

ARTICULO ORIGINAL

Maria Eugenia Ascamunz*
 Noemi Tirado**
 Ana Rosa González***
 Marina Cufi****
 Rafael Cervantes*****
 Omar Huici*****
 Erik Jors*****

Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas

RESUMEN

Objetivo

Detectar los efectos citotóxicos y genotóxicos en trabajadores agrícolas, mediante estudios de biomonitoreo genético.

Diseño**Casos y controles****Participantes**

Trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Mecapaca y Palca del Departamento de La Paz

Lugar

Localidades de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca. Unidad de Genética Toxicológica, Instituto de Genética

Material y Métodos

Se aplicó cuestionario a 259 trabajadores agrícolas. Se evaluó el efecto genotóxico en linfocitos de sangre heparinizada, a través de la frecuencia de Intercambios entre Cromátides Hermanas (ICH), el índice de proliferación celular (PRI), el % de células con alta frecuencia de intercambios (%HFC), frecuencia de micronúcleos en células binucleadas (MNBN), el índice de división nuclear (IDN), la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales (AC), y parámetros de la prueba del cometa, como DNA de la cola, DNA de la cabeza, longitud de la cola, longitud del cometa, el momento de la cola y momento Olive.

Resultados

Los casos presentaron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la frecuencia de ICH, MN/BN y aberraciones cromosómicas, en relación a los controles. Así mismo, los parámetros de DNA de la cola, DNA de la cabeza, longitud de la cola, longitud del cometa, el momento de la cola y momento Olive, mostraron un aumento en relación a los controles, ($p < 0.05$).

Los valores promedio (\pm ES) de los parámetros del ensayo del cometa, fueron mayores y estadísticamente significativos

en los expuestos y RPP's en relación a los no expuestos. En el grupo de RPP's se observó daño genotóxico en menor proporción pero no significativo en relación a los expuestos, posiblemente por su capacitación en medidas de protección.

El análisis divariado entre exposición a plaguicidas y daño genotóxico mostró que las personas expuestas a plaguicidas tienen 1.49 veces más probabilidad de sufrir daño genotóxico con un OR de 2.49 (IC 95% 1.48 - 4.20).

Conclusiones

Los resultados indican que los trabajadores agrícolas expuestos sin protección ni medidas de seguridad a mezclas de plaguicidas, han experimentado riesgo genotóxico, que fue manifestado con elevada frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y parámetros del cometa, en linfocitos de sangre periférica. Así mismo, la presencia de aberraciones cromosómicas, que son las que determinan la asociación con efecto carcinogénico, muestra que los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas tienen mayor probabilidad de que las mutaciones encontradas al momento del estudio, puedan volverse irreversibles por la saturación de los sistemas de reparación del DNA y en el futuro desarrollar diversos tipos de cáncer.

Estos hallazgos son indicativos de la necesidad de realizar biomonitorización permanente de los agricultores ocupacionalmente expuestos a varias mezclas de plaguicidas, utilizando una batería de pruebas de genotoxicidad. Por otra parte, ilustra la necesidad de implementar pautas generales para minimizar o prevenir la exposición.

Palabras clave

Rev. Cuadernos 2006; 51(1) 7-18, Genotoxicidad, plaguicidas, trabajadores agrícolas, biomonitoreo, ICH, MN, aberraciones cromosómicas, ensayo del cometa.

* MSc. Jefe Unidad de Genética Toxicológica. Docente emérito. Instituto de Genética. email: maugescamunz@yahoo.com
 ** MSc. Docente investigador. Unidad de Genética Toxicológica. Instituto de Genética.
 *** MSc. Bioquímica Farmacéutica. Unidad de Genética Toxicológica. Instituto de Genética.
 **** Tec. Med. Unidad de Genética Toxicológica. Instituto de Genética
 ***** MD. Especialista en Salud Ocupacional. Proyecto PLAGBOL. INSO. CARE - Bolivia
 ***** Ing. Agrónomo. Proyecto PLAGBOL. INSO. CARE - Bolivia
 ***** MSc. Salud Ocupacional y Salud Internacional. Diálogos - DANIDA-Dinamarca

ABSTRACT

Objective

To detect the cytotoxic and genotoxic effects in farm workers, by means of genetic biomonitoring studies.

Design

Cases and controls

Participants

Farm workers from Caranavi, Guanay, Palca and Mecapaca

Place

Towns of Caranavi, Guanay, Palca and Mecapaca, Genetic Toxicology unit. Genetic Institute.

Material and methods

Questionnaires to 257 agricultural workers were applied genotoxic effect was evaluated in lymphocytes from heparinized blood, through analysis of sister chromatid Exchange (SCE), cells with a high frequency of SCE (HFC), proliferation rate index (PRI) the micronucleus (MN) assay, nuclear division index (NDI), chromosomal aberrations (CA) and comet assay parameters like DNA tail, DNA head, tail length comet length, tail moment and Olive moment.

Results

The frequency of SCE, MN/BN and CA was significantly increased ($p < 0.05$) in cases vs. control group. Likewise, the parameters of Tail DNA, DNA head, tail length, comet length, tail moment and Olive moment, showed increased values in relation to controls ($p < 0.05$).

Averages of comet parameters were significantly higher in exposed and RPP's

group than in an exposed group. RPP's groups showed minor DNA damage but not as significant as exposed group, possibly due to their training in protective measures.

The bivariate analysis between pesticides exposure and genotoxic damage showed that the people exposed to pesticides have 1.49 times more probability of suffering genotoxic damage with OR 2.49 (IC 95% 1.48 - 4.20).

