



Casa abierta al tiempo

## **UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO: CIENCIAS DE LA SALUD**

Julio 6, 2026.

**DRA. EDITH ARENAS RÍOS**  
**PRESIDENTA DEL CONSEJO DIVISIONAL**  
**P R E S E N T E**

Los miembros de la **Comisión Encargada de Revisar las Solicitudes para adquirir Nuevamente la Calidad de Alumno**, con base en el artículo 49 del Reglamento de Estudios Superiores, a nivel posgrado, después de haber analizado la documentación correspondiente, emitimos el siguiente:

### **D I C T A M E N**

**ÚNICO:** Se recomienda al Consejo Divisional sea aceptado como alumno a:

**Nombre: Q.F.B. Mario Alberto Gómez Martínez**

**Posgrado: Maestría en Biología Experimental**

**Matrícula: 2183801856**

**Otorgar prórroga de: Tres trimestres**

**A partir del trimestre: 26-O**

para concluir sus estudios y obtener el grado correspondiente.

**A t e n t a m e n t e .**  
**CASA ABIERTA AL TIEMPO**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. San Rafael Atlixco N0 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F., A.P. 55-535



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

### DEPARTAMENTO: CIENCIAS DE LA SALUD

HOJA 2/2 DEL DICTAMEN DE LA COMISIÓN ENCARGADA DE REVISAR LAS SOLICITUDES PARA ADQUIRIR NUEVAMENTE LA CALIDAD DE ALUMNO (A).

**Q.F.B. Mario Alberto Gómez Martínez**

**Matrícula: 2183801856**

**Maestría en Biología Experimental**

### MIEMBROS DE LA COMISIÓN

**DR. JULIO CÉSAR ALMANZA PÉREZ**

Jefe del Departamento de  
Ciencias de la Salud

**DRA. ELSA CERVANTES RÍOS**

Representante Académico del  
Departamento de Ciencias de la Salud

**SR. ANDRÉ SANTOS SANDOVAL**

Representante Alumno del  
Departamento de Ciencias de la Salud

ASESOR

**DR. IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO**

Coordinador del Posgrado en Biología Experimental

### COORDINADORA

**DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTÍNEZ**

### UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco N0 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F., A.P. 55-535

Ciudad de México, a 02 de julio de 2026

**ASUNTO: Solicitud de recuperación de la calidad de alumno**

**DRA. EDITH ARENAS RÍOS**

**PRESIDENTA DEL CONSEJO DIVISIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA**

**P R E S E N T E**

Por medio de la presente, yo, Mario Alberto Gómez Martínez, con matrícula 2183801856, alumno de la Maestría en Biología Experimental, solicito atentamente la recuperación de mi calidad de alumno, de conformidad con lo establecido en los artículos 45 y 46 del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana.

La presente solicitud tiene como finalidad que pueda realizar mi inscripción en el trimestre 26-O y continuar con los trámites académicos y administrativos necesarios para la obtención del grado de Maestro en Biología Experimental.

Hago de su conocimiento que el documento final de mi tesis ya fue revisado y aprobado por los integrantes de mi Comité Tutorial, por lo que me encuentro en condiciones de iniciar formalmente el proceso de titulación. La recuperación de mi calidad de alumno resulta indispensable para poder efectuar la inscripción correspondiente y cumplir con los requisitos institucionales para la presentación del examen de grado.

Por lo anterior, solicito respetuosamente al Consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud que autorice la recuperación de mi calidad de alumno, a fin de concluir satisfactoriamente el programa de posgrado y obtener el grado académico correspondiente.

Sin otro particular, agradezco de antemano la atención brindada a la presente solicitud y quedo atento a la resolución que tenga a bien emitir ese órgano colegiado.

ATENTAMENTE

“Casa abierta al tiempo”

Mario Alberto Gómez Martínez

Matrícula: 2183801856

Maestría en Biología Experimental



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad IztapalapaConstancia  
Hoja1  
1**SITUACION ACADEMICA - ESCOLAR PARA SOLICITAR  
PRORROGA ANTE EL CONSEJO DIVISIONAL (ART. 49 R.E.S.)**Nombre del alumno : **GOMEZ MARTINEZ MARIO ALBERTO**Matrícula : **2183801856**División : CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD  
Plan de estudios : BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Nivel: MAESTRIA

Estado actual del alumno : BAJA REGLAMENTARIA  
 Motivo de baja : ART. 16 FRACC. III DEL RES (VENCIMIENTO DEL PLAZO MAXIMO)  
 Trimestre de baja : 26I (19/Ene/2026 al 15/Abr/2026)  
 Ultimo trimestre de reinscripción : 25O (01/Oct/2025 al 19/Dic/2025)  
 Ultimo trim. con actividad académica : 20P (31/Ago/2020 al 23/Nov/2020)  
 Créditos del nivel : 216 doscientos dieciséis  
 Créditos cubiertos : 176 ciento setenta y seis  
 Créditos a cubrir : 40 cuarenta  
 Porcentaje de créditos cubiertos : 81.5 % Porcentaje de créditos a cubrir: 18.5 %

| Nivel<br>A.C.   | Nombre                                                                          | Créditos: A cubrir |     |     | Cubiertos |     |     | No cubiertos |     |     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----|-----|-----------|-----|-----|--------------|-----|-----|
|                 |                                                                                 | Obl                | Opt | Tot | Obl       | Opt | Tot | Obl          | Opt | Tot |
| 1               | TEORICO-PRACTICAS                                                               | 78                 | 0   | 78  | 78        | 0   | 78  | 0            | 0   | 0   |
| 2               | DE ESPECIALIZACION                                                              | 30                 | 0   | 30  | 30        | 0   | 30  | 0            | 0   | 0   |
| 3               | DE INVESTIGACION                                                                | 68                 | 0   | 68  | 68        | 0   | 68  | 0            | 0   | 0   |
| **              | PRESENTACION DE LA IDONEA<br>COMUNICACION DE RESULTADOS Y EL<br>EXAMEN DE GRADO |                    |     | 40  |           |     |     |              |     | 40  |
| <b>Totales:</b> |                                                                                 | 176                | 0   | 216 | 176       | 0   | 176 | 0            | 0   | 40  |

Se muestra la historia académica vigente a continuación

| No. | UEA     | Gpo./Jdo. |                                             | Créd. | Eval. | Trim. | Cal. |
|-----|---------|-----------|---------------------------------------------|-------|-------|-------|------|
| 1   | 2316042 | BO16      | BIOLOGIA CELULAR                            | 18    | GLO.  | 180   | MB   |
| 2   | 2316047 | BR16C     | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL I   | 10    | GLO.  | 190   | MB   |
| 3   | 2316049 | BS16D     | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL II  | 10    | GLO.  | 20I   | MB   |
| 4   | 2316051 | BT16      | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL III | 10    | GLO.  | 20P   | MB   |
| 5   | 2316054 | BP16      | BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I           | 18    | GLO.  | 19I   | MB   |
| 6   | 2316055 | BQ16      | BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II          | 18    | GLO.  | 19P   | MB   |
| 7   | 2316056 | BQ16      | TEMAS SELECTOS DE FISIOLOGIA                | 12    | GLO.  | 19P   | MB   |
| 8   | 2316057 | BO16      | ANALISIS BIOESTADISTICO                     | 12    | GLO.  | 180   | MB   |
| 9   | 2316058 | BP16      | METODO EXPERIMENTAL                         | 8     | GLO.  | 19I   | MB   |
| 10  | 2316059 | BR16F     | TRABAJO EXPERIMENTAL I                      | 20    | GLO.  | 190   | MB   |
| 11  | 2316060 | BS16F     | TRABAJO EXPERIMENTAL II                     | 20    | GLO.  | 20I   | MB   |
| 12  | 2316061 | BT16F     | TRABAJO EXPERIMENTAL III                    | 20    | GLO.  | 20P   | MB   |

**UEA Aprobadas**

| No. | UEA     | Gpo./Jdo. |                  | Créd. | Eval. | Trim. | Cal. |
|-----|---------|-----------|------------------|-------|-------|-------|------|
| 1   | 2316042 | BO16      | BIOLOGIA CELULAR | 18    | GLO.  | 180   | MB   |



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Constancia  
Hoja

1  
2

### SITUACION ACADEMICA - ESCOLAR PARA SOLICITAR PRORROGA ANTE EL CONSEJO DIVISIONAL (ART. 49 R.E.S.)

Nombre del alumno : GOMEZ MARTINEZ MARIO ALBERTO

Matrícula : 2183801856

| No. | UEA     | Grupo |                                                | Créditos | Eval. | Trim. | Cal. |
|-----|---------|-------|------------------------------------------------|----------|-------|-------|------|
| 2   | 2316047 | BR16C | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL I      | 10       | GLO.  | 190   | MB   |
| 3   | 2316049 | BS16D | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL II     | 10       | GLO.  | 20I   | MB   |
| 4   | 2316051 | BT16  | TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL<br>III | 10       | GLO.  | 20P   | MB   |
| 5   | 2316054 | BP16  | BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I              | 18       | GLO.  | 19I   | MB   |
| 6   | 2316055 | BQ16  | BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II             | 18       | GLO.  | 19P   | MB   |
| 7   | 2316056 | BQ16  | TEMAS SELECTOS DE FISIOLOGIA                   | 12       | GLO.  | 19P   | MB   |
| 8   | 2316057 | BO16  | ANALISIS BIOESTADISTICO                        | 12       | GLO.  | 180   | MB   |
| 9   | 2316058 | BP16  | METODO EXPERIMENTAL                            | 8        | GLO.  | 19I   | MB   |
| 10  | 2316059 | BR16F | TRABAJO EXPERIMENTAL I                         | 20       | GLO.  | 190   | MB   |
| 11  | 2316060 | BS16F | TRABAJO EXPERIMENTAL II                        | 20       | GLO.  | 20I   | MB   |
| 12  | 2316061 | BT16F | TRABAJO EXPERIMENTAL III                       | 20       | GLO.  | 20P   | MB   |

Requisitos que adeuda para concluir el nivel

| Requisito                                                                 | Créditos |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|
| PRESENTACION DE LA IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS Y EL EXAMEN DE GRADO | 40       |

El Plan de Estudios no cuenta con créditos optativos.

Las siguientes cantidades son obtenidas únicamente en base a las ueas que contiene el plan de estudios del alumno.

Unidades de Enseñanza Aprendizaje aprobadas con MB : 12

Considerando la equivalencia numérica del sistema de calificación de la Universidad, determinada mediante el acuerdo 91.8 del colegio académico, donde se establece que MB=10.0, B=8.0, S=6.0 y NA(No acreditada) Carece de equivalencia numérica; se señala que el alumno tiene un promedio de: 10.0



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Constancia  
Hoja

1  
3

**SITUACION ACADEMICA - ESCOLAR PARA SOLICITAR  
PRORROGA ANTE EL CONSEJO DIVISIONAL (ART. 49 R.E.S.)**

Nombre del alumno : GOMEZ MARTINEZ MARIO ALBERTO

Matrícula : 2183801856

No. UEA Grupo

Créditos Eval. Trím. Cal.

OBSERVACIONES:

ADEUDA LA PRESENTACIÓN Y DEFENSA DE UNA IDONEA COMUNICACIÓN  
DE RESULTADOS CON VALOR A 40 CREDITOS EN EXAMEN DE GRADO.

A solicitud del interesado y para los fines que estime conveniente, se extiende la presente en la Ciudad de México a los dos días del mes de julio del año dos mil veintiseis.

Atentamente  
Casa abierta al tiempo



**MTRO. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ**  
COORDINADOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Ciudad de México, a 02 de julio de 2026

**ASUNTO: Solicitud de recuperación de la calidad de alumno**

**DRA. EDITH ARENAS RÍOS**

**PRESIDENTA DEL CONSEJO DIVISIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA  
P R E S E N T E**

Por medio de la presente, quienes integramos el **Comité Tutorial del alumno Mario Alberto Gómez Martínez**, con matrícula **2183801856**, inscrito en la **Maestría en Biología Experimental**, solicitamos atentamente la **recuperación de su calidad de alumno**, de conformidad con lo establecido en los artículos 45 y 46 del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana.

La presente solicitud tiene como finalidad que el alumno pueda realizar su inscripción en el trimestre **26-O** y continuar con los trámites académicos y administrativos necesarios para la obtención del grado de Maestro en Biología Experimental.

Hacemos constar que los integrantes de este Comité Tutorial hemos revisado el documento final de la tesis presentada por el alumno y consideramos que cumple satisfactoriamente con los requisitos académicos y científicos correspondientes. En consecuencia, el trabajo de tesis ha sido aprobado por este Comité Tutorial y el alumno se encuentra en condiciones de iniciar formalmente el proceso de titulación.

Por lo anterior, solicitamos respetuosamente al Consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud que autorice la recuperación de la calidad de alumno de **Mario Alberto Gómez Martínez**, a fin de que pueda inscribirse en el trimestre 26-O, presentar su examen de grado y concluir satisfactoriamente el programa de posgrado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención brindada a la presente solicitud y quedamos atentos a la resolución que tenga a bien emitir ese órgano colegiado.

**ATENTAMENTE**

**“Casa abierta al tiempo”**

**COMITÉ TUTORIAL**

**Dr. ~~Iván Uriel~~ Bahena Ocampo.**  
**Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I**  
**Codirector interno**

**Dr. ~~Pedro Rafael~~ Valencia Quintana**  
**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Codirector externo**

**Dr. Francisco José Fernández Perrino**  
**Departamento de Biotecnología, UAM-I**  
**Asesor**

# MARIO ALBERTO GÓMEZ MARTÍNEZ

---

## PERFIL ACADÉMICO Y PROFESIONAL

Químico Farmacéutico Biólogo egresado de la Facultad de Química de la UNAM y estudiante de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Cuenta con más de diez años de experiencia en biología molecular, diagnóstico in vitro, inmunogenética, enfermedades infecciosas, oncología molecular y tecnologías de secuenciación. Es cofundador y director general de Laboratorios Rosalind, donde integra la dirección científica, operativa y estratégica con el desarrollo e implementación de servicios de diagnóstico molecular.

## FORMACIÓN ACADÉMICA

**Maestría en Biología Experimental | Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa · 2018 - proceso de obtención del grado**

- Tesis: "Perfil de microRNAs en epitelio bucal de aplicadores de agroquímicos como firma de exposición crónica".
- Documento final revisado y aprobado por el Comité Tutorial para iniciar el proceso de titulación.

**Químico Farmacéutico Biólogo | Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México · 2015**

- Formación orientada a biología molecular, diagnóstico clínico, inmunogenética y trasplantes.

**Diplomado en Dirección y Desarrollo de Nuevos Negocios | Instituto Tecnológico Autónomo de México · 2021**

**Programa de inglés nivel intermedio superior | University of Regina, Canadá**

## INVESTIGACIÓN Y TESIS DE MAESTRÍA

Proyecto de investigación enfocado en la evaluación del perfil de microRNAs en células de epitelio bucal de trabajadores con exposición ocupacional crónica a agroquímicos, mediante integración de información epidemiológica, análisis de expresión y validación molecular.

- Diseño y análisis comparativo de grupos expuestos y no expuestos a agroquímicos.
- Análisis de perfiles de microRNAs mediante secuenciación de nueva generación y selección de candidatos diferenciales.
- Validación de candidatos mediante RT-qPCR y análisis de variables ocupacionales y de exposición.
- Intereses de investigación: biomarcadores moleculares, diagnóstico traslacional, exposición ambiental, enfermedades infecciosas, inmunogenética, oncología molecular y secuenciación de lecturas largas.

