



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Exposición ocupacional a los Agroquímicos.  
Evaluación del Daño Genético y su relación  
con procesos de Estrés Oxidativo.**

**Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas**

Autor de Tesis: Bioq. María Fernanda Simoniello

Director de Tesis: Prof. Dra. Marta Ana Carballo

Co-Director de Tesis: Prof. Bioq. Elisa Carlotta Kleinsorge

Lugar de Trabajo: Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal.

Santa Fe, Argentina, 2011.

## **ÍNDICE**

Resumen .....	18
Abstract .....	19
CAPÍTULO 1. Introducción y Objetivos .....	20
Introducción .....	21
1.1.1. La provincia de Santa Fe .....	21
1.1.2. Cambios agrícolas y técnicos .....	24
1.1.2.1. Sistemas productivos intensivos .....	25
1.1.2.2. Sistemas productivos extensivos .....	28
1.1.3. Exposición a plaguicidas: condiciones socio-ambientales .....	35
1.1.3.1. Acceso a la población .....	36
1.1.3.2. Características del trabajo rural .....	38
1.1.3.3. El ambiente doméstico: aspectos físicos y sociales .....	39
1.1.3.3.1. Trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos .....	39
1.1.3.3.2. Aplicadores de pesticidas en cultivos extensivos .....	42
1.1.3.4. Consideraciones finales .....	42
1.1.4. Plaguicidas: conceptos generales .....	43
1.1.4.1. Insecticidas .....	44
1.1.4.1.1. Insecticidas Organoclorados .....	45
1.1.4.1.2. Insecticidas Organofosforados .....	45
1.1.4.1.3. Insecticidas Carbámicos .....	47
1.1.4.1.4. Nuevos Insecticidas Químicos .....	47
1.1.4.2. Fungicidas .....	49
1.1.4.3. Herbicidas .....	51
1.1.4.3.1. Herbicidas clorfenoxi .....	52
1.1.4.3.2. Herbicidas Bipiridilos o Bipiridilicos.....	53
1.1.4.3.3. Triazinas .....	53
1.1.4.3.4. Glifosato .....	54
1.1.5. La problemática de las mezclas de plaguicidas.....	55
1.1.6. Biomonitoreos y Biomarcadores.....	59
1.1.6.1. Biomarcadores sustitutos de exposición a organofosforados y	

metilcarbamatos.....	62
1.1.6.1.1. Actividad de la enzima Butirilcolinesterasa .....	62
1.1.6.1.2. Actividad de la enzima Acetilcolinesterasa .....	63
1.1.6.2. Biomarcadores del Estado oxidativo.....	64
1.1.6.2.1. Sistemas de defensas Antioxidantes .....	66
1.1.6.2.1.1. Defensas Antioxidantes Enzimáticas: Actividad de Catalasa .....	66
1.1.6.2.1.2. Defensas Antioxidantes No-Enzimáticas: Glutation .....	67
1.1.6.2.2. Peroxidación de Lípidos: Medición de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico .....	68
1.1.6.3. Biomarcadores de Daño Genotóxico.....	68
1.1.6.3.1. Ensayo Cometa .....	70
1.1.6.3.2. Ensayo de Reparación.....	72
1.1.6.3.3. Ensayo Cometa modificado por el agregado de la enzima Formamido Pirimidina Glicosilasa .....	73
1.1.6.3.4. Micronúcleos en Mucosa Bucal .....	74
1.2 .Objetivos del Trabajo de Tesis .....	77
1.2.1. Objetivos Generales .....	77
1.2.2. Objetivos Específicos.....	77
CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos .....	79
2.1. Selección de la población .....	80
2.1.1. Cuestionario .....	80
2.1.2. Consentimiento Informado .....	81
2.2. Obtención de las muestras .....	82
2.3. Metodologías .....	83
2.3.1. Biomarcadores sustitutos de exposición a organofosforados y metilcarbamatos .	83
2.3.1.1. Determinación de la Actividad de Butirilcolinesterasa .....	83
2.3.1.2. Determinación de la Actividad de Acetilcolinesterasa.....	83
2.3.2. Biomarcadores del Estado Oxidativo.....	84
2.3.2.1. Determinación de la Actividad de Catalasa .....	84
2.3.2.2. Determinación de la relación GSH/GSSG .....	86
2.3.2.3. Determinación de Sustancias Reactivas con el Acido Tiobarbitúrico como medida de peroxidación lipídica.....	88