Conclusions

The results indicate that the farm workers exposed to mixture of pesticides without protection and safety measures, are at genotoxic risk hazard, with high frequency of sister chromatid exchange, micronuclei, chromosomal aberrations and parameters of the comet assay in lymphocytes of peripheral blood. Also, the presence of chromosomal aberrations, which are those that determine the association with carcinogenic effect, shows that the farm workers exposed to pesticides have greater probability that the mutations found at the time of the study, can become irreversible by saturation of the DNA repair systems and in the future develop diverse types of cancer. These findings are indicative of the necessity to do permanent biomonitoring of the farmers occupationally exposed to several mixtures of pesticides, using a battery of genotoxicity tests. On the other hand, it illustrates the necessity to implement general guidelines to diminish or to prevent the exposure.

Key words

Genotoxicity, pesticides, farm workers, biomonitoring, SCE, MN, chromosomal aberrations, comet assay.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos genotóxicos son aquellos que actúan directa o indirectamente sobre el DNA o por evento clastogénico. El potencial genotóxico es un factor de riesgo primario para efectos crónicos o a largo plazo, tales como efecto carcinogénico y toxicidad reproductiva.

La evidencia toxicológica de la acción mutagénica y carcinogénica de varios plaguicidas y la exposición ocupacional o accidental de grandes poblaciones humanas a estos compuestos, han merecido la atención de muchos estudios citogenéticos. Un número limitado de estudios que buscan evaluar el riesgo genético de exposición ocupacional establecieron una asociación entre exposición ocupacional a plaguicidas y la presencia de aberraciones cromosómicas, intercambios entre cromátides hermanas y/o micronúcleos⁽¹⁻⁷⁾

Entre los diversos daños que puede sufrir el material genético, como consecuencia de condiciones ambientales perjudiciales, están las mutaciones puntuales y cromosómicas, que pueden propiciar la transformación celular. Si tales alteraciones ocurren en proto-oncogenes o genes supresores de tumores, los cuales están involucrados en el crecimiento y diferenciación celulares, pueden propiciar el desarrollo de un cáncer en el órgano comprometido; contribuir al envejecimiento prematuro, producir enfermedades vasculares, auto inmunes o degenerativas. Si ocurren en la línea germinal, pueden originar problemas reproductivos (infertilidad) como a su descendencia aumentando las enfermedades genéticas, tanto monogénicas como poligénicas^(5,8-10).

Algunos estudios muestran que varios ingredientes

de los agroquímicos poseen propiedades mutagénicas, es decir que inducen mutaciones, alteraciones cromosómicas o daño al DNA y una marcada correlación entre genotoxicidad y carcinogenicidad e indican que las pruebas de genotoxicidad a corto plazo son útiles para predecir carcinogenicidad, ya que se ha comprobado que la mayoría de los carcinógenos son genotóxicos, por lo tanto, la genotoxicidad podría ser un biomarcador intermedio entre la aparición de genotoxicidad y la carcinogénesis ⁽¹¹⁻¹³⁾

La exposición a plaguicidas puede representar un riesgo potencial para los seres humanos, ocasionando neuritis, manifestaciones psiquiátricas, trastornos hepatorenales, problemas neurológicos, inmunológicos, metabólicos y endocrinos. Asimismo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de leucemia y cáncer de vejiga en agricultores, como consecuencia de los efectos genotóxicos de algunos plaguicidas. Resultados de este tipo han llevado a muchos investigadores a evaluar el riesgo genético asociado a la exposición de plaguicidas ⁽¹⁴⁾.

Varios estudios han reportado asociaciones positivas entre exposición ocupacional a plaguicidas y muerte fetal (aborto espontáneo o nacidos muertos). Sin embargo, poco se conoce acerca de la toxicidad reproductiva humana de ingredientes activos de plaguicidas específicos y mucho menos de mezclas de plaguicidas y como ellos pueden interactuar con otros factores de riesgo ⁽¹⁵⁾.

Los modelos clásicos y moleculares para el estudio de la carcinogénesis han reconocido que éste proceso incluye una serie de cambios genéticos y epigenéticos, indicando que por lo menos y posiblemente varios eventos mutagénicos se requieren para desarrollar tumores malignos ⁽⁸⁾.

En la actualidad se utilizan diferentes pruebas *in vivo* e *in vitro* en sistemas celulares procarióticos y eucarióticos con un alto grado de sensibilidad, para medir diversos tipos de daños del DNA. Entre ellas están la prueba de micronúcleos (MN), aberraciones cromosómicas (AC), intercambio entre cromátides hermanas (ICH), prueba del cometa y aductos por HPLC ⁽¹⁻⁷⁾. En general, las pruebas de ICH y cometa son de gran utilidad en esta evaluación, por su sensibilidad para detectar daños crónicos y agudos respectivamente, por la rapidez con que se realizan y por su utilidad potencial para evaluar cualquier población celular eucariótica. La prueba de ICH muestra alta resolución en la evaluación del daño crónico, mientras que la prueba del cometa permite el análisis de datos individuales y el uso de muestras celulares extremadamente pequeñas, entre otras ventajas ⁽¹²⁻¹⁶⁾.

Las aberraciones cromosómicas (AC) pueden utilizarse como un signo de advertencia temprana para el desarrollo de cáncer, ya que la evidencia de correlación de daño genotóxico con las etapas

tempranas de cáncer en humanos ha sido consolidada en estudios de cohorte, y se ha confirmado que la detección de un aumento en la frecuencia de AC, relacionado con exposición a agentes genotóxicos, puede ser utilizado para estimar el riesgo carcinogénico. Aunque se han dirigido diferentes estudios en poblaciones ocupacionalmente expuestas a los plaguicidas, analizando por diferentes pruebas citogenéticas, algunos de los datos reportados son confusos e inconclusos. Estos estudios requieren una evaluación continua debido a las diferencias en el número, concentración y mezclas de plaguicidas, y también las diferencias en las medidas de protección, condiciones climáticas y de cosechas entre otros ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

El uso de plaguicidas en Bolivia es una práctica creciente y resulta de relevancia para la salud pública por los efectos potenciales de exposición activa en las poblaciones trabajadoras. Su uso en las prácticas de explotación agrícola, exponen a la población en general, y a los agricultores en particular, a situaciones de peligro para la salud, traducidas en diversos efectos tóxicos agudos, subcrónicos y crónicos, llegando en algunos casos a la muerte. La trascendencia aumenta por cuanto estas poblaciones están constituidas por niños y adultos con marcadas diferencias funcionales (inmunidad y sistema neurohumoral, actividad enzimática) y con características adicionales de desnutrición importante, falta de hábitos higiénicos, conocimientos sobre el uso y manejo de plaguicidas, medidas de protección personal, preparación de plaguicidas sin asesoría técnica, presencia de plaguicidas residuales en productos alimenticios, aguas, suelo y aire, aumentando la probabilidad de intoxicación a bajas dosis y por largo tiempo, provocando la acumulación de mutaciones en el DNA y aumentando el riesgo genotóxico ⁽¹⁵⁾.