## EXPERIENCIA PROFESIONAL

**Cofundador y Director General | Laboratorios Rosalind, Ciudad de México · Actualidad**

- Dirección científica, operativa y comercial de un laboratorio especializado en diagnóstico molecular y medicina traslacional.
- Desarrollo e implementación de servicios en salud sexual, VPH, enfermedades infecciosas, seguimiento molecular postrasplante, HLA, oncología, cáncer hereditario, microbiología molecular y secuenciación de nueva generación.
- Coordinación de proyectos de validación, control de calidad, elaboración de reportes, soporte técnico, capacitación y colaboración con laboratorios, hospitales, clínicas y profesionales de la salud.
- Participación en una operación que ha procesado más de 100,000 estudios de biología molecular y en alianzas internacionales de bioinformática, oncología de precisión y diagnóstico traslacional.

**Asesor científico en biología molecular | ABALAT, Ciudad de México**

- Asesoría y capacitación a laboratorios clínicos y de investigación en implementación de metodologías de biología molecular, solución de problemas y optimización de flujos de trabajo.
- Soporte en genotipificación HLA por PCR-SSO/PCR-SSP y Luminex, anticuerpos anti-HLA, cargas virales asociadas a trasplante, ensayos multiplex, genotipificación eritrocitaria y antígenos plaquetarios.

**Especialista de aplicaciones | Abbott, México**

- Capacitación, puesta en marcha y soporte de plataformas de química clínica, inmunoensayo y hematología, incluidos sistemas ARCHITECT c/i y analizadores CELL-DYN.

**Prácticas profesionales - Inmunogenética y trasplantes | Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México**

- Extracción de ADN, tipificación HLA por PCR-SSO/PCR-SSP, detección de anticuerpos y elaboración de reportes para programas de trasplante de órgano sólido y progenitores hematopoyéticos.

DOCENCIA Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

- Tutor de estudiantes de la Facultad de Química de la UNAM en estancias profesionales, proyectos aplicados y entrenamiento en técnicas de laboratorio.
- Acompañamiento de tesis y jóvenes en formación dentro de Laboratorios Rosalind en proyectos de biología molecular, diagnóstico y desarrollo tecnológico.
- Participación como tutor en el programa Jóvenes Construyendo el Futuro y como co-mentor de POSIBLE Salud & Biotech 2026.

PARTICIPACIÓN INTERNACIONAL, LIDERAZGO Y RECONOCIMIENTOS

Young Leaders of the Americas Initiative (YLAI) Fellow y Alumni | U.S. Department of State / IREX · 2026

- Seleccionado para la cohorte 2026 de emprendedores y líderes emergentes de América Latina, el Caribe y Canadá.
- Estancia profesional en Tulane Center for Aging, Tulane School of Medicine, Nueva Orleans, enfocada en ciencia traslacional, innovación, comercialización y colaboración internacional en diagnóstico molecular.
- Interacción con equipos clínicos y de innovación de Ochsner Health en trasplantes, enfermedades infecciosas, tecnologías emergentes y medicina traslacional.

Finalista E-100 | Asociación de Emprendedores de México (ASEM) · 2024

Participante POSIBLE Camp | POSIBLE · 2023

Co-mentor, POSIBLE Salud & Biotech | POSIBLE · 2026

PROYECTOS CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS SELECCIONADOS

- Desarrollo y estandarización de pruebas moleculares para detección de patógenos, VPH, infecciones de transmisión sexual y vigilancia viral en pacientes trasplantados.
- Implementación de flujos de secuenciación Oxford Nanopore para análisis de BRCA1/BRCA2 mediante PCR de largo alcance y análisis de variantes.
- Diseño de ensayos de detección molecular con CRISPR-Cas12a para citomegalovirus y otros agentes infecciosos.
- Desarrollo de estrategias de secuenciación de amplicones 16S e ITS para identificación microbiana y análisis metagenómico.
- Evaluación e implementación de sistemas de calidad, documentación técnica, validación de métodos y formatos de reporte para pruebas desarrolladas en laboratorio.

COMPETENCIAS TÉCNICAS

| Área                           | Experiencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biología molecular             | PCR convencional, PCR de largo alcance, RT-PCR, qPCR, extracción de ADN/ARN, diseño y optimización de ensayos.<br>HLA por PCR-SSO/PCR-SSP y Luminex, anticuerpos anti-HLA, PRA y antígeno único.<br>NGS, Oxford Nanopore, alineamiento, análisis de variantes, interpretación y revisión de datos moleculares.<br>Enfermedades infecciosas, VPH e ITS, seguimiento postrasplante, oncología molecular y cáncer hereditario.<br>Validación de métodos, control de calidad, documentación, capacitación, gestión de proyectos y alianzas institucionales. |
| Inmunogenética                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Secuenciación y bioinformática |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Diagnóstico molecular          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Calidad y gestión              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

IDIOMAS

- Español: lengua materna.
- Inglés: C1, con experiencia profesional en entornos internacionales.

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA Y PARTICIPACIÓN ACADÉMICA SELECCIONADA

- Illumina Genomics Forum, San Diego, Estados Unidos - 2022.
- Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, San Luis Potosí, México - 2022.
- Clinical Research Insider Summit, Cancún, México - 2023.

*Curriculum vitae sin comprobantes, elaborado para trámite académico. Última actualización: julio de 2026.*

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SPN) de la SECIHTI, registro 001481, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 2018-000068-02NACF-30144

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

**“Perfil de microRNAs en epitelio bucal de aplicadores de agroquímicos como firma de exposición crónica”,**

que presentó

Mario Alberto Gómez Martínez

El día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_

Sinodales (Nombre, adscripción y firma de cada uno):

<<Presidente>>

<<Secretario>>

<<Vocal 1>>

<<Vocal 2>>

Miembros del Comité de tutores, tipo de participación y adscripción.

~~Codirector~~ Interno

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I

~~Codirector~~ Externo

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Asesor

Dr. Francisco José Fernández Perrino

**Departamento de Biotecnología, UAM-I**

## **Perfil de microRNAs en epitelio bucal de aplicadores de agroquímicos como firma de exposición crónica.**

La exposición ocupacional crónica a agroquímicos representa un grave riesgo para la salud de los trabajadores agrícolas, asociándose con enfermedades crónicas y degenerativas. Tradicionalmente, el monitoreo toxicológico se ha basado en biomarcadores de efecto tardío, por lo que existe una necesidad crítica de identificar marcadores predictivos tempranos. Los microRNAs (miRNAs), reguladores epigenéticos de la expresión génica, son altamente sensibles a estresores ambientales y emergen como candidatos ideales.

Este estudio evaluó el efecto de la exposición crónica a mezclas de agroquímicos sobre el perfil de expresión de miRNAs extraídos mediante hisopado bucal, una matriz biológica no invasiva y de primer contacto. Se analizó una muestra de 20 individuos (10 trabajadores expuestos en Michoacán y 10 controles no expuestos) mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y posterior validación por RT-qPCR de dos candidatos seleccionados: miR-486-5p y miR-26a-5p.

Los resultados de la fase de secuenciación (NGS) mostraron patrones de expresión diferenciales, con una tendencia global hacia la subexpresión de miRNAs en el grupo expuesto. El análisis funcional asoció estos perfiles con alteraciones en rutas moleculares clave, como la interacción célula-matriz y las vías de señalización celular relacionadas con la respuesta al estrés y control del destino celular. Sin embargo, la validación por RT-qPCR no arrojó diferencias estadísticamente significativas para los

candidatos evaluados, lo cual se atribuye al tamaño reducido de la muestra y a la heterogeneidad biológica intragrupal.

En conclusión, aunque los resultados son de naturaleza exploratoria, el estudio demuestra la viabilidad del epitelio bucal como matriz para el biomonitorio y sugiere que la exposición a pesticidas modifica las redes regulatorias de miRNAs. Se requiere investigación futura con cohortes más amplias para validar estos hallazgos y consolidar a los miRNAs como biomarcadores tempranos en la medicina ocupacional.

## **MicroRNA profile in the buccal epithelium of agrochemical applicators as a signature of chronic exposure**

Chronic occupational exposure to agrochemicals poses a severe health risk to agricultural workers, being associated with chronic and degenerative diseases. Traditionally, toxicological monitoring has relied on late-stage effect biomarkers, creating a critical need to identify early predictive markers. MicroRNAs (miRNAs), epigenetic regulators of gene expression, are highly sensitive to environmental stressors and emerge as ideal candidates.

This study evaluated the effect of chronic exposure to agrochemical mixtures on the expression profile of miRNAs extracted via buccal swabs, a non-invasive and primary-contact biological matrix. A sample of 20 individuals (10 exposed workers in Michoacán and 10 unexposed controls) was analyzed using Next-Generation Sequencing (NGS), followed by RT-qPCR validation of two selected candidates: miR-486-5p and miR-26a-5p.

The sequencing phase (NGS) results revealed differential expression patterns, showing a global trend toward miRNA underexpression in the exposed group. Functional analysis linked these profiles to alterations in key molecular pathways, such as cell-matrix interactions and cell signaling pathways related to stress response and cell fate control. However, RT-qPCR validation did not yield statistically significant differences for the evaluated candidates, which is attributed to the small sample size and intra-group biological heterogeneity.

In conclusion, although the findings are exploratory, the study demonstrates the feasibility of using buccal epithelium as a biomonitoring matrix and suggests that pesticide exposure modifies miRNA regulatory networks. Future research with larger cohorts is required to validate these findings and consolidate miRNAs as early biomarkers in occupational medicine.

## Índice

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción</b>                                  | <b>10</b> |
| <b>2. Marco teórico / Antecedentes</b>                  | <b>14</b> |
| 2.1. Agroquímicos y exposición ocupacional              | 14        |
| 2.2. Efectos biológicos de los plaguicidas              | 15        |
| 2.3. MicroRNAs y regulación epigenética                 | 17        |
| 2.4. Evidencia previa de miRNAs asociados a plaguicidas | 18        |
| 2.5. Hisopado bucal como matriz para biomonitoreo       | 20        |
| 2.6. Perfilamiento de miRNAs por NGS                    | 21        |
| <b>3. Justificación</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>4. Hipótesis y objetivos</b>                         | <b>25</b> |
| 4.1. Hipótesis                                          | 25        |
| 4.2. Objetivo general                                   | 25        |
| 4.3. Objetivos particulares                             | 25        |
| <b>5. Materiales y métodos</b>                          | <b>26</b> |
| 5.1. Diseño del estudio                                 | 26        |
| 5.2. Población y grupos de comparación                  | 26        |
| 5.3. Encuestas y variables analizadas                   | 26        |
| 5.4. Obtención de muestras bucales                      | 28        |
| 5.5. Extracción de RNA                                  | 28        |
| 5.6. Small RNA-Seq                                      | 29        |
| 5.7. Análisis bioinformático                            | 29        |

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.8. Selección de candidatos</b>                        | <b>30</b> |
| <b>5.9. Validación por RT-qPCR</b>                         | <b>30</b> |
| <b>5.10. Análisis estadístico</b>                          | <b>32</b> |
| <b>6. Resultados</b>                                       | <b>32</b> |
| <b>6.1. Características de la población</b>                | <b>32</b> |
| <b>6.2. Hábitos, síntomas y exposición laboral</b>         | <b>34</b> |
| <b>6.3. Agroquímicos mencionados</b>                       | <b>38</b> |
| <b>6.4. Calidad de secuenciación</b>                       | <b>39</b> |
| <b>6.5. Perfil exploratorio de expresión de miRNAs</b>     | <b>41</b> |
| <b>6.6. Expresión diferencial y candidatos priorizados</b> | <b>45</b> |
| <b>6.7. Análisis funcional</b>                             | <b>46</b> |
| <b>6.8. Validación por RT-qPCR</b>                         | <b>50</b> |
| <b>7. Discusión</b>                                        | <b>52</b> |
| <b>8. Conclusiones</b>                                     | <b>61</b> |
| <b>9. Referencias</b>                                      | <b>65</b> |

## 1. Introducción

La agricultura actual se basa principalmente en el uso eficiente de agroquímicos para satisfacer la demanda mundial de alimentos, preservar los cultivos y promover la productividad agrícola. Los pesticidas, como el principal tipo de agroquímicos, son compuestos destinados a la erradicación, repulsión, represión o inhibición de insectos, malezas y hongos (OMS, 2020; Moreira et al., 2025). Aunque ha sido la base de la mejora agrícola y la eliminación de portadores de enfermedades, un gran número de compuestos pesticidas han sido sistemática y continuamente rociados y esparcidos sobre el medio ambiente, creando un grave riesgo para la salud humana y la industria (Valbuena et al., 2020). Los seres humanos están inevitablemente expuestos a estas sustancias, ya sea a través del consumo de agua y alimentos contaminados a nivel de la población general, o de manera directa y concentrada en entornos ocupacionales (Valencia-Quintana et al., 2023; Moreira et al., 2025). En el entorno ocupacional, los trabajadores agrícolas y los vecinos de campos de cultivo cercanos representan el grupo más vulnerable. En dichos grupos, la exposición ocupacional se debe principalmente a la mezcla, carga y aplicación de pesticidas mientras se realiza la adición y tratamiento químico, y se ve agravada por el uso insuficiente de equipo de protección personal (EPP) y la falta de conciencia sobre los riesgos a largo plazo (Moreira et al., 2025). Esta población sufre absorción crónica de mezclas complejas de xenobióticos a través de vías dérmicas, inhalatorias y orales (Moreira et al., 2025). A diferencia de las intoxicaciones agudas, que tienen manifestaciones clínicas y médicas notables, la exposición crónica a dosis bajas (subclínicas) es un desafío toxicológico de mayor nivel. Esta exposición crónica ha mostrado asociación

epidemiológica con el desarrollo de efectos toxicológicos severos, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer), enfermedades respiratorias, alteraciones del sistema endocrino, infertilidad y algunas formas de neoplasias como neoplasias hematológicas y tumores sólidos (Costa et al., 2020; Florencia et al., 2020; Valbuena et al., 2020).

