ha presentado alguna de las siguientes alteraciones

- elevación de glucosa 1
- tensión alta 2
- ataques epilépticos 3
- colesterol alto 4
- soplos cardíacos 5
- hernias 6
- ácido úrico alto 7
- Pérdida de conocimiento 8
- Dolor de cabeza 9
- Alteración del sueño 10
- Cansancio 11
- Anorexia 12
- Depresión 13
- Cambios de carácter 14
- Temblor 15
- Disminución de la libido 16

Indique alguna otra enfermedad o sintomatología que no se le haya preguntado y quiera destacar:

Código Seguro De Verificación	/9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjdsd7pMvVfYhyKl7vBA%3D%3D	Página	78/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 78/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHHK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			

Le han intervenido alguna vez de:

- amígdalas 1
- hernias 2
- vegetaciones 3
- cesáreas 4
- quistes 5
- apéndice 6
- fracturas 7
- OTRAS 8

Indique si está tomando alguna medicación en la actualidad:

Código Seguro De Verificación	/9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA==	Fecha	12/12/2023	
Firmado Por	JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ ISABEL MARIA MORENO NAVARRO			
Url De Verificación	https://pfirma.us.es/verifirma/code/%2F9gxjsd7pMvVfYhyK17vBA%3D%3D	Página	79/79	

JULIAN MARTINEZ FERNANDEZ cert. elec. repr. Q4118001I		12/12/2023 12:36	PÁGINA 79/79
VERIFICACIÓN	PEGVEXEKBAWEY73GEBX8FHKK289RJW	https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	
			