La comprobación para la inducción de daño genético se ha llevado a cabo por diferentes pruebas, pero los estudios de biomonitorio humano por ensayos citogenéticos son los más comúnmente usados. Los objetivos de la biomonitorización como parte del proceso de evaluación del riesgo genético son la detección de la exposición a genotoxinas ambientales, la determinación de sus efectos genotóxicos *in vivo* ⁽¹⁷⁾ y la identificación de biomarcadores de genotoxicidad que puede definir un estado de prepatogénesis y dar las pautas para la prevención de la enfermedad. Dentro de los biomarcadores de genotoxicidad que han sido utilizados ampliamente, están la frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y ensayo del cometa ^(6,9,10,18,19).

El presente trabajo nos permitió evaluar el daño genotóxico y medir el riesgo genético en 4 poblaciones de trabajadores agrícolas ocupacionalmente expuestos a una mezcla de plaguicidas, a través de 4 diferentes métodos:

Intercambio entre cromátides hermanas, análisis de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y prueba del cometa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles. El tamaño de la muestra fue calculado con el paquete Epi info 2002. Se estudiaron 259 muestras de sangre de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Mecapaca y Palca.

Toda la población estudiada fue agrupada en 131 casos, 77 controles y 51 Responsables de plaguicidas (RPP's). Los Casos fueron aquellas personas expuestas o no a plaguicidas que presentaron daño genotóxico en por lo menos una prueba. Los Controles fueron aquellas personas expuestas o no a plaguicidas que no presentaron daño genotóxico por ninguna prueba de genotoxicidad. Los RPP's fueron los Responsables Promotores de Plaguicidas, expuestos a plaguicidas pero que han sido capacitados en el manejo y protección de los mismos.

Los criterios de exclusión para todos los grupos fue la enfermedad oncológica. De todos los voluntarios se obtuvo el consentimiento informado por escrito. El cuestionario incluyó información acerca de otros factores de riesgo o confundentes como hábito tabáquico, consumo de alcohol, historia clínica, uso de medicamentos, tareas de chaqueo, medidas de protección, tipo de plaguicidas utilizados y otros parámetros relacionados con el estudio.

El daño genotóxico fue evaluado a través de 4 pruebas citogenéticas, para medir daño primario se evaluó la frecuencia de Intercambio entre cromátides hermanas y los parámetros del ensayo del cometa y para medir el daño clastogénico se evaluó la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas y aberraciones cromosómicas.

Se tomó sangre venosa de cada sujeto utilizando tubos al vacío con heparina, las muestras fueron almacenadas en hielo y trasladadas para su análisis al laboratorio. La misma muestra de sangre fue utilizada para el análisis de los 4 métodos citogenéticos.

Intercambio entre cromátides hermanas

Los intercambios entre cromátides hermanas (ICH) evalúan el daño primario del DNA. Los linfocitos fueron incubados en medio RPMI-1640 (Sigma), suplementado con 1.5% penicilina-estreptomina (5000 IU/ml-5000 g/ml, respectivamente y 1% l-glutamina (Sigma), 5'-bromo-deoxyuridine (BrdU) (Sigma) (20 uM) y Phytohaemagglutinine (PHA) 2,5 mg/ml, en la oscuridad por 72 h en estufa a 37°C y las metafases fueron bloqueadas durante las 2 últimas horas con colchicina. Los ICH fueron preparados de acuerdo a protocolos convencionales⁽²⁰⁻²²⁾. Las

células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en una solución hipotónica precalentada a 37°C (0.075 M KCl) por 15 min y fijadas en ácido acético (1:3 v/v). Las placas de vidrio fueron secadas al aire y teñidas con Giemsa al 6% (pH 6.8), de acuerdo al método propuesto por Perry y Wolf⁽²⁰⁾ (1974). Las placas de cada cultivo fueron randomizadas y evaluadas a doble ciego, observándose ICH/célula en 30 metafases en segunda división por cada individuo. El índice de proliferación celular (PRI) fue calculado con la formula $RI = 1M1 + 2M2 + 3M3/100$, donde M1, M2 y M3 son metafases de primera, segunda y tercera división respectivamente. El análisis del % HFC fue realizado de acuerdo a Carrano y Moore⁽²¹⁾. Una célula con alta frecuencia de intercambios (HFC) fue definida como una célula que presenta un número mayor a 10 ICH/célula.

Micronúcleos en células binucleadas

Los micronúcleos evalúan el daño clastogénico y aneugénico. Se inició el cultivo con sangre total en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibióticos y antimicóticos, después de 44 horas de cultivo a 37° C se incorporó la citocalasina B a una concentración final de 6µg/ml y se completó el tiempo de cultivo hasta las 72 horas. Las células fueron sacrificadas, tratadas con solución hipotónica (0.075M KCl) por 15 min, se fijó adicionando suavemente tres veces la solución de metanol/acético (5:1). Las placas obtenidas fueron secadas al medio ambiente y posteriormente teñidas en una solución de Giemsa al 6% (v/v) en buffer Sørensen pH 6.8 durante 12 min. La evaluación microscópica se realizó en 1000 células binucleadas para cada individuo en placas codificadas, y se contaron el número total de MN y la frecuencia de células con MN (MNBN). Se contó además 500 linfocitos para evaluar el porcentaje de células con 1, 2, 3 o 4 núcleos, y se calculó el índice de división nuclear (IDN)⁽²³⁻²⁶⁾.