Históricamente, la vigilancia de la salud en los trabajadores agrícolas ha dependido de la cuantificación de biomarcadores de exposición como los metabolitos de dialquilfosfato (DAP) en orina, o de biomarcadores de efecto temprano no específicos (como la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) para organofosforados y carbamatos) (Lozano-Paniagua, 2017; Moreira et al., 2025). Estos cambios bioquímicos no tienen una larga vida media y, por lo tanto, no pueden proporcionar una evaluación de riesgo para la predicción de enfermedades como las enfermedades crónicas. En contraste, la genotoxicidad ha sido caracterizada con ensayos de micronúcleos (MN) y datos de ensayos cometa que demuestran daño estructural en el ácido desoxirribonucleico (DNA) que ya está establecido (Sánchez-Alarcón et al., 2021; Maldonado Mariño et al., 2024). Dada esta limitación, la toxicología contemporánea ahora está orientada a desentrañar mecanismos moleculares, incluyendo la epigenética como fundamental para nuestra comprensión que media la asociación entre la exposición ambiental y el cambio en la expresión génica de manera mecanicista (Rohr et al., 2024; Sobral et al., 2023). De las alteraciones epigenéticas, los microRNAs (miRNA) también han demostrado ser uno de los mejores candidatos para la toxicología molecular. Los miRNAs son moléculas

de ácido ribonucleico (RNA) no codificante de 18 a 25 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional degradando o inhibiendo la traducción del RNA mensajero (RNAm) objetivo (Leitão & Enguita, 2022; Kim et al., 2016). Estas moléculas son reguladores maestros de una variedad de procesos biológicos, incluyendo la división celular, la apoptosis y la respuesta al estrés oxidativo, y su desregulación está fuertemente asociada con el inicio de procesos carcinogénicos y neurodegenerativos (Costa et al., 2020). Varios estudios han indicado que la expresión de miRNAs particulares cambia drásticamente durante la exposición ambiental a toxinas como los pesticidas. Esto sugiere que podrían servir como un marcador molecular predictivo para la exposición y los efectos biológicos tempranos (Weldon et al., 2016; Vrijens & Bollati, 2015; Francisco et al., 2025). Además de su función intracelular, los miRNAs son secretados hacia los fluidos biológicos extracelulares —tales como sangre, orina y saliva— donde presentan una notable estabilidad frente a la degradación por RNAasas endógenas al estar encapsulados en exosomas o asociados a proteínas (Felekis & Papanephytous, 2020; de Gonzalo-Calvo et al., 2022). Esta característica los convierte en candidatos ideales para el desarrollo de biopsias líquidas. No obstante, la gran mayoría de las investigaciones sobre miRNAs y plaguicidas en humanos se han focalizado en matrices como suero, plasma y orina (Gattuso et al., 2022; Weldon et al., 2016). En el biomonitorio ocupacional, el uso de muestras de sangre resulta invasivo, costoso y logísticamente complicado en el trabajo de campo. En este sentido, las células epiteliales obtenidas mediante hisopado bucal representan una matriz biológica no invasiva y altamente pertinente, dado que la cavidad oral constituye una de las primeras barreras de contacto y absorción tras la

exposición aerotransportada (inhalación) o por ingestión accidental de los agroquímicos (Sánchez-Alarcón et al., 2021). Si bien el ensayo de micronúcleos en citoma bucal ha sido validado y utilizado extensamente para medir la inestabilidad genómica en agricultores (Sánchez-Alarcón et al., 2021), la caracterización de los perfiles de miRNAs en esta matriz epitelial específica como respuesta a la toxicidad por agroquímicos constituye un área prácticamente inexplorada en la literatura científica (Valencia-Quintana et al., 2022; Moreira et al., 2025). Con base en la necesidad de establecer biomarcadores tempranos, predictivos y no invasivos para la vigilancia epidemiológica y toxicológica, la presente tesis tiene como objetivo principal evaluar el efecto de la exposición crónica a mezclas de agroquímicos sobre el perfil de expresión de microRNAs extraídos de células epiteliales mediante hisopado bucal en trabajadores agrícolas.

## **2. Marco teórico / Antecedentes**

### **2.1. Agroquímicos y exposición ocupacional**

Los agroquímicos, comúnmente denominados plaguicidas, se definen como sustancias o mezclas destinadas a prevenir, repeler, destruir o mitigar cualquier plaga que afecte la producción agrícola (OMS, 2020). De acuerdo con su organismo blanco, se clasifican funcionalmente en insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas y nematocidas (OMS, 2020; IRAC España, 2024). Químicamente, los plaguicidas más utilizados a nivel mundial y en América Latina se agrupan en: Organofosforados (OP) y Carbamatos: Compuestos cuyo mecanismo de acción primario es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las sinapsis nerviosas. Ejemplos incluyen clorpirifos, malatión, paratión, diazinón y metamidofos (Lozano-Paniagua, 2017). Organoclorados (OC): Moléculas cíclicas altamente lipofílicas y persistentes en el ambiente que actúan sobre los canales de cloro o sodio. Ejemplos son el DDT, lindano y endosulfán (Lozano-Paniagua, 2017). Piretroides: Insecticidas sintéticos análogos a las piretrinas naturales que alteran la transmisión del impulso nervioso en los canales de sodio (ej. cipermetrina, permetrina). Herbicidas: Sustancias como el glifosato (inhibidor de vías metabólicas específicas en plantas) y los clorofenoxiácidos como el 2,4-D (Lozano-Paniagua, 2017; Valbuena et al., 2020). En términos regulatorios y toxicológicos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasifica según su toxicidad aguda en Extremadamente Peligrosos (Ia), Altamente Peligrosos (Ib), Moderadamente Peligrosos (II), Ligeramente Peligrosos (III) y Poco Probables de presentar peligro agudo (U) (OMS, 2020). A pesar de los convenios internacionales,

en países en desarrollo como México existe un uso generalizado de Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP). Investigaciones documentan la exposición constante a mezclas complejas en diversas regiones mexicanas. Por ejemplo, en Los Reyes, Michoacán, un polo agroindustrial destacado por el cultivo de zarzamora y aguacate, los trabajadores agrícolas manipulan intensamente organofosforados, carbamatos y piretroides (Valencia-Quintana et al., 2023). En los distritos de riego de Sonora y en el cultivo de maíz y alfalfa en Durango, se ha reportado el uso masivo de compuestos como glifosato, paraquat, clorpirifos y metil paratión (Silveira-Gramont et al., 2018; Jáquez-Matas et al., 2022). La exposición humana en el ámbito laboral ocurre principalmente a través de tres vías: dérmica (la principal ruta de absorción ocupacional debido al contacto con aerosoles, ropas contaminadas o derrames), inhalatoria (por gases, vapores o polvos suspendidos durante la aspersión) y oral (por ingestión accidental o malos hábitos de higiene) (Lozano-Paniagua, 2017; Moreira et al., 2025). Esta exposición es crónicamente mantenida durante ciclos agrícolas enteros.

## **2.2. Efectos biológicos de los plaguicidas**

La exposición crónica a agroquímicos detona una cascada de alteraciones biológicas subclínicas en los organismos humanos, mucho antes de la manifestación de enfermedades crónicas. Estrés Oxidativo e Inflamación: Múltiples clases de plaguicidas inducen un desequilibrio homeostático al incrementar la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) e interferir con las enzimas antioxidantes celulares (ej. superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa) (Lozano-Paniagua,

2017; Valbuena et al., 2020). El exceso de ROS provoca peroxidación lipídica (cuantificada frecuentemente como TBARS o malondialdehído, MDA), daño a proteínas estructurales y modificaciones directas sobre el DNA (Valbuena et al., 2020). Este estrés oxidativo sostenido activa mediadores proinflamatorios, afectando células del sistema inmunitario como los macrófagos, incrementando la secreción de citocinas (como Interleucina-6, Interleucina-8, y Factor de Necrosis Tumoral alfa o TNF- $\alpha$ ) (Lozano-Paniagua, 2017; Valbuena et al., 2020). Esta inflamación sistémica crónica eleva el riesgo de enfermedades autoinmunes y transformación neoplásica.

Genotoxicidad: El daño directo al DNA inducido por los plaguicidas se evalúa convencionalmente mediante biomarcadores citogenéticos en sangre periférica y células bucales. Los ensayos más utilizados en poblaciones agrícolas expuestas incluyen el ensayo Cometa, que mide las rupturas de cadena sencilla y doble del DNA, y el ensayo de micronúcleos (MN), que evidencia inestabilidad cromosómica (rupturas o pérdida de cromosomas durante la división celular) (Sánchez-Alarcón et al., 2021; Maldonado Mariño et al., 2024). Estudios realizados en trabajadores agrícolas han demostrado sistemáticamente aumentos significativos en la frecuencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares (pícnosis, cariorrexis) en comparación con poblaciones no expuestas (Francisco et al., 2025; Sánchez-Alarcón et al., 2021).

Epigenética: Más allá de las mutaciones genéticas directas, los plaguicidas actúan como agentes de disrupción epigenética. La epigenética comprende cambios heredables en la regulación de la expresión génica que no alteran la secuencia subyacente del DNA. Estos mecanismos incluyen la hiper o hipometilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas y la alteración en la expresión de RNAs

no codificantes, como los microRNAs (Rohr et al., 2024; Sobral et al., 2023). Por ejemplo, se ha documentado hipometilación global del DNA en trabajadores expuestos a pesticidas, así como alteraciones en la metilación de genes promotores específicos y desregulación en la transcripción, lo cual está mecánicamente vinculado a la tumorigénesis y trastornos neurodegenerativos (Rohr et al., 2024; Sobral et al., 2023).

### **2.3. MicroRNAs y regulación epigenética**

Los microRNAs (miRNAs o miRs) son moléculas de RNA de cadena sencilla, no codificantes para proteínas, cuya longitud varía entre los 18 y 25 nucleótidos. Su función fisiológica primaria consiste en la modulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (Leitão & Enguita, 2022; Letelier et al., 2023). La biogénesis de los miRNAs es un proceso enzimático en múltiples pasos, altamente regulado. Inicia en el núcleo celular, donde los genes que codifican los miRNAs (ya sean intergénicos o intrónicos) son transcritos por la RNA polimerasa II, formando un transcrito primario largo denominado pri-miRNA (Leitão & Enguita, 2022). El pri-miRNA adopta una estructura de tallo-asa y es escindido por el complejo nuclear "Microprocesador", conformado por la enzima RNAasa III Drosha y su cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), generando un precursor en forma de horquilla de aproximadamente 60-70 nucleótidos, llamado pre-miRNA (Kim et al., 2016; Leitão & Enguita, 2022). Posteriormente, el pre-miRNA es transportado hacia el citoplasma a través de los poros nucleares mediante la proteína transportadora Exportina-5 (XPO5), en un proceso dependiente de Ran-GTP (Wu & He, 2018). Una vez en el citoplasma, el complejo enzimático liderado por la RNAasa III Dicer, asistido por cofactores como

TRBP (proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación), cliva el pre-miRNA, liberando un dúplex de RNA asimétrico (miRNA/miRNA\*) (Leitão & Enguita, 2022). Finalmente, una de las hebras maduras se incorpora a una proteína de la familia Argonauta (AGO, típicamente AGO2) para formar el núcleo del Complejo Silenciador Inducido por RNA (RISC) (Leitão & Enguita, 2022). El complejo RISC, guiado por la hebra de miRNA, reconoce y se une a secuencias complementarias en los RNAm diana, generalmente en la región 3' no traducida (3'- UTR). Si la complementariedad es perfecta (común en plantas), se induce el corte y degradación del RNAm mediada por AGO2. Si la complementariedad es parcial (lo más frecuente en humanos), se inhibe la traducción del RNAm o se promueve su rápida degradación por desadenilación (Leitão & Enguita, 2022). Dado que un solo miRNA puede acoplarse y regular la expresión de múltiples RNAm, constituyen redes maestras que controlan el desarrollo, la diferenciación celular, el ciclo celular, la apoptosis y la inmunidad (Leitão & Enguita, 2022).

#### **2.4. Evidencia previa de miRNAs asociados a plaguicidas**

El perfil de expresión de los miRNAs es altamente sensible a estresores químicos ambientales. Aunque la literatura toxicológica específica para plaguicidas es emergente en comparación con otros contaminantes (como metales pesados o hidrocarburos), existe evidencia contundente sobre la disrupción que provocan. Estudios in vitro e in vivo: En células epiteliales de riñón porcino (PK15), la exposición al insecticida diclorvos alteró la expresión de 30 miRNAs relacionados con la citotoxicidad celular (Hou & Wang, 2011; Valencia-Quintana et al., 2022). En el pez

cebra, la exposición a triazofós y fipronil desreguló diferencialmente múltiples miRNAs, incluyendo miR-21 y miR-155 (Hou & Wang, 2011). Modelos murinos expuestos perinatalmente al herbicida glifosato demostraron desregulación de 74 miRNAs en la corteza prefrontal de las crías (Ji et al., 2017). Asimismo, la exposición al paraquat en células neuronales afecta el miR-17-5p, promoviendo apoptosis relacionada al Parkinson (Dehghan et al., 2023).

Estudios Epidemiológicos y Ocupacionales: Matriz Sangre/Plasma: Un estudio reciente de Francisco et al. (2025) en trabajadores brasileños expuestos crónicamente a plaguicidas identificó, mediante biopsia líquida y tecnología NanoString, una alteración significativa de 30 miRNAs circulantes. Entre ellos, 20 miRNAs (ej. let-7, miR-30b-5p, miR-221-3p) mostraron un área bajo la curva (AUC) >0.75 y correlacionaron negativamente con la concentración en suero de plaguicidas como fenilpirazol y endosulfán; los genes blanco de estos miRNAs estaban enriquecidos en vías oncológicas y desórdenes neurológicos. Gattuso et al. (2022) halló mediante PCR digital en gotas (ddPCR) una marcada regulación a la baja del hsa-miR-199a-5p en plasma de agricultores italianos expuestos. Qu et al. (2025) identificaron asociaciones entre contaminantes orgánicos persistentes y perfiles de microRNAs plasmáticos en un análisis comunitario.

Matriz Orina: Weldon et al. (2016) evaluaron muestras de orina de agricultores adultos y niños expuestos a organofosforados, detectando que la exposición en la temporada de cosecha se correlacionaba con el incremento de la expresión de miR-223, miR-518d-3p, miR-597, miR-517b, miR-133b y miR-28-5p. Análisis bioinformáticos asociaron el miR-28-5p con la unión a acetilcolina y la actividad colinesterasa.

Limitaciones previas: La mayoría de los estudios epidemiológicos enfrentan problemas como un tamaño de muestra

reducido, la dificultad para controlar factores de confusión (dieta, edad, tabaquismo, covariables genéticas), y el sesgo inherente a evaluar exposición a plaguicidas aislados cuando en campo los agricultores aplican mezclas complejas simultáneamente. Adicionalmente, el estudio de estas alteraciones se ha concentrado fuertemente en fluidos invasivos (sangre) o limitados (orina), existiendo un vacío respecto al uso de otras matrices.

## **2.5. Hisopado bucal como matriz para biomonitorio**

El uso de células del epitelio de la mucosa bucal para el biomonitorio genotóxico humano es una herramienta firmemente establecida. Los métodos para recolectar estas células, como el hisopado o raspado bucal (buccal swab), se han empleado primordialmente en el ensayo de micronúcleos (CBMN) y el ensayo Cometa para identificar daños genómicos causados por exposición a agroquímicos (Sánchez-Alarcón et al., 2021; Maldonado Mariño et al., 2024). Pros: El epitelio bucal representa la primera barrera biológica de contacto frente a tóxicos ingresados por inhalación o por la ruta digestiva (ingestión) (Sánchez-Alarcón et al., 2021). Las células exfoliadas pueden obtenerse de manera sencilla, económica, indolora y no invasiva, lo que incrementa sustancialmente la tasa de participación y aceptación en los individuos de campo en zonas rurales (Moreira et al., 2025). Además, estudios han demostrado una alta correlación entre el daño encontrado en linfocitos de sangre periférica y el hallado en células de la mucosa bucal (Sánchez-Alarcón et al., 2021). También se ha confirmado que la saliva y las células de este tejido contienen un espectro detectable y estable de miRNAs extracelulares e intracelulares (Felekkis & Papanephytou,

2020). Contraste / Desafíos: La recolección bucal presenta retos inherentes como la heterogeneidad de las capas de células epiteliales capturadas, la posible contaminación con restos de alimentos y microorganismos (microbioma oral) y la influencia de factores como la higiene dental, edad y consumo de tabaco o alcohol (Sánchez-Alarcón et al., 2021). A nivel analítico, la cantidad y calidad del RNA extraído del hisopado puede ser inferior y más variable que el extraído del suero o tejido sólido. Limitación actual en la literatura: Si bien la matriz bucal es estándar para genotoxicidad, la caracterización toxicológica mediante el perfilamiento de miRNAs a partir de hisopados bucales en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas no ha sido establecida sistemáticamente (Valencia-Quintana et al., 2022; Moreira et al., 2025).