Prueba del cometa

Evalúa quiebras de simple y doble hebra del ADN, sitios alcali-lábiles y entrecruzamientos entre ADN/ADN o ADN/proteína asociados con sitios de reparación por escisión incompleta en células individuales. Esta prueba mide la migración de los fragmentos de DNA (DNA cola), fuera del núcleo, dejando el DNA intacto (DNA cabeza). Las imágenes resultantes, llamadas cometa por su apariencia, son medidas para determinar la magnitud del daño en el DNA. Las células fueron suspendidas en 0,7% de agarosa de bajo punto de fusión (BPF) en PBS y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1%, colocadas a 4°C por 10 min. Subsecuentemente se añadió una capa de agarosa (BPF) al 0,7% y colocados nuevamente a 4°C por 10 min, sumergidos en buffer de lisis 2,5M NaCl, 100 mM

Na₂EDTA, 10mM Tris-HCl pH 10, 1% Triton X-100 and 10% DMSO), por 1 h a 4°C. Después de la incubación en la solución de lisis, fueron expuestos a buffer alcalino (1mM Na₂EDTA, 300mM NaOH buffer, pH > 13) por 20 min para degradar el ARN. Finalmente, fueron sometidos a electroforesis por 20 min. a 300 mA, en el mismo buffer, lavados con buffer 0.4M Tris-HCl (pH 7.5) para neutralizar el exceso de álcali y remover los detergentes antes de teñir con bromuro de etidio (2ug/ml).^(27,28) Las células fueron examinadas bajo un microscopio fluorescente (ZEISS, filtro 516-560 nm y barrera de filtro de 590 nm) en un aumento de 40X, utilizando un sistema automatizado y el paquete CASP versión 2.1.1, para medir todos los parámetros del ensayo del cometa.

Aberraciones cromosómicas

Las muestras de sangre periférica (0.25 ml) obtenida con heparina, fueron cultivadas con medio RPMI-1640 al 10% y 0.05 ml de fitohemaglutinina (PHA), e incubadas en la oscuridad por 72 h a 37°C y las metafases fueron bloqueadas durante las 2 últimas horas con colchicina 0.001% (0,25 ul). Las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en una solución hipotónica precalentada a 37°C (0.075 M KCl) por 15 min y fijadas en ácido acético (1:3, v/v) por tres veces. Las placas de vidrio fueron secadas al aire y teñidas con Giemsa al 2 % por 5 min. en buffer Sørensen pH 6.8. Las placas de cada cultivo fueron randomizadas y evaluadas a simple ciego, observando 100 metafases/individuo⁽²⁹⁻³¹⁾.

RESULTADOS

Los resultados fueron reportados en base a un

análisis descriptivo y analítico utilizando el paquete estadístico Epi info 2002, con la creación de una base de datos.

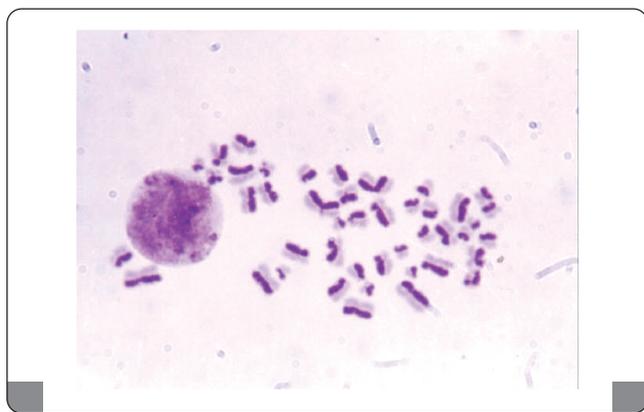
Se analizaron 259 muestras de sangre de trabajadores agrícolas de Caranavi (40,6%, Guanay 8,2 %, Mecapaca 9,4% y Palca 33,5% y otros (8,2%). El 30% fueron del sexo femenino y el 70% del sexo masculino; el 27,8% tienen hábito tabáquico; el 52,7 % consume bebidas alcohólicas y solo el 31,5% ha sido sometido alguna vez a rayos X. El 50,6 % mastica hojas de coca y el 38,7% consume mate de coca.

El 68,8% utilizan mezclas de plaguicidas que son preparados por los mismos agricultores. El 49,2% utiliza organofosforados, el 9,8 % fungicidas, 8,8 % piretrinas o piretroides, 6,2% acaricidas y el 26% otros plaguicidas no identificados.

En el cuadro No. 1 se presenta el resumen de los promedios ± ES (error Standard) y límites inferior y superior en casos y controles determinados a través de las pruebas de genotoxicidad: Frecuencia de Intercambios entre cromátides hermanas (ICH/metafase/individuo) Fig. 1, Índice de proliferación celular (PRI), % de alta frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas (%HFC), micronúcleos en 1000 células binucleadas (MN/1000BN), Fig. 2, índice de división nuclear (IDN) y parámetros de la prueba de cometa: DNA cola, DNA cabeza, longitud de la cola, longitud del cometa, Momento de la cola, Momento Olive.

Las pruebas de genotoxicidad, (cuadro No. 1), revelaron que los casos presentaron un significativo aumento ($p < 0.05$) en el promedio de los parámetros citogenéticos, en relación a los controles, excepto en PRI y IDN.

Figura N° 1.
Intercambios entre cromátides hermanas



fuelle: elaboración propia

Figura N° 2
Micronúcleo en célula binucleada



fuelle: elaboración propia

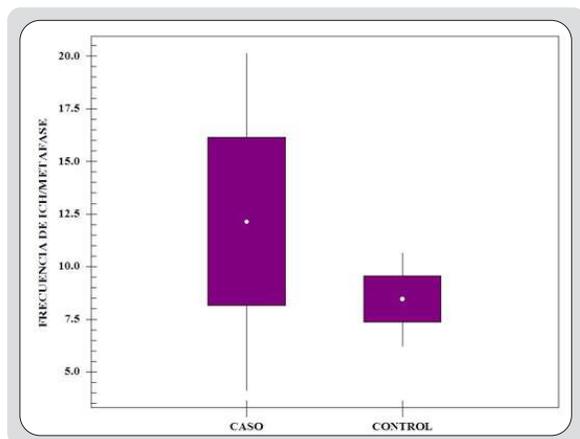
CUADRO N° 1
VALORES PROMEDIO (\pm ES) DE LOS PARÁMETROS CITOGENÉTICOS
EN CASOS Y CONTROLES

PARAMETRO	Casos (n = 131)		Controles (n = 77)		TOTAL (n = 259)		valor mínimo	valor máximo
	\bar{X}	ES	\bar{X}	ES	\bar{X}	ES		
N° ICH/met. (*)	12,36	\pm 0,49	8,43	\pm 0,18	10,82	\pm 0,31	6,45	26,06
PRI	2,28	\pm 0,03	2,36	\pm 0,05	2,28	\pm 0,03	1,37	3,13
% HFC (*)	60,2	\pm 3,54	21,5	\pm 2,05	45,1	\pm 2,57	0	100
MN/1000BN (*)	3,86	\pm 0,34	2,15	\pm 0,21	2,89	\pm 0,20	0	12
IDN	1,90	\pm 0,03	1,92	\pm 0,03	1,86	\pm 0,02	1,01	3,88
DNA cola (*)	7,35	\pm 1,04	2,19	\pm 0,44	5,55	\pm 0,72	0,10	36
DNA cabeza	15,97	\pm 1,27	11,75	\pm 1,80	14,46	\pm 1,03	0,68	34,20
Long. cola (*)	215	\pm 19,14	114	\pm 14,74	181	\pm 13,11	11	544
Long. cometa (*)	480	\pm 27,17	340	\pm 31,18	428	\pm 20,11	129	837
Momento cola (*)	79,25	\pm 11,04	21,77	\pm 0,28	58,81	\pm 6,97	2	306
Momento Olive (*)	55,45	\pm 7,38	17,50	\pm 2,71	41,43	\pm 4,66	2	209

(*) $p < 0.05$ comparación estadísticamente significativa (casos vs. control)

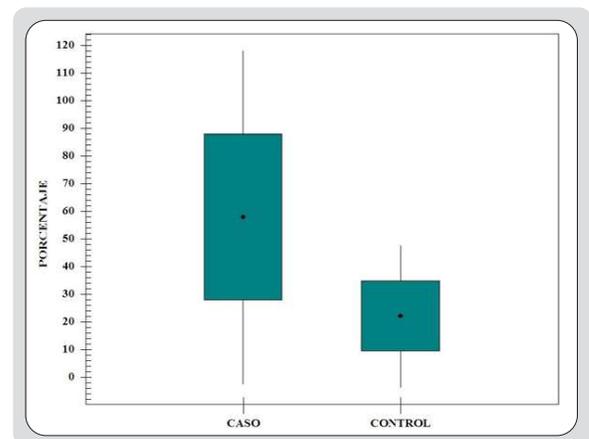
En las figuras 3-5, se observan los promedios y error standard de la frecuencia de ICH, % HFC y frecuencia de MNBN en casos y controles.

Figura N° 3.
INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDOS HERMANAS



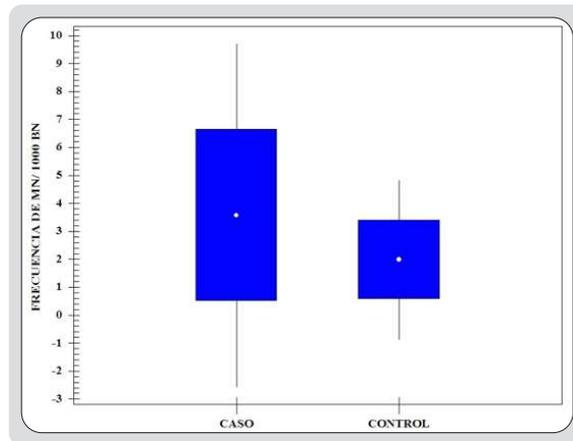
(Fuente: elaboración propia)

Figura N° 4
CÉLULAS CON ALTA FRECUENCIA DE ICH



(Fuente: elaboración propia)

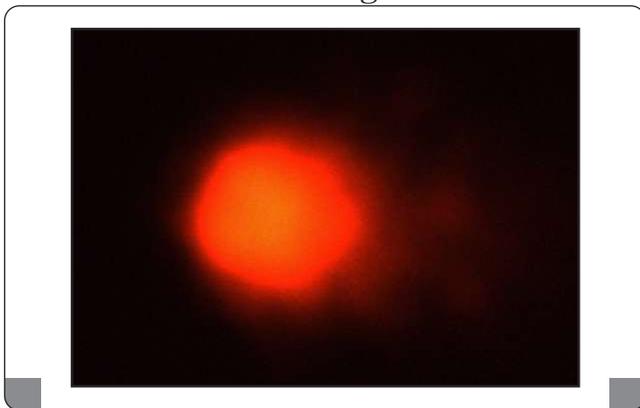
Figura N° 5
MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BINUCLEADAS



(Fuente: elaboración propia)

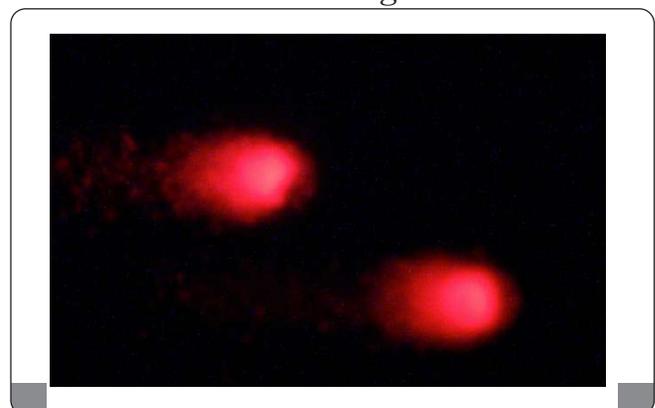
Con respecto a la prueba del cometa, en las Figuras N° 6 y 7 se muestra una célula sin y con daño genotóxico respectivamente.