## **2.6. Perfilamiento de miRNAs por NGS**

Para la detección y cuantificación del perfil de expresión de miRNAs se utilizan actualmente tres plataformas tecnológicas principales: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), microarrays, y la secuenciación de nueva generación (NGS) o RNA-Seq (Benesova & Kubista, 2021; Liu et al., 2011). Mientras que RT-qPCR y los microarrays dependen de secuencias objetivo conocidas y predefinidas, el enfoque mediante NGS para pequeños RNAs (Small RNA-Seq) ha revolucionado la toxicología genómica. El perfilamiento de miRNAs por NGS ofrece ventajas fundamentales: posee una sensibilidad y rango dinámico extremadamente altos, permite la discriminación precisa de isoformas de miRNAs (isomiRs) con variaciones de un solo nucleótido, y, de manera crítica, permite el descubrimiento de novo de

secuencias de miRNAs que no se encontraban previamente anotadas en las bases de datos (Benesova & Kubista, 2021; Liu et al., 2011). La aplicación de metodologías NGS en estudios de biomonitorio ocupacional provee una "firma" transcriptómica global y sin sesgo del estado celular, facilitando el cruce bioinformático de grandes volúmenes de datos con redes de genes blanco. Esto permite inferir tempranamente las vías biológicas afectadas (ej. inflamación, carcinogénesis) subyacentes a la exposición crónica a mezclas toxicológicas.

### 3. Justificación

La persistente aplicación de plaguicidas en los ciclos productivos agrícolas ha convertido la exposición crónica ocupacional y ambiental en un imperativo de salud pública, particularmente en países donde aún se comercializan ingredientes activos prohibidos en otras jurisdicciones y en regiones donde la agroindustria es pilar económico, como el centro y norte de México (PAN Internacional, 2021; Vélez Salas et al., 2021). Tradicionalmente, el monitoreo del daño y el riesgo toxicológico ha dependido de biomarcadores enzimáticos de respuesta tardía (como la colinesterasa) o indicadores genotóxicos citológicos (como el ensayo de micronúcleos), los cuales detectan el daño macromolecular cuando la lesión intracelular ya ha sido materializada y se ha comprometido la estabilidad genómica (Sánchez-Alarcón et al., 2021; Lozano-Paniagua, 2017). Existe una urgente necesidad de transitar hacia la "toxicología predictiva". Identificar alteraciones funcionales en etapas reversibles es fundamental para la prevención de desenlaces graves como tumores malignos, neuropatías degenerativas y trastornos del desarrollo. Los mecanismos epigenéticos, específicamente la regulación mediada por microRNAs, responden tempranamente al estrés oxidativo, inflamación y toxicidad química (Rohr et al., 2024; Letelier et al., 2023). Cuantificar y perfilar las firmas de expresión de miRNAs provee una perspectiva mecanística directa de cómo las mezclas complejas de plaguicidas perturban la homeostasis genética del agricultor antes de la manifestación patológica. Asimismo, uno de los mayores cuellos de botella en la vigilancia de poblaciones agrícolas vulnerables es el abordaje metodológico logístico. La toma de sangre venosa resulta invasiva, requiere infraestructura de cadena de frío estricta y causa reticencia en las

comunidades evaluadas. Por el contrario, el hisopado bucal es un método de muestreo incruento, rápido y económicamente factible en condiciones de campo que recaba células con exposición toxicológica de primera mano (inhalatoria/oral). A pesar de la probada utilidad de las células de la mucosa bucal para la detección de rupturas del DNA, su potencial para la evaluación de perfiles de miRNAs como biomarcadores de efecto temprano permanece inexplorado. La presente tesis se justifica al combinar, las ventajas de una matriz biológica epitelial no invasiva para tamizaje y sensibilidad que brinda la Secuenciación de Nueva Generación (NGS). Establecer un perfil de miRNAs alterados en células bucales en agricultores sometidos a exposición crónica a plaguicidas permitirá no solo validar estos RNAs no codificantes como biomarcadores moleculares tempranos, predictivos y accesibles para la medicina ocupacional y el biomonitoreo humano continuo, sino que proveerá el marco biológico para inferir las redes genéticas y vías de enfermedad que están siendo silenciosamente vulneradas en las comunidades agrícolas latinoamericanas.

## **4. Hipótesis y objetivos**

### **4.1. Hipótesis**

La exposición ocupacional crónica a agroquímicos se asocia con un perfil de expresión de microRNAs diferencial en células epiteliales bucales comparado con individuos no expuestos.

### **4.2. Objetivo general**

Caracterizar el perfil de expresión de microRNAs en células epiteliales bucales de aplicadores de agroquímicos y evaluar su asociación con la exposición ocupacional crónica, con el fin de identificar microRNAs candidatos con potencial utilidad como biomarcadores moleculares de exposición.

### **4.3. Objetivos particulares**

- Identificar los microRNAs diferencialmente expresados entre aplicadores de agroquímicos y un grupo control no expuesto, mediante secuenciación de nueva generación.
- Validar mediante RT-qPCR un subconjunto de microRNAs candidatos seleccionados a partir del análisis de expresión diferencial.
- Explorar, mediante herramientas bioinformáticas, las vías moleculares, procesos biológicos y posibles genes blanco asociados con los microRNAs diferencialmente expresados.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Diseño del estudio**

Se realizó un estudio observacional, analítico y comparativo, en el que se incluyeron 20 individuos, distribuidos en dos grupos: 10 controles sin contacto ocupacional con agroquímicos, identificados con los códigos 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 114 y 115; y 10 trabajadores agrícolas con exposición ocupacional crónica a agroquímicos, identificados con los códigos 116, 117, 118, 119, 120, 123, 124, 127, 130 y 131.

### **5.2. Población y grupos de comparación**

Los participantes expuestos provenían de comunidades agrícolas del estado de Michoacán y realizaban labores relacionadas con la preparación de mezclas, aspersión o manejo directo de plaguicidas. Los criterios de inclusión y exclusión fueron definidos en etapas previas a este proyecto.

### **5.3. Encuestas y variables analizadas**

Se diseñó y aplicó un instrumento estructurado (encuesta) para recabar información antropométrica y clínica de los participantes. Las variables numéricas recolectadas incluyeron edad (años), peso (kg), estatura (cm) y circunferencia de cintura (cm). A partir de estas métricas se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) en  $IMC = (\text{peso en Kg}) / (\text{estatura en m})^2$ . Asimismo, se consideraron variables sociodemográficas, antropométricas, hábitos de vida, dieta, antecedentes generales de salud, síntomas compatibles con exposición a agroquímicos y en el grupo expuesto, variables laborales

relacionadas con antigüedad, actividad en campo, uso de equipo de protección personal y agroquímicos mencionados. Ambas bases fueron revisadas y homologadas para estandarizar nombres de variables, codificación de respuestas y formato de datos. Las respuestas categóricas fueron transformadas a variables dicotómicas cuando fue posible, utilizando las categorías “Sí” y “No”. También se generó una variable cuantitativa correspondiente al número de síntomas detectados por participante. Posteriormente, el IMC fue clasificado de forma descriptiva en las categorías de bajo peso, peso normal, sobrepeso y obesidad. La circunferencia de cintura se clasificó como de riesgo utilizando los puntos de corte de  $\geq 90$  cm para hombres y  $\geq 80$  cm para mujeres. El consumo de alimentos fue separado en cuatro componentes: carne, verduras, frutas y cereales, expresados como veces por semana. Los síntomas fueron identificados mediante búsqueda de palabras clave dentro de los campos de texto libre. Los síntomas considerados fueron dolor de cabeza, mareos, comezón, lagrimeo, gripe, infecciones en la piel, cansancio, falta de concentración, presión alta y náuseas.

Los plaguicidas fueron analizados como menciones dentro del texto libre, por lo tanto, la frecuencia reportada representa únicamente la proporción de participantes que mencionó cada término, y no se interpreta como una medida cuantitativa de dosis, frecuencia real de aplicación o intensidad de exposición.

El análisis tuvo un carácter exploratorio y descriptivo, por lo que no se realizaron pruebas estadísticas inferenciales para los resultados de las encuestas. Esta decisión se tomó debido al tamaño muestral reducido, la naturaleza auto-reportada de varias

variables y la falta de balance entre grupos en variables potencialmente confusoras, particularmente el sexo.

#### **5.4. Obtención de muestras bucales**

Las muestras de epitelio bucal se obtuvieron mediante hisopos de nylon flocked (Copan FLOQSwabs® o equivalente), siguiendo un procedimiento estandarizado de toma. Cada hisopo fue rotado 10 veces sobre la mucosa bucal, manteniendo una presión uniforme y un tiempo de contacto similar entre participantes. Posteriormente, los hisopos se colocaron en solución estabilizadora y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

#### **5.5. Extracción de RNA**

El RNA total se extrajo mediante el método TRIzol®, siguiendo el protocolo del fabricante y adaptándolo a muestras de epitelio bucal. (Invitrogen, EE. UU), brevemente, los tejidos fueron homogenizados por pipeteo en Trizol, para luego realizar una separación de fases con cloroformo asistida por centrifugación a 10000 rpm a 4°C. De esta separación de fases, se trasvasó la fase acuosa y luego de esta el ARN fue precipitado utilizando un volumen de isopropanol y centrifugación a 12000 rpm a 4°C, para luego realizar dos lavados con etanol 70% en agua, el botón obtenido fue desecado a temperatura ambiente y diluido en agua libre de RNAsas. El ARN se cuantificó utilizando espectrofotometría por NanoDrop y la calidad de las muestras se determinaron con un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

## **5.6. Small RNA-Seq**

Las bibliotecas para secuenciación de small RNA se prepararon a partir de RNA total utilizando el kit TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se ligaron adaptadores 3' y 5' específicos para RNA pequeño, se realizó retrotranscripción a cDNA y posterior amplificación por PCR. Los productos amplificados fueron sometidos a selección de tamaño para recuperar fragmentos correspondientes a miRNAs maduros y sus adaptadores, con un tamaño aproximado de 145–160 pb. Las bibliotecas se cuantificaron y evaluaron mediante Qubit y Bioanalyzer, y posteriormente se secuenciaron en una plataforma Illumina NextSeq 500 con configuración single-end a 75 ciclos.

## **5.7. Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático se realizó a partir de archivos FASTQ generados por secuenciación de Illumina. La calidad de las lecturas se evaluó inicialmente mediante FastQC. Posteriormente, se realizó recorte de adaptadores y filtrado por calidad con Cutadapt v4.0, eliminando lecturas con puntaje Phred < 15 y lecturas menores de 17 nucleótidos. Después del recorte y filtrado, se efectuó nuevamente control de calidad para verificar el estado final del conjunto de datos. Las lecturas filtradas se alinearon contra el genoma de referencia humano Homo sapiens GRCh38.p14, previamente indexado. Se usó el alineador Bowtie 0.11.3 para el mapeo de lecturas cortas. La cuantificación de microRNAs se realizó con MiRDeep2 v2.0.0.8, empleando información de la base de datos miRBase para la anotación de secuencias maduras y

precursores. El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con edgeR, utilizando normalización por Trimmed Mean of M-values (TMM) y contraste entre el grupo expuesto y el grupo control. La detección de elementos de interés se evaluó con base en p value ajustado o  $p \text{ value} < 0.05$  y  $\text{Fold Change} \geq |1.5|$

## **5.8. Selección de candidatos**

A partir del análisis de expresión diferencial se seleccionaron microRNAs candidatos para validación experimental, considerando la magnitud del cambio observado, su relevancia biológica y su posible relación con procesos celulares asociados con exposición a compuestos tóxicos. Los microRNAs seleccionados para validación fueron miR-486-5p y miR-26a-5p. Para la normalización de la expresión relativa se utilizó miR-16-5p como control endógeno de referencia.

## **5.9. Validación por RT-qPCR**

### **5.9.1. Diseño de primers**

Los primers para RT-qPCR se diseñaron con enfoque específico para la secuencia de microRNAs maduros reportadas en mirBase, utilizando la herramienta miRPrimer2. La especificidad teórica de los oligonucleótidos se verificó mediante análisis in silico con BLASTn. La síntesis del par de primers con el mejor score de miRPrimer2 se realizó con el proveedor T4Oligo con purificación por cartucho.

### **5.9.2. Amplificación por RT-qPCR**

La amplificación de los microRNAs de interés se efectuó a partir de RNA total (el mismo previamente extraído para RNAseq), mediante un procedimiento en tres etapas y en

reacciones independientes, conforme a las recomendaciones del esquema de diseño utilizado en miRPrimer2. Inicialmente, el RNA total fue sometido a una reacción de poliadenilación. En una segunda etapa, se realizó la retrotranscripción para la obtención de cDNA. Finalmente, la expresión de los microRNAs se evaluó por qPCR en tiempo real mediante un sistema de detección con SYBR Green. A continuación se describe brevemente las condiciones de cada etapa. La cuantificación por PCR en tiempo real se realizó en un equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Cada reacción se analizó en triplicado técnico para cada muestra y cada microRNA. La mezcla de reacción se preparó utilizando la qPCR GreenMaster de Jena Bioscience, en un volumen final de 10 µL, que incluyó 0.3 µL de primer a 10 µM y 1 µL de cDNA diluido 1:10. El protocolo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de una fase de touchdown de 10 ciclos, con decremento de 1 °C por ciclo, desde 65 °C hasta 55 °C. Posteriormente, se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 s y 55 °C durante 20 s. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 55 a 98 °C para confirmar la especificidad de los amplicones. Los valores de Ct se obtuvieron con el software del equipo mediante regresión, y los triplicados técnicos se promediaron para cada muestra. Los registros sin amplificación detectable o con error técnico fueron considerados como valores faltantes y se excluyeron del análisis correspondiente.

### **5.9.3. Análisis de expresión relativa por RT-qPCR**

La expresión relativa de los microRNAs candidatos se evaluó mediante el método de  $\Delta C_t$ , usando a miR-16-5p como control endógeno. Para cada muestra se calculó:  $\Delta C_t$

= Ct(miRNA diana) – Ct(miR-16-5p) Bajo este criterio, un valor menor de  $\Delta Ct$  corresponde a una mayor expresión relativa del microRNA diana. Para fines descriptivos, los cambios relativos de expresión pudieron expresarse adicionalmente mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , tomando como referencia el grupo control; sin embargo, la inferencia principal se basó en la comparación estadística de los valores de  $\Delta Ct$  entre grupos.

#### **5.10. Análisis estadístico**

Considerando el tamaño reducido del grupo control y la presencia de datos faltantes en algunas determinaciones, la comparación entre el grupo expuesto y el grupo control se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney de dos colas. Los resultados se resumieron mediante estadísticas descriptivas, incluyendo media y desviación estándar, así como mediana y rango intercuartílico cuando fue pertinente. Se consideró diferencia estadísticamente significativa un valor de  $p < 0.05$ .

### **6. Resultados**

#### **6.1. Características de la población**

Se analizaron 20 participantes, 10 controles no expuestos y 10 individuos con exposición laboral a agroquímicos. La edad promedio fue similar entre ambos grupos. En el grupo control, la edad media fue de 39.2 años, con una desviación estándar de 14.4 años, mientras que en el grupo expuesto fue de  $38.3 \pm 13.1$  años. La diferencia promedio entre grupos fue de 0.9 años, lo que indica que ambos grupos fueron comparables en términos generales de edad. Sin embargo, se observó una diferencia

importante en la composición por sexo. El grupo control estuvo integrado por 50% mujeres y 50% hombres, mientras que el grupo expuesto estuvo compuesto por 100% hombres. Esta diferencia representa una limitación relevante para la interpretación de variables antropométricas y clínicas, ya que el sexo puede influir en la distribución de grasa corporal, la circunferencia de cintura, la frecuencia de algunos síntomas y determinados hábitos de vida. Aunque el objetivo del análisis fue descriptivo, esta diferencia limita la posibilidad de atribuir los hallazgos exclusivamente a la exposición ocupacional a agroquímicos. El peso promedio fue ligeramente mayor en el grupo control, con  $84.5 \pm 23.1$  kg, comparado con  $82.2 \pm 15.6$  kg en el grupo expuesto. La diferencia promedio fue de -2.3 kg en expuestos respecto a controles. Aunque la diferencia fue pequeña, se observó mayor dispersión en el grupo control, con valores entre 50 y 130 kg. La circunferencia de cintura también fue mayor en el grupo control. Los controles presentaron una media de  $102.8 \pm 18.3$  cm, mientras que los expuestos tuvieron una media de  $95.9 \pm 4.2$  cm. La diferencia promedio fue de -7.0 cm en el grupo expuesto. No obstante, esta comparación debe interpretarse con cautela debido al desbalance por sexo entre grupos y a la mayor variabilidad observada en controles. La estatura promedio fue mayor en el grupo expuesto, con  $172.2 \pm 7.2$  cm, frente a  $163.9 \pm 10.1$  cm en controles. Esta diferencia de 8.3 cm probablemente se relaciona con la composición por sexo, ya que todos los participantes expuestos fueron hombres, mientras que el grupo control incluyó mujeres y hombres. El índice de masa corporal promedio fue mayor en controles, con  $31.1 \pm 6.9$  kg/m<sup>2</sup>, en comparación con  $27.6 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup> en expuestos. La diferencia promedio fue de -3.5 kg/m<sup>2</sup> en el grupo expuesto. Al clasificar el IMC, se observó que 50% de los controles se ubicó en obesidad, frente a

20% de los expuestos. En contraste, 40% de los expuestos tuvo IMC normal, comparado con 10% de los controles. Estos resultados sugieren que, en esta muestra, el grupo control presentó mayor carga de exceso de peso y obesidad. Este hallazgo es relevante porque el IMC elevado puede actuar como un factor de confusión en la interpretación de síntomas generales, presión arterial, cansancio y otros indicadores de salud. Por lo tanto, cualquier comparación posterior entre exposición a agroquímicos y síntomas debe considerar el estado nutricional y antropométrico de los participantes. Respecto a la cintura de riesgo, 100% de los controles y 80% de los expuestos cumplieron con el criterio de riesgo según los puntos de corte utilizados. Aunque esta proporción fue mayor en controles, el hallazgo debe interpretarse con cautela por la diferencia en composición por sexo y por la aplicación de puntos de corte diferenciados entre hombres y mujeres.

## **6.2. Hábitos, síntomas y exposición laboral**

### **6.2.1. Hábitos de vida de la población estudiada**

El tabaquismo fue reportado por 20% de los controles y 10% de los expuestos. Esta diferencia fue pequeña y no sugiere, de forma descriptiva, una mayor frecuencia de tabaquismo en el grupo expuesto. En contraste, el consumo de alcohol fue más frecuente en los trabajadores expuestos. El 90% de los expuestos reportó consumo de alcohol, comparado con 50% de los controles. Esta diferencia de 40 puntos porcentuales es uno de los contrastes descriptivos más marcados entre ambos grupos. Este hallazgo es importante porque el consumo de alcohol puede actuar como variable de confusión en estudios de exposición a agroquímicos, particularmente si se analizan

biomarcadores de daño celular, estrés oxidativo, inflamación, metabolismo hepático o expresión molecular. En consecuencia, en análisis posteriores será recomendable considerar el consumo de alcohol como una covariable o, al menos, describirlo como una característica diferencial importante entre los grupos. No se reportó uso de drogas en ninguno de los grupos. Los problemas de salud fueron reportados por 10% de los controles y 10% de los expuestos. El uso de medicamentos fue más frecuente en controles, con 40%, frente a 10% en expuestos. Esta diferencia podría estar relacionada con la mayor proporción de obesidad y cintura de riesgo en controles, aunque con los datos disponibles no es posible establecer una relación causal. La frecuencia semanal de consumo de cRNAe fue mayor en controles, con una media de 3.9 veces por semana, frente a 2.8 veces por semana en expuestos. El consumo de verduras también fue ligeramente mayor en controles, con 5.1 frente a 4.4 veces por semana. El consumo de frutas fue alto en ambos grupos, con 6.5 veces por semana en controles y 6.0 en expuestos. El consumo de cereales fue mayor en expuestos, con una media de 5.1 veces por semana, comparado con 3.1 veces por semana en controles. Esta diferencia fue de 2.0 veces por semana.

En conjunto, estos resultados muestran diferencias descriptivas en el patrón dietético entre grupos. Aunque no permiten establecer conclusiones nutricionales profundas, sí sugieren que la dieta podría representar otro factor a considerar en análisis posteriores, especialmente si se evalúan biomarcadores sensibles a estado metabólico, inflamación o estrés oxidativo.

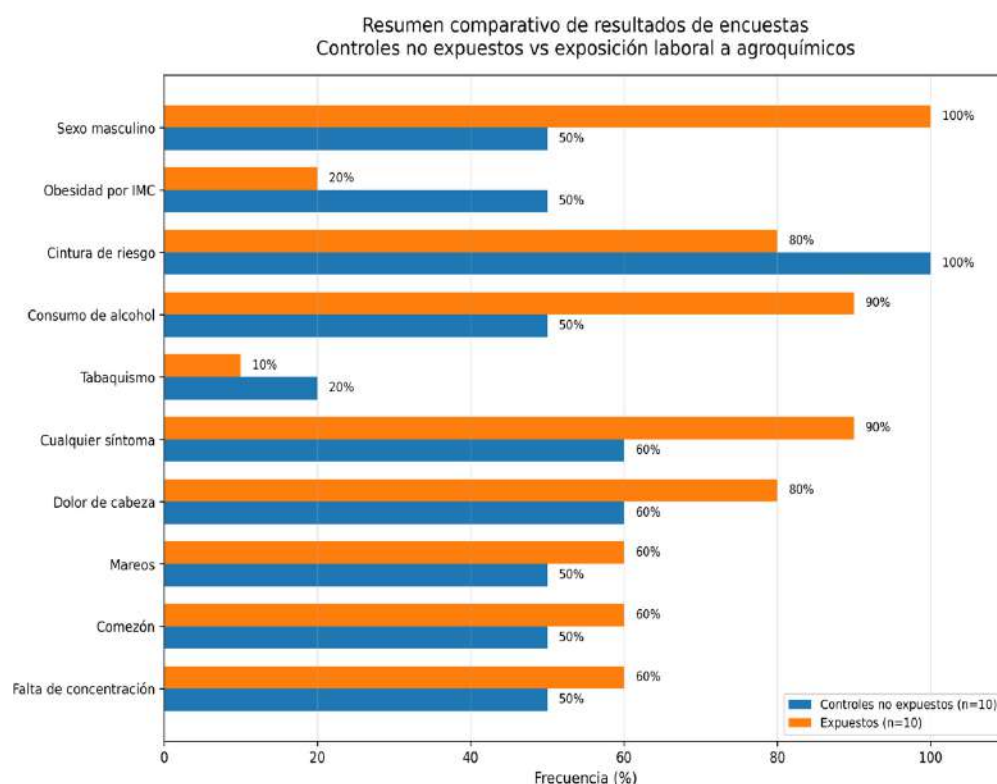
### **6.2.2. Sintomatología referida**

La presencia de cualquier síntoma compatible con intoxicación o malestar general fue más frecuente en el grupo expuesto. El 90% de los participantes expuestos reportó al menos un síntoma, en comparación con 60% de los controles. Esta diferencia de 30 puntos porcentuales sugiere una mayor frecuencia de sintomatología general en los individuos con exposición laboral a agroquímicos.

Los síntomas más frecuentes en el grupo expuesto fueron dolor de cabeza, reportado por 80%; mareos, comezón, cansancio y falta de concentración, cada uno con 60%. En controles, los síntomas más frecuentes fueron dolor de cabeza, lagrimeo, gripe, cansancio y presión alta, todos con 60%. Al comparar síntoma por síntoma, el grupo expuesto presentó mayor frecuencia de dolor de cabeza, con 80% frente a 60% en controles; mareos, con 60% frente a 50%; comezón, con 60% frente a 50%; y falta de concentración, con 60% frente a 50%. En contraste, los controles presentaron mayor frecuencia de lagrimeo, infecciones en la piel y presión alta. El número promedio de síntomas detectados por palabras clave fue muy similar entre grupos: 5.0 síntomas en controles y 4.8 en expuestos. Este hallazgo aparentemente contrasta con la mayor proporción de expuestos con al menos un síntoma. Una posible explicación es que, aunque más individuos expuestos reportaron algún síntoma, algunos controles sintomáticos concentraron un número elevado de síntomas, elevando el promedio del grupo control.

Este resultado resalta la importancia de interpretar la sintomatología desde dos perspectivas: por un lado, la proporción de individuos con al menos un síntoma; y por

otro, la carga total de síntomas por participante. En esta muestra, la exposición laboral se asoció descriptivamente con una mayor proporción de individuos sintomáticos, pero no con un mayor número promedio de síntomas. También debe considerarse que los síntomas analizados son inespecíficos. Dolor de cabeza, cansancio, mareos, comezón o falta de concentración pueden estar asociados a exposición química, pero también a factores como hidratación, jornada laboral, sueño, estrés, consumo de alcohol, obesidad, enfermedades previas u otras condiciones ambientales. Por ello, estos datos deben interpretarse como señales exploratorias y no como evidencia diagnóstica de intoxicación.



*Gráfica 1.- Resumen del análisis descriptivo de variables comparables seleccionadas entre grupos.*

### **6.2.3. Características laborales del grupo expuesto**

Dentro del grupo expuesto, 60% de los participantes reportó una antigüedad laboral mayor a 10 años, 30% entre 6 y 10 años, y 10% entre 4 y 5 años. Esto indica que la mayoría de los trabajadores incluidos tenía una historia prolongada de exposición ocupacional potencial a agroquímicos. La actividad en campo más frecuente fue la aspersión con bomba, reportada por 80% de los expuestos. Este dato es relevante, ya que la aspersión puede representar una vía importante de exposición dérmica e inhalatoria, especialmente cuando no se utiliza equipo de protección personal adecuado. Respecto al uso de equipo de protección personal, 50% de los expuestos reportó utilizar algún tipo de protección, 40% reportó no utilizarlo y 10% no tuvo dato disponible. Esta distribución sugiere una oportunidad importante de prevención, ya que una proporción considerable de trabajadores expuestos no reportó medidas de protección. La combinación de exposición prolongada, actividad de aspersión y uso incompleto de equipo de protección personal puede incrementar la plausibilidad biológica de exposición ocupacional relevante. Sin embargo, el cuestionario no permite cuantificar dosis, frecuencia de aplicación, concentración de productos, tiempo exacto de exposición ni adherencia real al uso de protección, por lo que estos hallazgos deben interpretarse como indicadores cualitativos de exposición.

### **6.3. Agroquímicos mencionados**

Los plaguicidas o términos más frecuentemente mencionados fueron Furadan, Lannate/Lanate y Manzate, cada uno reportado por 6 de los 10 trabajadores expuestos. También se mencionaron con alta frecuencia Dimetoato, Karate y

Malatión/Malati3n, cada uno en 5 de 10 participantes. Otros productos referidos incluyeron Agrimec, Dicofol, Endosulfan, Orthene, Paraquat, Tamar3n/Tamaron y Tramafos, mencionados por 40% de los expuestos. Tambi3n se registraron menciones de Aldrin, Folidol, Lorsban/Lorsdan, Parathion/Parati3n y Vidate, entre otros. Estos resultados muestran que los participantes expuestos no refirieron contacto con un solo producto, sino con m3ltiples agroqu3micos. Esto es relevante porque, en condiciones reales de trabajo agr3cola, la exposici3n suele ocurrir como mezclas complejas y no como exposici3n aislada a una mol3cula espec3fica. Esta caracter3stica dificulta atribuir s3ntomas o alteraciones biol3gicas a un producto individual, pero refleja de manera m3s realista el contexto ocupacional. Debe enfatizarse que la frecuencia de menció n no equivale a intensidad de exposici3n. Un plaguicida mencionado por m3s participantes no necesariamente representa mayor dosis, mayor frecuencia de aplicaci3n o mayor absorci3n individual. Para estudios posteriores, ser3a recomendable documentar frecuencia de uso, a3os de contacto con cada producto, v3a de exposici3n, uso de protecci3n, pr3cticas de mezcla, almacenamiento y lavado de equipo.

#### **6.4. Calidad de secuenciaci3n**

En esta secci3n se presentan los hallazgos obtenidos a partir del an3lisis de expresi3n de microRNAs en c3lulas epiteliales bucales de trabajadores agr3colas ocupacionalmente expuestos a agroqu3micos y de un grupo control no expuesto. Los resultados se organizaron en dos fases: una fase de descubrimiento basada en secuenciaci3n de small RNA y una fase de validaci3n mediante RT-qPCR de

microRNAs candidatos seleccionados. El control de calidad inicial reveló una profundidad de secuenciación robusta, con un rango de lecturas crudas por muestra que osciló entre 8.6 y 50.3 millones. Tras el proceso de recorte y filtrado (trimming), se retuvieron entre 2.0 y 13.2 millones de lecturas de alta calidad por biblioteca para el análisis posterior (Tabla 1). La calidad por base se mantuvo consistentemente por encima de Phred 30 en los primeros 50 nucleótidos, lo que garantiza una precisión en el llamado de bases del 99.9%.

| <b>Biblioteca</b>              | <b>ID en el análisis</b> | <b>Lecturas raw (reads R1)</b> | <b>Lecturas trimm (reads R1)</b> |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 105_S1_L001__R1__001.fastq.gz  | C1                       | 18659038                       | 6784539                          |
| 106_S2_L001__R1__001.fastq.gz  | C2                       | 27429283                       | 13256106                         |
| 107_S3_L001__R1__001.fastq.gz  | C3                       | 8672020                        | 2215714                          |
| 108_S4_L001__R1__001.fastq.gz  | C4                       | 14693246                       | 2044452                          |
| 109_S5_L001__R1__001.fastq.gz  | C5                       | 22137847                       | 8853039                          |
| 110_S6_L001__R1__001.fastq.gz  | C6                       | 22314740                       | 5826888                          |
| 111_S7_L001__R1__001.fastq.gz  | C7                       | 13135809                       | 4210337                          |
| 113_S8_L001__R1__001.fastq.gz  | C8                       | 24412234                       | 8499087                          |
| 114_S9_L001__R1__001.fastq.gz  | C9                       | 18639228                       | 6244648                          |
| 115_S10_L001__R1__001.fastq.gz | C10                      | 16632599                       | 5884941                          |
| 116_S11_L001__R1__001.fastq.gz | E1                       | 21428582                       | 10116023                         |
| 117_S12_L001__R1__001.fastq.gz | E2                       | 26251477                       | 9629578                          |

|                                |     |          |          |
|--------------------------------|-----|----------|----------|
| 118_S13_L001__R1__001.fastq.gz | E3  | 12299313 | 3353832  |
| 119_S14_L001__R1__001.fastq.gz | E4  | 15912456 | 2714223  |
| 120_S15_L001__R1__001.fastq.gz | E5  | 23442681 | 9289445  |
| 123_S16_L001__R1__001.fastq.gz | E6  | 32629006 | 8678333  |
| 124_S17_L001__R1__001.fastq.gz | E7  | 27973984 | 5711772  |
| 127_S18_L001__R1__001.fastq.gz | E8  | 29983037 | 9048101  |
| 130_S20_L001__R1__001.fastq.gz | E9  | 50371022 | 12690609 |
| 131_S19_L001__R1__001.fastq.gz | E10 | 18098440 | 3333041  |