Figura N° 6
Célula sin daño genotóxico



fuate: elaboración propia

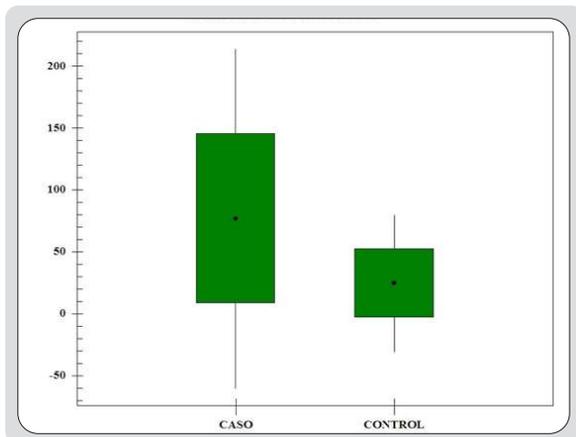
Figura N° 7
Células con daño genotóxico



fuate: elaboración propia

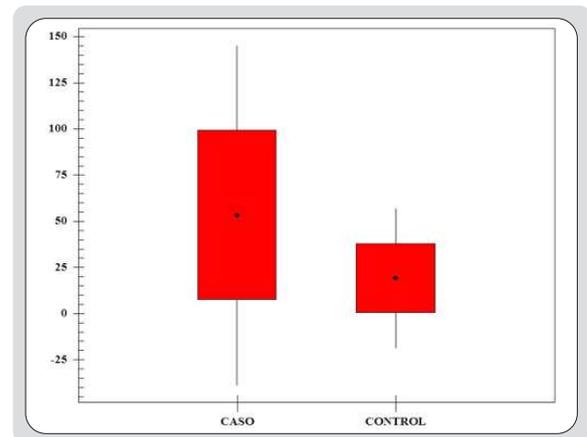
Los parámetros del cometa en los casos, mostraron un aumento significativo en relación a los controles. (Figuras N° 8-9).

Figura N° 8
MOMENTO DE LA COLA



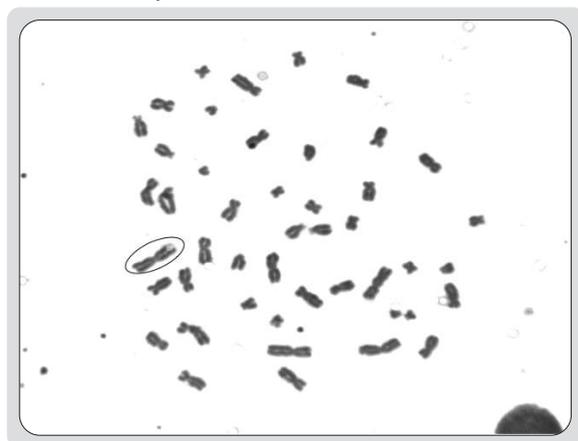
(Fuente: elaboración propia)

Figura N° 9
MOMENTO OLIVE



(Fuente: elaboración propia)

Figura N° 10
Quiebra cromatídica



(Fuente: elaboración propia)

En el Cuadro N° 2 se observa la frecuencia de aberraciones cromosómicas y cromatídicas (AC) en casos y controles: quiebras cromosómicas (csb), quiebras cromatídicas (ctb) (Fig. N° 10), gaps cromosómicos (csg), gaps cromatídicos (ctg), doble minuto (Dm). Los casos presentaron valores significativamente más elevados en relación a los controles.

CUADRO N° 2
FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS Y CROMATÍDICAS

GRUPO	<i>csb</i> (*)	<i>ctb</i> (*)	<i>csg</i> (*)	<i>ctg</i> (*)	<i>Dm</i> (*)	Total (*)
CASOS	2,56 ± 0,32	2,42 ± 0,34	0,81 ± 0,13	1,02 ± 0,15	0,07 ± 0,04	6,90 ± 0,79
CONTROLES	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0	0,06 ± 0,05	0	0,16 ± 0,07

(*) $p < 0.05$ comparación estadísticamente significativa entre casos y controles

El análisis divariado para el cálculo de la magnitud de asociación entre exposición a plaguicidas y daño genotóxico y Odd ratio (Cuadro N° 3), muestra que los trabajadores agrícolas expuestos

a plaguicidas tienen 1.49 veces más probabilidad de sufrir daño genotóxico con un OR de 2.49 (IC 95% (1.48 - 4.20), que los no expuestos.

CUADRO N° 3
MAGNITUD DE ASOCIACIÓN ENTRE DAÑO GENOTÓXICO Y EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS

	EXPUESTOS (*)	NO EXPUESTOS	TOTAL
CASOS	110 (68,8 %)	45	155
CONTROLES	50 (31,2%)	51	101
TOTAL	160 (100 %)	96	256

(*) proporción de expuestos Odds ratio: 2.49 (IC: 1.48 - 4.20)

La magnitud de asociación entre el uso de plaguicidas y otros factores de riesgo o confundentes se muestran en el Cuadro N° 4. Los factores evaluados como la edad, sexo, hábito

tabáquico, acullico de coca, no fueron factores de riesgo. La ocupación es un factor de riesgo significativo, ser agricultor aumenta 1,63 veces la probabilidad de daño genotóxico.