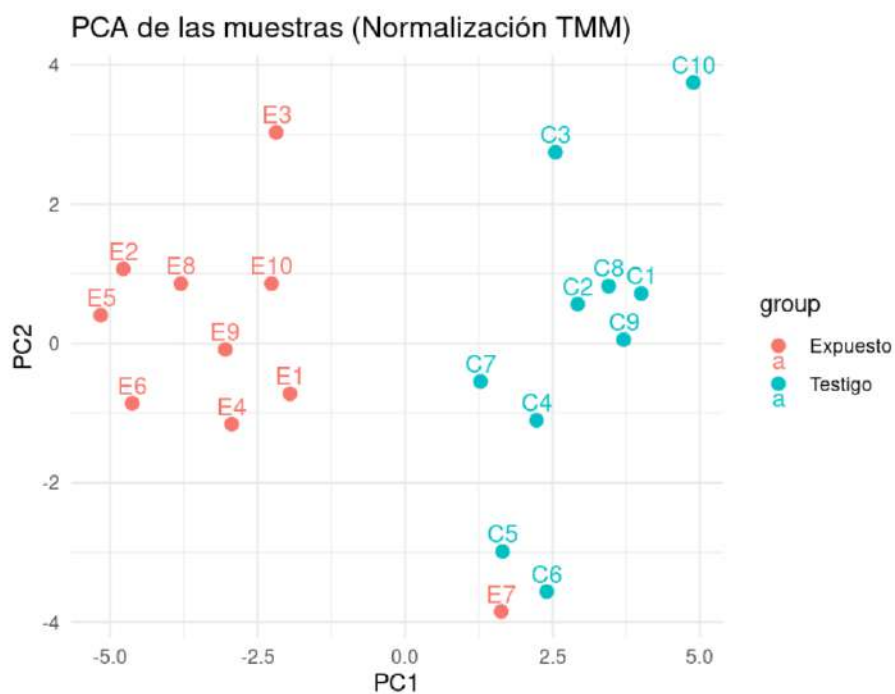
*Tabla 1.- Lecturas por muestras antes y después de preprocesamiento y calidad.*

Las lecturas filtradas fueron mapeadas contra el genoma de referencia de Homo sapiens (GRCh38.p14) utilizando el alineador Bowtie. La cuantificación y el descubrimiento de miRNAs conocidos se llevó a cabo mediante la herramienta MiRDeep2, empleando la base de datos miRBase para la anotación de secuencias maduras y de horquilla.

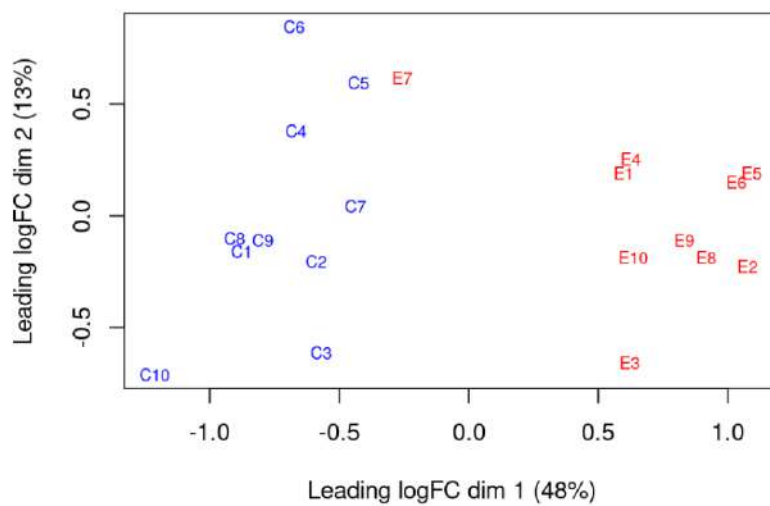
## **6.5. Perfil exploratorio de expresión de miRNAs**

El análisis exploratorio de los datos de expresión mostró patrones diferenciales entre los grupos expuesto y control. En el análisis de componentes principales (PCA) Figura1 y en el escalado multidimensional (MDS) Figura2 se observó una tendencia general de separación entre grupos; sin embargo, también se identificó variabilidad intragrupal. En particular, una muestra del grupo expuesto, identificada como E7,

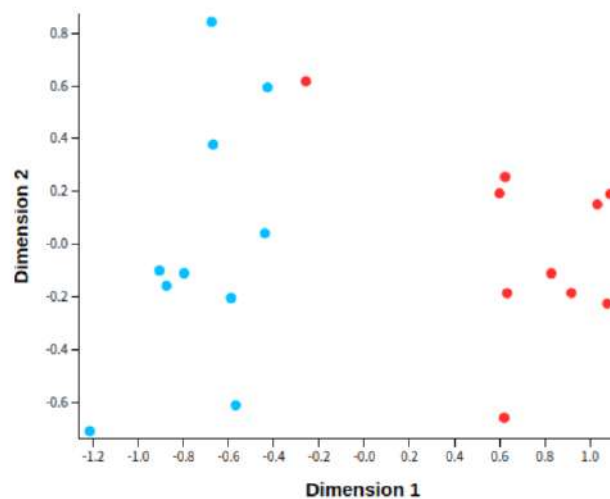
mostró un comportamiento más cercano al grupo control, lo que sugiere heterogeneidad biológica o técnica dentro del grupo ocupacionalmente expuesto.



*Figura1.- Análisis de componentes principales (PCA) realizado sobre los valores de expresión génica normalizados de las muestras. Los ejes X y Y muestran PC1 y PC2, respectivamente, con la cantidad de varianza por cada componente informado. Cada punto del gráfico representa una muestra, puntos de los mismos colores son réplicas del mismo grupo experimental.*

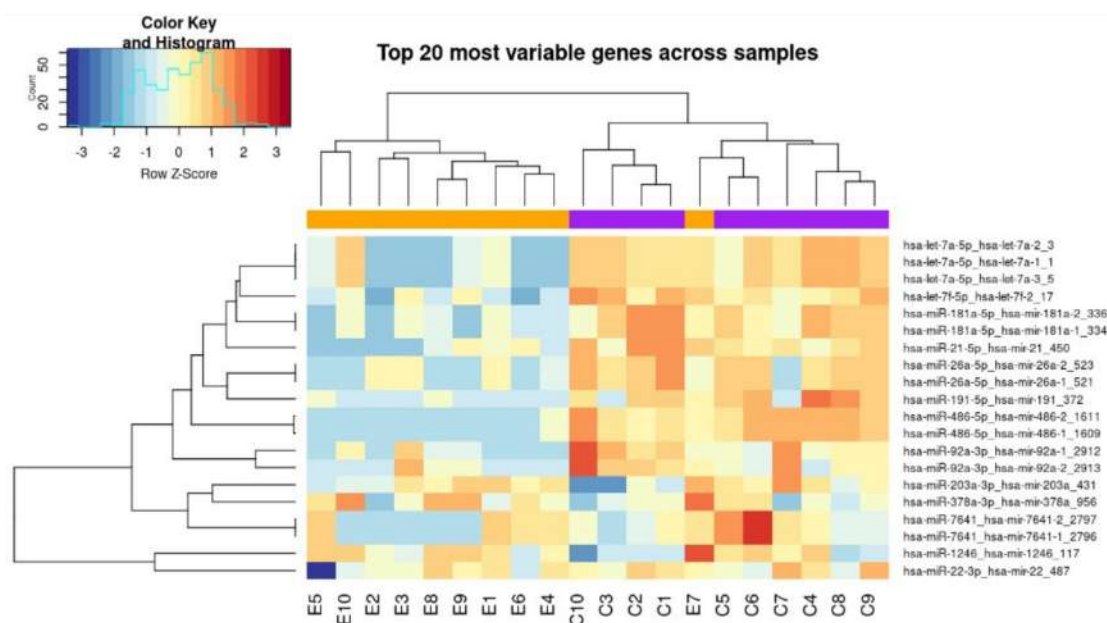


**MDS Plot**



*Figura 2 Escalado Multidimensional (MDS) realizado sobre los valores de expresión normalizados de las muestras de microRNAs. Los ejes X y Y muestran dimensión 1 y dimensión 2, respectivamente, Cada punto del gráfico representa una muestra, puntos de los mismos colores son réplicas del mismo grupo experimental.*

Adicionalmente, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (clustering) para visualizar los patrones de expresión de los 20 microRNAs con mayor varianza entre las muestras analizadas. Este enfoque permite identificar firmas moleculares distintivas y evaluar la homogeneidad de los grupos experimentales.



*Figura 3. Se observa el top 20 de los miRNAs con mayor varianza entre las muestras. Los mosaicos reflejan una bajo expresión en tonos azules mientras que la sobre expresión se muestra en rojo.*

El dendrograma superior (Figura 3) revela una separación primaria en dos clústeres principales que corresponden, en su mayoría, a la clasificación experimental de las muestras: Clúster de Expuestos (Grupo E): Se observa un bloque consistente de muestras (E1-E6, E8-E10) que presentan un perfil de expresión caracterizado por una marcada sub-expresión (tonos azules) en la mayoría de los miRNAs seleccionados. Clúster de Controles (Grupo C): Las muestras testigo muestran una tendencia hacia la sobre-expresión relativa (tonos naranjas/rojos), lo que sugiere que la exposición crónica a agroquímicos está asociada con una represión generalizada de los miRNAs analizados. Esta distribución sugiere que la exposición a agroquímicos podría asociarse con variabilidad en el perfil de expresión de microRNAs, aunque no de forma completamente uniforme entre todos los individuos expuestos.

#### **6.6. Expresión diferencial y candidatos priorizados**

Por su parte, el volcano plot permitió visualizar simultáneamente la magnitud del cambio de expresión y la significancia estadística de los microRNAs analizados. En esta figura se observó un predominio de señales desplazadas hacia la subexpresión en el grupo expuesto, en concordancia con la ausencia de microRNAs sobreexpresados y con la identificación de múltiples candidatos con baja expresión en la comparación entre grupos (Figura 4).

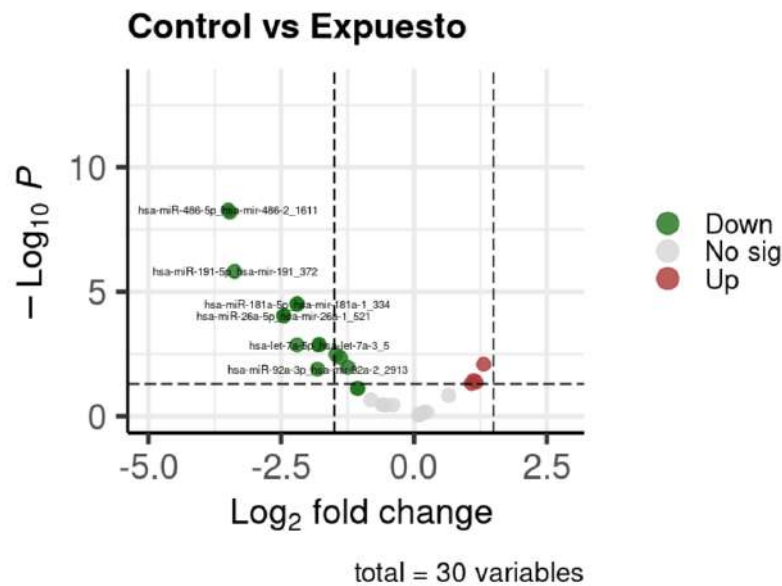


Figura 4.- Volcano plot genes de datos mRNA corresponden a FC = 1.5

A partir de la fase de descubrimiento por secuenciación se seleccionaron miR-486- 5p y miR-26a-5p como microRNAs candidatos para validación experimental. Esta selección se basó en la magnitud del cambio observado en el análisis exploratorio, en su posición destacada dentro del volcano plot y en su posible relevancia biológica en contextos de respuesta celular a exposición ambiental. Para la normalización de la expresión relativa se utilizó miR-16-5p como control endógeno de referencia.

## 6.7. Análisis funcional

Con el propósito de contextualizar biológicamente los microRNAs identificados en la fase exploratoria de expresión diferencial, se realizó un análisis funcional mediante DIANA-mirPath3, herramienta que permite asociar listas de miRNAs con vías

metabólicas a partir de blancos predichos por DIANA-microT-CDS y/o interacciones validadas experimentalmente derivadas de DIANA-TarBase 7.0. Este análisis se representó mediante un heatmap (figura 5) que muestra la relación entre los microRNAs incluidos en la lista de entrada y diferentes rutas biológicas, utilizando para ello un conjunto filtrado de 17 microRNAs. En términos generales, esta aproximación permitió explorar si los cambios observados en el perfil de expresión podían agruparse en procesos funcionales comunes y, con ello, aportar plausibilidad biológica a los hallazgos de la fase de descubrimiento. (Riolo et al., 2020).

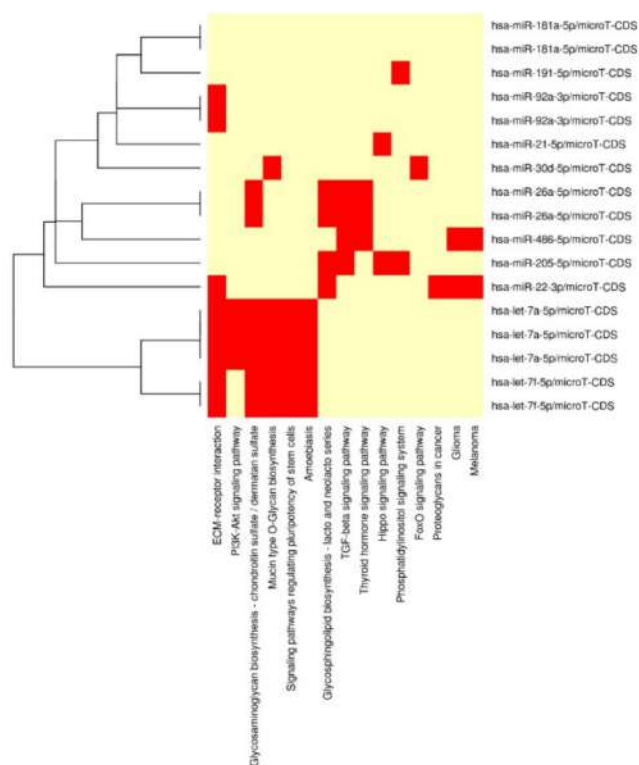


Figura 5.- Fragmento de Heatmap de funciones asociadas a la lista del top de miRNAs.

La inspección del heatmap funcional mostró que los microRNAs priorizados no convergieron en una única vía, sino que se distribuyeron en conjuntos de asociaciones que sugieren la participación de redes biológicas parcialmente interconectadas. Entre las rutas identificadas se encontraron procesos relacionados con interacción célula-matriz, señalización intracelular, glicobiología, regulación del destino celular y rutas anotadas en KEGG en contextos oncológicos. En conjunto, estas asociaciones sugieren que la alteración del perfil de microRNAs en células epiteliales bucales podría vincularse con modificaciones regulatorias de amplio espectro, más que con un cambio restringido a una sola vía molecular. Un primer bloque funcional estuvo integrado por rutas como Interacción ECM-receptor, vía de señalización PI3K-Akt, biosíntesis de glucosaminoglicanos — sulfato de condroitina/sulfato de dermatán, biosíntesis de O-glicanos tipo mucina, vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre y amebiasis. En este conjunto destacaron principalmente miembros de la familia let-7, en particular let-7a-5p y let-7f-5p, que mostraron múltiples asociaciones dentro de este módulo.