CUADRO N° 4
MAGNITUD DE ASOCIACIÓN ENTRE USO DE PLAGUICIDAS Y OTROS FACTORES DE RIESGO

Factor	CASOS	CONTROLES	OR	IC 95%
EDAD				
> 40	60	51	1,16	0,61 - 2,19
< 40	34	25		
MASTICAN COCA				
Si	48	36	1,10	0,59 - 2,02
No	45	37		
CONSUMO DE ALCOHOL				
Si	50	39	1,05	0,57 - 1,93
No	44	36		
TABACO				
Fumador	27	20	1,11	0,56 - 2,19
No fumador	67	55		
RADIOGRAFÍA CON RAYOS X				
Si	27	26	0,77	0,40 - 1,48
No	66	49		
SEXO				
Femenino	28	23	0,98	0,50 - 1,89
Masculino	66	53		
OCUPACIÓN				
Trabajadores agrícolas	71	41	2,63	1,37 - 5,06
Trabajadores no agrícolas	23	35		
POBLACIÓN				
Yungas	40	43	0,57	0,31 - 1,05
Altiplano	54	33		

El Cuadro N° 5 muestra los valores promedio (\pm ES) de 11 parámetros analizados en los individuos expuestos, no expuestos y RPP's. Existe una disminución de daño genotóxico en los RPP's en

relación a los expuestos y no expuestos, en el N° de ICH, %HFC, MNBN y valores intermedios en longitud de la cola, longitud del cometa, momento de la cola y momento Olive.

CUADRO N° 5
VALORES PROMEDIO (\pm ES) DE PARÁMETROS CITOGÉNÉTICOS EN EXPUESTOS, RPP's y NO EXPUESTOS

VARIABLE	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS	RPP's
N° ICH/metafase	11,31 \pm 0,44	10,43 \pm 0,80	9,91 \pm 0,43
PRI	2,28 \pm 0,03	2,25 \pm 0,06	2,18 \pm 0,06
% HFC	49,58 \pm 3,57	42,15 \pm 5,67	36,16 \pm 4,40
MN/1000BN	4,03 \pm 0,57	2,69 \pm 0,21	2,29 \pm 0,41
IDN	1,85 \pm 0,03	1,85 \pm 0,05	1,70 \pm 0,04
DNA cola	5,88 \pm 0,57	5,04 \pm 1,07	5,55 \pm 0,72
DNA cabeza	14,52 \pm 0,89	14,05 \pm 1,35	14,46 \pm 1,03

CUADRO N° 5
VALORES PROMEDIO (\pm ES) DE PARÁMETROS CITOGENÉTICOS EN EXPUESTOS,
RPP's y NO EXPUESTOS

VARIABLE	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS	RPP's
Longitud cola	204 \pm 11,19	140,98 \pm 16,16	181 \pm 13,11
Longitud cometa	449,60 \pm 17,43	376,89 \pm 26,5	428 \pm 20,11
Momento cola	67,23 \pm 5,97	44,94 \pm 8,83	58,81 \pm 6,97
Momento Olive	44,53 \pm 3,55	35,86 \pm 7,08	41,43 \pm 4,66

MNBN: $p < 0.01$ no expuestos vs. RPP ; $p < 0.04$ expuestos vs. RPP; ICH y %HFC: $p < 0.002$ expuestos vs. RPP
Longitud cola, longitud cometa, momento cola, momento Olive : $p < 0.001$ expuestos vs. no expuestos

La frecuencia de AC en expuestos y no expuestos a plaguicidas, se observa en el cuadro N° 6, habiendo un aumento significativo, en los expuestos en relación a los no expuestos ($p <$

0,001), excepto en Dm. Los RPP's mostraron valores menores pero no significativos de AC en relación a los expuestos.

CUADRO N° 6
FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN EXPUESTOS, RPP's Y NO EXPUESTOS A PLAGUICIDAS

GRUPO	Csb (*)	ctb (*)	csg (*)	ctg (*)	Dm (ns)	Total (*)
EXPUESTOS	2,23 \pm 0,30	2,12 \pm 0,32	0,71 \pm 0,12	0,92 \pm 0,14	0,06 \pm 0,04	6,10 \pm 0,76
NO EXPUESTOS	0,34 \pm 0,16	0,32 \pm 0,13	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,07	0,02 \pm 0,02	0,91 \pm 0,33
RPP's	2,00 \pm 0,57	2,21 \pm 0,67	0,29 \pm 0,62	1,08 \pm 0,39	0	6,00 \pm 1,41

$p < 0,05$ expuestos y RPP's vs. no expuestos

DISCUSIÓN

El valor promedio de ICH y MNBN y la frecuencia de AC, como pruebas de detección de daño crónico, fueron significativamente más elevados en los casos en relación a los controles, este resultado concuerda con la mayoría de los reportes, aunque hay estudios contradictorios, debido a que depende del tipo de plaguicidas utilizado, del tiempo de exposición y otros factores genéticos y epigenéticos. Los trabajadores agrícolas en nuestro estudio estuvieron expuestos a plaguicidas por lo menos 5 años de forma permanente y utilizaron mezclas de plaguicidas que en muchos casos no son bien identificados.

En cuanto a los parámetros de la prueba del cometa que mide el daño individual y exposición reciente, los casos presentaron valores significativamente elevados en relación a los controles.

Los valores promedio de ICH, MNBN, % HFC fueron significativamente más elevados en los expuestos y no expuestos en relación a los RPP's. En los RPP's se observó una tendencia a la disminución del daño genotóxico por el ensayo del cometa relacionado con su capacitación en medidas de protección.

Los sujetos expuestos tuvieron un número aumentado de AC en relación a los no expuestos

a plaguicidas. Estos hallazgos concuerdan con los estudios realizados por otros autores (Antonicci, 2000; Garaj-Vrhovac, 2002; Márquez, 2003; Vigreux, 1998; Bonassi, 2004) y son indicativos, referencias de la necesidad de realizar biomonitoreo permanente de los agricultores ocupacionalmente expuestos a varias mezclas de plaguicidas, utilizando una batería de pruebas de genotoxicidad y delinear estrategias generales para minimizar o prevenir la exposición posterior. Los RPP's presentaron valores de AC menores pero no significativos en relación a los expuestos.