La presencia de estas rutas sugiere una posible relación de los microRNAs priorizados con procesos de adhesión celular, interacción con la matriz extracelular, organización de glicoconjugados de membrana y mantenimiento del estado epitelial. Un segundo bloque funcional agrupó rutas más claramente vinculadas con señalización celular y control del destino celular, entre ellas Vía de señalización de TGF-beta, vía de señalización Hippo, sistema de señalización de fosfatidilinositol, vía de señalización FoxO y vía de señalización de hormona tiroidea. En este módulo participaron

microRNAs como miR-26a-5p, miR-486-5p, miR-205- 5p y miR-22-3p, además de contribuciones puntuales de otros candidatos incluidos en la lista. Este patrón sugiere una posible participación de los microRNAs priorizados en rutas relacionadas con proliferación, diferenciación, supervivencia celular, respuesta al estrés y señalización dependiente de membrana. Aunque este resultado no permite inferir activación o inhibición específica de dichas rutas, sí aporta un marco interpretativo consistente con una reorganización regulatoria en respuesta a una exposición crónica.

Asimismo, el heatmap mostró asociaciones con rutas como proteoglycans in cancer, glioma y melanoma. Su aparición en el análisis funcional debe leerse como una indicación de que varios de los microRNAs priorizados convergen en nodos regulatorios comúnmente representados en rutas oncológicas, pero con posible relevancia también en contextos no neoplásicos.

Desde una perspectiva integradora, el análisis funcional sugiere que los microRNAs priorizados podrían agruparse en al menos dos ejes biológicos: uno relacionado con la arquitectura epitelial y el microambiente celular, y otro vinculado con redes de señalización intracelular y respuesta adaptativa. De manera particular, la presencia de miR-26a-5p y miR-486-5p dentro del módulo de señalización celular resulta relevante ya que su posicionamiento dentro de rutas como TGF-beta, Hippo, FoxO y señalización de fosfatidilinositol, sugiere que, al menos desde el punto de vista bioinformático, estos candidatos podrían ocupar un lugar de interés dentro de redes asociadas con control del crecimiento, respuesta al estrés y mantenimiento de la viabilidad celular.

Por lo tanto, la selección de estos dos microRNAs para evaluación por RT-qPCR no solo respondió a su comportamiento en el análisis de expresión diferencial, sino también a su inserción en un marco funcional con aparente relevancia biológica.

## 6.8. Validación por RT-qPCR

En el caso de miR-486-5p, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. El valor promedio de  $\Delta Ct$  fue de  $-4.58 \pm 3.96$  en el grupo expuesto y de  $-5.73 \pm 4.63$  en el grupo control, con una diferencia no significativa ( $U = 33.0$ ;  $p = 0.819$ ) (Tabla 2). De manera similar, miR-26a-5p tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos. El valor promedio de  $\Delta Ct$  fue de  $0.31 \pm 3.60$  en el grupo expuesto y de  $0.60 \pm 4.09$  en el grupo control ( $U = 28.0$ ;  $p = 0.960$ ) (Tabla 2).

| miRNA      | n EXP | $\Delta Ct$ EXP (media $\pm$ DE) | Mediana EXP (RIC)     | n CON | $\Delta Ct$ CON (media $\pm$ DE) | Mediana CON (RIC)     | U de Mann-Whitney | p     |
|------------|-------|----------------------------------|-----------------------|-------|----------------------------------|-----------------------|-------------------|-------|
| miR-486-5p | 20    | $-4.58 \pm 3.96$                 | -4.30 (-7.20 a -1.50) | 3     | $-5.73 \pm 4.63$                 | -8.10 (-8.40 a -4.25) | 33.0              | 0.819 |
| miR-26a-5p | 18    | $0.31 \pm 3.60$                  | -0.12 (-1.83 a 0.61)  | 3     | $0.60 \pm 4.09$                  | -1.35 (-1.75 a 1.97)  | 28.0              | 0.960 |

*Tabla 2.- Comparación de la expresión relativa de miR-486-5p y miR-26a-5p entre el grupo expuesto y el grupo control mediante RT-qPCR.*

Por otra parte, el microRNA utilizado como control endógeno, miR-16-5p, no presentó diferencias significativas en sus valores de Ct entre expuestos y controles ( $U = 25.0$ ;  $p = 0.681$ ), aunque se observó una dispersión relativamente amplia en el grupo expuesto. (Tabla 3)

| Variable  | n EXP | Ct EXP (media $\pm$ DE) | Mediana EXP (RIC)     | n CON | Ct CON (media $\pm$ DE) | Mediana CON (RIC)     | U de Mann-Whitney | p     |
|-----------|-------|-------------------------|-----------------------|-------|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------|
| miR-16-5p | 20    | 28.23 $\pm$ 3.84        | 27.45 (25.38 a 30.95) | 3     | 29.50 $\pm$ 3.75        | 30.70 (28.00 a 31.60) | 25                | 0.681 |

*Tabla 3.- Comparación de los valores de Ct de miR-16-5p entre el grupo expuesto y el grupo control.*

## 7. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la exposición ocupacional crónica a agroquímicos induce modificaciones sutiles y complejas en el perfil de expresión de miRNAs en células epiteliales bucales.

El análisis descriptivo de la población estudiada, mostró que los grupos fueron similares en edad, pero diferentes en composición por sexo, IMC, circunferencia de cintura, consumo de alcohol y uso de medicamentos. Estas diferencias son importantes porque pueden modificar la interpretación de síntomas y de posibles biomarcadores asociados a exposición.

El hallazgo más consistente relacionado con exposición fue la mayor proporción de individuos sintomáticos en el grupo expuesto. Nueve de cada diez trabajadores expuestos reportaron al menos un síntoma, frente a seis de cada diez controles. Además, síntomas como dolor de cabeza, mareos, comezón y falta de concentración fueron más frecuentes en expuestos. No obstante, el número promedio de síntomas fue similar entre grupos, lo cual sugiere que la exposición no se reflejó necesariamente en una mayor carga total de síntomas bajo el método de conteo de términos utilizado.

Esta discrepancia puede deberse al tamaño muestral, a la inespecificidad de los síntomas, a diferencias en la forma de captura o al hecho de que algunos controles concentraron varios síntomas. El grupo expuesto presentó una historia laboral compatible con exposición crónica, ya que 60% reportó más de 10 años de antigüedad laboral y 80% participaba en actividades de aspersión. Además, solo la mitad reportó uso de equipo de protección personal.

Estos elementos fortalecen la caracterización del grupo como ocupacionalmente expuesto. Sin embargo, la interpretación debe ser cautelosa.

El grupo control presentó mayor IMC promedio, mayor proporción de obesidad y mayor uso de medicamentos. Estos factores podrían explicar parte de la sintomatología observada en controles y actuar como variables de confusión. A su vez, el mayor consumo de alcohol en expuestos podría influir en la respuesta biológica a los agroquímicos o en variables moleculares que se analicen posteriormente.

Una limitación central del análisis es el tamaño muestral reducido, con 10 participantes por grupo, los porcentajes pueden cambiar de forma importante con la reclasificación de uno o dos individuos. Además, el grupo expuesto estuvo compuesto exclusivamente por hombres, mientras que el grupo control incluyó hombres y mujeres en igual proporción, esta diferencia limita la comparabilidad directa.

Otra limitación es el uso de datos auto-reportados. La información sobre síntomas, hábitos, uso de protección y plaguicidas puede estar sujeta a sesgo de memoria, subregistro o interpretación subjetiva. Asimismo, los plaguicidas fueron analizados como menciones en texto libre, por lo que no es posible estimar dosis ni frecuencia real de exposición.

A pesar de estas limitaciones, el análisis permitió identificar diferencias relevantes entre grupos y caracterizar mejor el contexto de exposición con base en el perfil de miRNAs expresados en cada grupo.

El análisis global de los datos mostró una tendencia de separación entre el grupo expuesto y el grupo control en el PCA, así como un patrón diferencial de agrupamiento en el heatmap, lo que indica que, a nivel transcriptómico, existen diferencias globales entre ambos grupos. En particular, los dos primeros componentes principales explicaron 79% de la varianza total, delineando un perfil caracterizado predominantemente por la subexpresión de diversos miRNAs en los individuos expuestos.

A pesar de esta tendencia global, se observó una notable heterogeneidad biológica dentro del grupo de exposición ocupacional, ejemplificada por el comportamiento atípico de la muestra E7. Esta variabilidad intra-grupo es un fenómeno documentado y esperado en estudios de epidemiología molecular toxicológica, autores como Weldon et al. (2016) y Vrijens y Bollati (2015) subrayan que las poblaciones agrícolas están sometidas a mezclas complejas y fluctuantes de xenobióticos, donde la dosis interna y la respuesta biológica están mediadas por factores de confusión difíciles de estandarizar, tales como la susceptibilidad genética individual, el uso inconsistente de equipo de protección personal, el tabaquismo y el tiempo transcurrido desde la última aplicación.

A pesar de esta separación global entre grupos, el análisis de expresión diferencial debe interpretarse con cautela. Aunque en la comparación entre controles y expuestos se identificaron 19 microRNAs con  $p < 0.05$  y 12 candidatos bajoexpresados con  $|FC| \geq 1.5$ , no se detectaron elementos con significancia estadística después de la corrección por comparaciones múltiples, es decir, con  $p$  ajustada  $< 0.05$ .

Por ello, los hallazgos derivados de la fase de secuenciación deben considerarse exploratorios y no concluyentes. Esta observación es particularmente importante desde una perspectiva metodológica, ya que la pérdida de significancia tras ajustes estadísticos estrictos es un desafío común en las tecnologías de alto rendimiento aplicadas al biomonitorio humano, donde la señal de exposiciones crónicas a bajas dosis suele ser superada por el ruido del background biológico (Benesova & Kubista, 2021).

Bajo esta premisa, la selección de microRNAs candidatos para validación se sustentó no solo en la magnitud del cambio observado, sino también en la plausibilidad biológica aportada por el análisis funcional. En este punto, el estudio aporta un elemento valioso: los microRNAs priorizados no se distribuyeron aleatoriamente, sino que convergieron en rutas que sugieren la participación de redes regulatorias compartidas.

Para proporcionar contexto biológico a la firma exploratoria, el análisis funcional de los miRNAs priorizados (utilizando DIANA-mirPath3) reveló que no estaban distribuidos al azar, sino que convergían en redes de señalización altamente relevantes para efectos toxicológicos. El análisis funcional mostró que los candidatos se agruparon principalmente en dos grandes ejes biológicos. Por un lado, un primer bloque funcional vinculado a la interacción célula-matriz, adhesión y arquitectura epitelial (interacción receptor-ECM, biosíntesis de glicosaminoglicanos y mucinas). En este módulo destacó la participación de la familia de miRNAs let-7 (particularmente let-7a-5p y let-7f-5p).

La literatura indica que los miembros de la familia let-7 actúan predominantemente como supresores tumorales y reguladores del desarrollo (Leitão & Enguita, 2022),

además, se ha documentado previamente la subexpresión de la familia let-7 en respuesta a carcinógenos ambientales como el humo del tabaco y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), vinculando su represión con el inicio de procesos oncogénicos (Letelier et al., 2023; Tumolo et al., 2019).

Un segundo bloque funcional agrupó vías centrales de control del destino celular, proliferación y respuesta al estrés, incluyendo las vías de señalización PI3K-Akt, TGF-beta, Hippo, FoxO y del fosfatidilinositol. La vía PI3K-Akt es fundamental en la supervivencia celular y ha sido reportada como un blanco de desregulación por contaminantes ambientales y plaguicidas que inducen estrés oxidativo (Costa et al., 2020). Asimismo, la vía TGF-beta está íntimamente ligada a procesos de transición epitelio-mesénquima y fibrosis tisular, fenómenos asociados a la inflamación crónica inducida por xenobióticos (Sobral et al., 2023; Valbuena et al., 2020).

Que los miRNAs de las células bucales de agricultores converjan en estas rutas sugiere que el epitelio oral, siendo la primera barrera física frente a la inhalación y deglución de aerosoles de plaguicidas (Sánchez-Alarcón et al., 2021), está montando una respuesta adaptativa o sufriendo una disrupción temprana en su homeostasis.

El análisis funcional constituye un enfoque de enriquecimiento basado en blancos moleculares predichos y/o validados, por lo que no demuestra activación ni inhibición real de las rutas señaladas, más bien, aporta un marco conceptual útil para comprender por qué ciertos candidatos resultaron de interés en la fase de descubrimiento. En esta misma línea, resulta particularmente relevante la posición de miR-486-5p y miR-26a-5p dentro del heatmap funcional.

Ambos miRNAs se asociaron con rutas centrales de señalización celular y, por tanto, su selección para validación por RT-qPCR fue metodológicamente consistente, es decir, estos microRNAs no solo destacaron por su comportamiento en el volcano plot y en el análisis exploratorio, sino también por su inserción en redes funcionales que podrían tener relevancia en el contexto de exposición ocupacional.

Desde la perspectiva biológica, el miR-486-5p cuenta con evidencia previa que respalda su sensibilidad ante tóxicos ambientales. Estudios en poblaciones con exposición ocupacional a metales pesados demostraron que miR-486 es un biomarcador potencial de toxicidad por mercurio; funcionalmente, este miRNA es capaz de sostener la actividad del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), promoviendo bucles de inflamación sostenida (Felekakis & Papanepoyt, 2020; de Gonzalo-Calvo et al., 2022). Su desregulación también se ha implicado en la patogénesis de tumores pulmonares (de Gonzalo-Calvo et al., 2022).

Por su parte, aunque el miR-26a-5p emergió bioinformáticamente en nuestro modelo y se vincula con rutas de señalización como TGF-beta, la evidencia directa y específica que asocie al miR-26a-5p con la exposición a plaguicidas agrícolas es escasa en la literatura actual.

A pesar de este contexto biológico y un respaldo bioinformático, la validación por RT-qPCR no arrojó diferencias significativas para miR-486-5p ( $p = 0.819$ ) ni para miR-26a-5p ( $p = 0.960$ ).

Para la normalización de este ensayo se utilizó el miR-16-5p como control endógeno, el cual mostró estabilidad metodológica al no presentar diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.681$ ).

Es importante destacar que la elección de genes de referencia debe ser estrictamente contextual; si bien el miR-16-5p fue estable frente a la exposición a plaguicidas en esta cohorte, la selección como de miR-16-5p como gen de referencia en muestras de la cavidad oral se sustenta en su elevada estabilidad y expresión constitutiva en el epitelio escamoso humano, superando en fidelidad a controles tradicionales como el RNU6B, el cual puede presentar variaciones ante procesos de degradación celular. Diversos estudios han demostrado que miR-16-5p mantiene un valor de estabilidad óptimo en biofluidos y tejidos sólidos (Felekkis & Papanephytou, 2020), lo que lo posiciona como un normalizador ideal para estudios de toxicología genética donde la integridad del RNA puede verse comprometida por la exposición a agentes xenobióticos (de Gonzalo-Calvo et al., 2022).

La falta de validación de los hallazgos de secuenciación mediante RT-qPCR es un fenómeno documentado y multifactorial en la transcriptómica, este hallazgo no invalida la fase exploratoria, pero sí redefine su alcance.

En términos interpretativos, sugiere que los cambios observados en el análisis de miRNA-seq para estos candidatos fueron modestos. Además, tecnológicamente, la secuenciación de nueva generación ofrece una cuantificación absoluta y es sensible a la detección de isoformas de miRNAs (isomiRs), variaciones de un solo nucleótido y ediciones terminales de RNA. Por el contrario, la RT-qPCR se basa en la hibridación

de primers altamente específicos para una secuencia madura canónica; cualquier modificación post-transcripcional o variación en los extremos del miRNA inducida por el estrés químico podría impedir la amplificación en la PCR, generando discrepancias entre ambas plataformas (Benesova & Kubista, 2021; Liu et al., 2011). Adicionalmente, el tamaño de muestra utilizado en la fase de RT-qPCR fue limitado, particularmente en el grupo control (n=3), lo que redujo el poder estadístico para detectar diferencias pequeñas o moderadas.

En segundo lugar, la dispersión observada en los valores de Ct y  $\Delta$ Ct sugiere una variabilidad biológica considerable entre las muestras analizadas, lo que coincide con la heterogeneidad ya observada en la fase exploratoria y que además pudiera ser atribuible a los desbalances en la muestra poblacional estudiada.

Aunque los resultados de RT-qPCR no parecen tener diferencia significativa, si hay una tendencia en cada uno de los grupos estudiados que parece seguir a lo observado en la fase exploratoria con NGS.

El conjunto de estos resultados permiten sostener que la exposición ocupacional a agroquímicos podría asociarse con modificaciones en el perfil regulatorio de microRNAs en células epiteliales bucales; sin embargo, la evidencia obtenida en este estudio no permite afirmar la existencia de una firma molecular robusta ni de biomarcadores confirmados de exposición, más bien, los hallazgos apuntan a la presencia de microRNAs candidatos y de tendencias regulatorias exploratorias que justifican estudios posteriores con un diseño de validación más amplio.

Desde un punto de vista metodológico, una de las principales fortalezas de esta investigación radica en la matriz biológica elegida. El hisopado bucal se consolida como una estrategia mínimamente invasiva, altamente aceptada en estudios de campo y toxicológicamente relevante, como señalan Sánchez-Alarcón et al. (2021) y Moreira et al. (2025), las células bucales no solo reflejan el contacto directo con aerosoles tóxicos, sino que correlacionan bien con el daño genómico sistémico (como se ha probado ampliamente en el ensayo de micronúcleos).

Sabemos que el estudio presenta limitaciones, además de la reducción del tamaño muestral en la fase de validación, la ausencia de una medición biológica cuantitativa (ej. niveles de dialquifosfatos en orina o metabolitos en sangre) que impide establecer una relación dosis-respuesta. Tampoco fue posible desglosar el efecto individual de cada agroquímico, ya que los agricultores están sometidos a exposiciones de mezclas y con bajo apego a protocolos estandarizados para el uso de equipo de protección personal.

## 8. Conclusiones

El presente estudio permitió caracterizar de manera exploratoria el perfil de expresión de microRNAs en células epiteliales bucales de trabajadores agrícolas con exposición ocupacional crónica a agroquímicos, en comparación con un grupo control no expuesto. En conjunto, los resultados sugieren que la exposición a agroquímicos podría asociarse con modificaciones en el perfil de expresión de microRNAs en este tipo celular.

En la fase de descubrimiento por secuenciación de smallRNA, el análisis global mostró una tendencia de separación entre los grupos expuesto y control, así como patrones diferenciales de agrupamiento en los análisis multivariantes y en el heatmap.

Estos hallazgos indican que existen diferencias globales en los perfiles de expresión de microRNAs entre ambos grupos, aunque con heterogeneidad intragrupal, particularmente entre los individuos expuestos.

El análisis de expresión diferencial permitió identificar microRNAs candidatos con cambios de expresión entre grupos; sin embargo, dichos hallazgos no se sostuvieron con significancia robusta después de la corrección por comparaciones múltiples. Por lo tanto, los resultados derivados de la fase de secuenciación deben considerarse de naturaleza exploratoria.

El análisis funcional aportó plausibilidad biológica a los hallazgos de la fase exploratoria, al mostrar que los microRNAs priorizados se relacionaron con rutas asociadas con interacción célula-matriz, señalización intracelular, glicobiología y regulación del destino celular.

En este sentido, los resultados sugieren que la exposición ocupacional crónica a agroquímicos podría vincularse con procesos regulatorios complejos que impactan la homeostasis epitelial y la respuesta adaptativa celular.

Los microRNAs miR-486-5p y miR-26a-5p fueron seleccionados para validación experimental por su comportamiento en el análisis exploratorio y por su inserción en rutas funcionales de interés. No obstante, la validación mediante RT-qPCR no confirmó diferencias estadísticamente significativas entre expuestos y controles para ninguno de estos candidatos.

Este resultado indica que, en la cohorte analizada, los cambios observados en la fase de descubrimiento no fueron suficientemente consistentes para reproducirse mediante una metodología independiente, en consecuencia, la evidencia generada en este trabajo no permite proponer a miR- 486-5p ni a miR-26a-5p como biomarcadores confirmados de exposición ocupacional a agroquímicos. Sin embargo, sí permite considerarlos como microRNAs candidatos de interés, cuya relevancia biológica y posible utilidad deberán reevaluarse en estudios posteriores con mayor robustez metodológica.

Finalmente, este estudio demuestra la factibilidad de utilizar células epiteliales bucales como una matriz biológica accesible y mínimamente invasiva para el análisis de microRNAs en contextos de exposición ocupacional.

En este sentido, el trabajo constituye una base inicial para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de biomarcadores moleculares de exposición ambiental y ocupacional, a partir de los hallazgos obtenidos, resulta importante ampliar el tamaño

de muestra en estudios futuros, con el fin de incrementar el poder estadístico y mejorar la capacidad para detectar diferencias sutiles pero biológicamente relevantes en la expresión de microRNAs.

Será importante incorporar una caracterización más precisa de la exposición, considerando variables como tipo de plaguicida, intensidad, frecuencia, tiempo acumulado de exposición y uso de equipo de protección personal. Esto permitiría reducir la heterogeneidad del grupo expuesto y favorecer análisis más finos de asociación entre exposición y perfil molecular.

También se recomienda fortalecer la fase de validación experimental mediante la inclusión de una cohorte independiente, el uso de más de un control endógeno para normalización y la evaluación de un mayor número de microRNAs candidatos derivados de la fase de descubrimiento.

De esta manera, sería posible determinar con mayor solidez cuáles señales son reproducibles y cuáles corresponden únicamente a hallazgos exploratorios. (de Gonzalo-Calvo et al., 2022; Felekis & Papaneophytou, 2020).

En términos biológicos, una línea de investigación futura podría consistir en complementar el análisis de microRNAs con otras capas moleculares, como la expresión de genes blanco, marcadores de estrés oxidativo, daño genotóxico o proteínas relacionadas con las rutas funcionales identificadas.

Esta aproximación permitiría comprender con mayor profundidad el posible impacto de la exposición crónica a agroquímicos sobre la regulación celular. De igual forma, será

relevante explorar la utilidad del epitelio bucal como matriz para estudios longitudinales, en los que pueda evaluarse la estabilidad temporal de los microRNAs y su relación con exposiciones acumuladas o recientes. Esto podría aportar evidencia sobre su potencial como herramienta de monitoreo biológico no invasivo.

En conjunto, los resultados del presente estudio abren una línea de investigación prometedora en el campo de la toxicología molecular y la epigenética ambiental, al sugerir que los microRNAs en células epiteliales bucales podrían constituir una fuente de información útil para estudiar la respuesta biológica asociada con la exposición ocupacional a agroquímicos. No obstante, su aplicación como biomarcadores requerirá validación adicional en diseños más amplios, controlados y reproducibles. (Valencia-Quintana et al., 2022; Vrijens & Bollati, 2015).

## 9. Referencias

Benesova, S., & Kubista, M. (2021). Small RNA-sequencing approaches and considerations for miRNA analysis. Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, CAS.

Costa, C., Teodoro, M., Rugolo, C. A., Alibrando, C., Giambò, F., Briguglio, G., & Fenga, C. (2020). MicroRNAs alteration as early biomarkers for cancer and neurodegenerative diseases: New challenges in pesticides exposure. *Toxicology Reports*, 7, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.05.003>

de Gonzalo-Calvo, D., Pérez-Boza, J., Curado, J., & Devaux, Y. (2022). Challenges of microRNA-based biomarkers in clinical application for cardiovascular diseases. *Clinical and Translational Medicine*, 12(2), e585. <https://doi.org/10.1002/ctm2.585>

Dehghan, H., Farkhondeh, T., Darroudi, M., Yousefizadeh, S., & Samarghandian, S. (2023). Role of miRNAs in mediating organophosphate compounds induced toxicity. *Toxicology Reports*, 10, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.01.007>

Felekis, K., & Papanephytou, C. (2020). Challenges in using circulating micro-RNAs as biomarkers for cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 561. <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>

Florencia, R. M., Stoker, C., & Ramos, J. G. (2020). Agrochemicals and neurogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110820. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110820>

Francisco, L. F. V., Birolli, W. G., Hirai, W. Y., Freitas, A. J. A., Rohr, P., Nunes, C. R., ... Silveira, H. C. S. (2025). Occupational exposure to pesticides reveals a miRNAs expression profile indicating multiple disease risks. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 304, 119065. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.119065>

Gattuso, G., Falzone, L., Costa, C., Giambò, F., Teodoro, M., Vivarelli, S., ... Fenga, C. (2022). Chronic pesticide exposure in farm workers is associated with the epigenetic modulation of hsa-miR-199a-5p. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12), 7018. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127018>

Hou, L., & Wang, D. (2011). Environmental chemicals and microRNAs. *Mutation Research*, 714, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.004>

IRAC España. (2024). Folleto de clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas incluyendo nematocidas (Versión v 11.1). Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas.

Jáquez-Matas, S. V., Pérez-Santiago, G., Márquez-Linares, M. A., & Pérez-Verdín, G. (2022). Impactos económicos y ambientales de los plaguicidas en cultivos de maíz, alfalfa y nogal en Durango, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 221–233. <https://doi.org/10.20937/RICA.54169>

Ji, H., Xu, L., Wang, Z., Fan, X., & Wu, L. (2017). Differential microRNA expression in the prefrontal cortex of mouse offspring induced by glyphosate exposure during pregnancy and lactation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2457–2467. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5669>

Kim, Y.-K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), E1881–E1889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>

Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2022). A structural view of miRNA biogenesis and function. *Non-coding RNA*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>

Letelier, P., Saldías, R., Loren, P., Riquelme, I., & Guzmán, N. (2023). MicroRNAs as potential biomarkers of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and their link with inflammation and lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*.

Liu, J., Jennings, S. F., Tong, W., & Hong, H. (2011). Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: Technical progress and applications in drug development. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 4(10), 666–676. <https://doi.org/10.4236/jbise.2011.410083>

Lozano-Paniagua, D. (2017). Evaluación de la toxicidad de plaguicidas mediante biomarcadores moleculares y enzimáticos [Tesis doctoral, Universidad de Granada].

Maldonado Mariño, E. V., Siza Saquina, D. O., Guato Canchinia, D. E., & Ramos Velastegui, A. J. (2024). Estudio de los biomarcadores de genotoxicidad en los trabajadores agrícolas expuestos a pesticidas: Una revisión sistemática. *MediSur*, 22(6).

Moreira, A., Guedes, J., & Vieira da Silva, M. (2025). New methodologies and techniques for biomonitoring pesticide exposure in agricultural workers: A systematic review. *Toxics*, 13(2), 104. <https://doi.org/10.3390/toxics13020104>

Organización Mundial de la Salud. (2020). Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019. Organización Mundial de la Salud.

PAN Internacional. (2021). Lista de Plaguicidas Altamente Peligrosos de PAN Internacional. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México.

Qu, J., Li, W., Jia, C., Jiang, Q., Tang, R., Yin, Y., ... Yuan, Y. (2025). Persistent organic pollutants and plasma microRNAs: A community-based profiling analysis. *Environment International*, 197, 109328. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2025.109328>

Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C., & Ricci, C. (2020). miRNA targets: From prediction tools to experimental validation. *Methods and Protocols*, 4, 1.

Rohr, P., Karen, S., Francisco, L. F. V., Oliveira, M. A., Dos Santos Neto, M. F., & Silveira, H. C. S. (2024). Epigenetic processes involved in response to pesticide exposure in human populations: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Epigenetics*, 10(1), dvae005.

Sánchez-Alarcón, J., Milić, M., Kašuba, V., Tenorio-Arvide, M. G., Montiel-González, J. M. R., Bonassi, S., & Valencia-Quintana, R. (2021). A systematic review of studies

on genotoxicity and related biomarkers in populations exposed to pesticides in Mexico. *Toxics*, 9(11), 272. <https://doi.org/10.3390/toxics9110272>

Sevim, C., Tsatsakis, A., Taghizadehghalehjoughi, A., Ozkaraca, M., Kara, M., Genc, S., ... Ozcagli, E. (2023). Investigation of the miRNA levels changes to acceptable daily intake dose pesticide mixture exposure on rat mesentery and pancreas. *Chemosphere*, 335, 140712. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140712>

Silveira-Gramont, M. I., Aldana, L., Valenzuela, A. I., Ochoa, C. B., Jasa-Silveira, G., & Camarena, B. (2018). Plaguicidas agrícolas: Un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 7–21.

Sisto, R., Capone, P., Cerini, L., Sanjust, F., Paci, E., Pignini, D., ... Tranfo, G. (2019). Circulating microRNAs as potential biomarkers of occupational exposure to low dose organic solvents. *Toxicology Reports*, 6, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.01.001>

Sobral, A. F., Cunha, A., Costa, I., Silva-Carvalho, M., Silva, R., & Barbosa, D. J. (2023). Environmental xenobiotics and epigenetic modifications: Implications for human health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*.

Tumolo, M. R., Panico, A., De Donno, A., Mincarone, P., Leo, C. G., Guarino, R., ... Sabina, S. (2019). The expression of microRNAs and exposure to environmental contaminants related to human health: A review. *International Journal of Environmental Health Research*, 29(6).

Valbuena, D. S., Meléndez-Flórez, M. P., Villegas, V. E., Sánchez, M. C., & Rondón-Lagos, M. (2020). Daño celular y genético como determinantes de la toxicidad de los plaguicidas. *Ciencia en Desarrollo*, 11(2).  
<https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n2.2020.11245>

Valencia-Quintana, R., Bahena-Ocampo, I. U., González-Castañeda, G., Bonilla, E., Milić, M., Bonassi, S., & Sánchez-Alarcón, J. (2022). miRNAs: A potentially valuable tool in pesticide toxicology assessment-current experimental and epidemiological data review. *Chemosphere*, 295, 133792.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133792>

Valencia-Quintana, R., Milić, M., Bonassi, S., Ochoa-Ocaña, M. A., Campos-Peña, V., Tenorio-Arvide, M. G., ... Sánchez-Alarcón, J. (2023). Effect of pesticide exposure over DNA damage in farmers from Los Reyes, Michoacan in Mexico. *Toxics*, 11, 122.

Vélez Salas, D. M., Vélez Salas, M. A., Acosta Chávez, F., Ambrosio Jaramillo, L. J., Peláez Gálvez, A., Pérez García, K., ... Canizalez Madrigal, Y. E. (2021). Mercado de plaguicidas ilegales en México. Observatorio Nacional Ciudadano de Seguridad, Justicia y Legalidad.

Vrijens, K., & Bollati, V. (2015). MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: A systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399–411. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408459>

Weldon, B. A., Shubin, S. P., Smith, M. N., Workman, T., Artemenko, A., Griffith, W. C., ... Faustman, E. M. (2016). Urinary microRNAs as potential biomarkers of pesticide

exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 312, 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.018>

Wu, K., & He, J. (2018). The role of Exportin-5 in microRNA biogenesis and cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(2), 120–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.09.004>

Yuan, H., & Yuan, M. (2018). MicroRNA expression profiling in human acute organophosphorus poisoning and functional analysis of dysregulated miRNAs. *African Health Sciences*, 18(2), 333–342. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i2.18>