En el grupo de RPP's se observó daño genotóxico en menor proporción pero no significativo en relación a los expuestos. Estos resultados sugieren que la capacitación llevado a cabo por el Programa de Plaguicidas Bolivia (PLAGBOL), en el Instituto Nacional de Salud Ocupacional, sobre el manejo de los plaguicidas, medidas de protección personal y uso adecuado de los mismos, han disminuido la exposición y han permitido que los sistemas de detoxificación enzimática y reparación del ADN sean eficientes y las mutaciones ocasionadas por los plaguicidas sean reversibles.

De los datos presentados aquí, se puede concluir que la exposición a mezclas de plaguicidas causó riesgo genotóxico. En los sujetos expuestos a plaguicidas y sin protección personal, se observó una elevada frecuencia de intercambios entre

cromátides hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y parámetros del cometa, por lo tanto, aumento de la probabilidad de que los trabajadores agrícolas expuestos a estos agentes tengan daño genotóxico, así mismo, la presencia de aberraciones cromosómicas, que son las que determinan la asociación con efecto carcinogénico, muestra que los individuos expuestos a plaguicidas tienen mayor probabilidad de que las mutaciones encontradas al momento del estudio, puedan volverse irreversibles por la saturación de los sistemas de reparación del ADN y en el futuro desarrollar diversos tipos de cáncer.

Agradecimientos.- Este trabajo fue realizado con la cooperación de Dialogos - DANIDA - Care -Bolivia a través del Proyecto PLAGBOL-INSO. Los autores desean agradecer en forma especial a los trabajadores agrícolas que participaron voluntariamente en el presente estudio, al Dr. Luís Miguel Romero y Dra. Natalia Bailón del Centro de Biología Celular y Molecular. Universidad Técnica Particular. Loja Ecuador. Finalmente queremos agradecer a todo el personal del Instituto de Genética que de una y otra manera han colaborado en la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

1. Antonicci GA, de Syllos Colus IM. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratogenesis, Carcinogenesis & Mutagenesis* 2000; 20: 265-272.
2. Au WW, Sierra-Torrez CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Lagator MS. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspec* 1999; 107: 501-505
3. Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mut Res* 2003; 543: 251-272.
4. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J.Appl Toxicol* 2002; 22: 249-255
5. Paramjit G, Danadevi K, Mahbood M, Rozati R, Band BS, Rahman MF. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(2): 201-205
6. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulka-Wasilewskab A, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides *Mutation Research* 2001; 495: 147-156
7. Paz y Mino C, Bustamante G, Sánchez ME, León PE. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1077-1080
8. Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberd H, Mikoczy Z. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health* 2204 (1): 43-47
9. Holsapple MP. Autoimmunity by pesticides: a critical review of the state of the science. *Toxicol Lett* 2002; 127: 101-109.
10. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalpra L, De Ferrari M et al., Age related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1997; 6: 249-256.
11. Ramirez V, Cuenca P. DNA damage in female workers exposed to pesticides in banana plantations al Limon, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 2002; 50: 507-518
12. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on chemical safety. Mutat Res* 2000; 468(2): 111-172
13. Poli P, de Mello M, Buschini A, de Castro V, Restivo F, Rossi C, Zucchi T. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 2003; 540: 57-66
14. Márquez ME, López JB, Londoño M, et.al. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *IATREIA* 2003; 16 (4): 275-282
15. Gabbianelli R, Nasuti C, Falcioni G, Cantalamessa F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology* 2004; 203: 17-26
16. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 2001; 165: 153-162
17. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspectiva. *Cytogenetic and Genome Research* 2004; 104:376-382.
18. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research* 2000; 469: 279-285
19. Vigreux C, Poul J, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay_comet assay/and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research* 1998; 419: 79-90

20. Pastor BS. 2002 Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos Universidad Autónoma de Barcelona. Fac. de Ciencias. Depto. de Genética y Microbiología. Grupo Mutagénesis. Tesis Doctoral/ Disponible en: <http://www.tdx.cesca.es>
21. P. Perry, S. Wolff, New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature* 1974; 251: 156-158.
22. Carrano AV, Moore DH. The rationale methodology for quantifying sister-chromatid exchanges in humans Heddie J. A. *New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press New York. 1982; 99: 267-304.
23. Ascarrunz M.E., Olivares J., Taboada G., Romero L. M. Evaluación del potencial genotóxico de 4 extractos vegetales de la medicina tradicional boliviana: *Chaetothylax boliviensis*, *Guetarda acreana*, *Heliocarpus americanus* y *Solanum americanum*/. *BIOFARBO* 1999 ; 7(7) : 57-66
24. Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Changc W, Holland N. *Mutation Research* 2003; 534: 45-64.
25. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mut. Res* 1985; 247:29-36
26. Tirado B.N., Carvajal S. R., Romero F. L. M., Efectos genotóxicos y antigenotóxicos de la savia de *Croton Draconoides*. 2000; *BIOFARBO* 8(8): 71-76.
27. Tirado N, Navia M.P, Cuti M. Pesquisa de daño genotóxico en personal médico y paramédico del Hospital Obrero N° 1. *Cuadernos del Hospital de Clínicas* 2002; 47 (2): 33-40.
28. Tice R, Vasquez M. Protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Research Triangle Park, 1998.
29. Singh NP, Mccoy MT, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175:184-191
30. Savage J, Mechanism of Chromosome aberrations, *Mutation and Environmental* 1990; 385-396.
31. International Atomic Energy Agency IAEA. Biological dosimetry: chromosome aberration analysis for dose assessment, In: *Technical Reports Series No. 260*, 1986: 59-63.