2.3.3. Biomarcadores de Daño Genotóxico .....	89
2.3.3.1. Ensayo de Viabilidad.....	89
2.3.3.2. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa.....	90
2.3.3.3. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo de Reparación .....	93
2.3.3.4. Ensayo Cometa modificado para la detección de bases oxidadas con el uso de endonucleasas de reparación bacterianas: Sitios FPG.....	95
2.3.3.5. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal .....	97
2.4. Métodos Estadísticos .....	98
CAPÍTULO 3. Cultivos Intensivos .....	100
3.1 Antecedentes.....	101
3.2 Objetivos específicos del Capítulo .....	103
3.3 Materiales y Métodos.....	103
3.3.1. Biomarcadores utilizados en la población de cultivos intensivos.....	103
3.3.2. Área productiva.....	104
3.3.3. Población de trabajadores de cultivos intensivos.....	104
3.4. Resultados del Capítulo .....	105
3.4.1. Descripción socio-demográfica y hábitos de expuestos y controles.....	105
3.4.2. Análisis de datos laborales de los trabajadores rurales y aplicadores.....	107
3.4.3. Exploración estadística de los resultados de cada biomarcador.....	111
3.4.3.1. Estadística descriptiva de enzimas Colinesterasas .....	111
3.4.3.1.1. Actividad de Butirilcolinesterasa plasmática de los trabajadores.....	111
3.4.3.1.2. Actividad de Acetilcolinesterasa eritrocitaria de los trabajadores.....	112
3.4.3.2. Estadística descriptiva de los marcadores del Estado oxidativo .....	113
3.4.3.2.1. Actividad de Catalasa en los eritrocitos de los trabajadores.....	113
3.4.3.2.2. Medición de lípido peroxidación mediante TBARS en eritrocitos de los trabajadores rurales y aplicadores .....	114
3.4.3.3. Estadística descriptiva de los marcadores de Genotoxicidad.....	114
3.4.3.3.1. Ensayo Cometa en linfocitos de sangre periférica de los trabajadores	114
3.4.3.3.2. Ensayo de reparación en linfocitos de sangre periférica	

de los trabajadores .....	115
3.4.4. Estadística bivariada aplicada a los biomarcadores en controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos .....	116
3.4.5. Análisis de la influencia de los factores de confusión sobre los biomarcadores	118
3.4.6. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre los biomarcadores .....	121
3.4.7. Evaluación de correlaciones entre las variables cuantitativas.....	122
3.4.8. Estadística Multivariada aplicada a las variables cualitativas y cuantitativas ....	123
3.4.9. Odds Ratio para los biomarcadores considerando los distintos factores de riesgo.....	126
3.5. Discusión de los resultados del Capítulo .....	127
CAPÍTULO 4. Cultivos extensivos .....	140
4.1. Antecedentes .....	141
4.2. Objetivos específicos del Capítulo .....	142
4.3. Materiales y Métodos.....	143
4.3.1. Biomarcadores utilizados en la población de cultivos extensivos .....	143
4.3.2. Área productiva.....	144
4.3.3. Población de aplicadores de cultivos extensivos .....	144
4.4. Resultados del Capítulo .....	145
4.4.1. Descripción socio-demográfica y hábitos de expuestos y controles.....	146
4.4.2. Análisis de datos laborales de los aplicadores de cultivos extensivos .....	148
4.4.3. Exploración estadística de los resultados de cada biomarcador.....	150
4.4.3.1. Estadística descriptiva de enzimas Colinesterasas .....	150
4.4.3.1.1. Actividad de Butirilcolinesterasa plasmática de los aplicadores .....	150
4.4.3.1.2. Actividad de Acetilcolinesterasa eritrocitaria de los aplicadores .....	151
4.4.3.2. Estadística descriptiva de los marcadores del Estado oxidativo .....	151
4.4.3.2.1. Actividad de Catalasa en los eritrocitos de los aplicadores .....	151
4.4.3.2.2. Medición de la relación GSH/GSSG en los eritrocitos de los aplicadores.....	151
4.4.3.2.3. Medición de la peroxidación de lípidos mediante TBARS en los eritrocitos de aplicadores.....	152
4.4.3.3. Estadística descriptiva de los marcadores de Genotoxicidad.....	152

4.4.3.3.1. Ensayo Cometa en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores .	152
4.4.3.3.2. Ensayo de reparación en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores.....	153
4.4.3.3.3. Determinación de Sitios FPG en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores.....	153
4.4.3.3.4. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en mucosa bucal de los aplicadores.....	153
4.4.4. Estadística bivariada aplicada a los biomarcadores en controles y aplicadores de cultivos extensivos .....	153
4.4.5. Análisis de la influencia de los factores de confusión sobre los biomarcadores	155
4.4.6. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre los biomarcadores.....	158
4.4.7. Evaluación de correlaciones entre las variables cuantitativas.....	161
4.4.8. Estadística Multivariada aplicada a las variables cualitativas y cuantitativas ....	162
4.4.9. Odds Ratio para los biomarcadores considerando los distintos factores de riesgo .....	165
4.5. Discusión de los resultados del Capítulo .....	167
CAPÍTULO 5. Discusión y consideraciones finales .....	182
5. 1. Discusión general y consideraciones finales .....	183
5.2. Perspectivas Futuras .....	186
5.3. Conclusiones.....	188
CAPÍTULO 6. Bibliografía .....	189
ANEXO I .....	228
Encuesta trabajadores rurales y aplicadores cultivos intensivos .....	229
Encuesta aplicadores cultivos extensivos .....	230
ANEXO II .....	231
Formulario de Consentimiento informado.....	232

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Datos comparativos para los períodos 2008-09 y 2009-2010 de los principales cultivos de la Argentina (Fuente: Bolsa de Cereales.....	33
Tabla 1.2. Costos por ha de los distintos cultivos. (Fuente: INTA EEA Pergamino, 2010)....	35
Tabla 2.1. Técnica operatoria para la determinación de GSSG+GSH y GSH .....	86
Tabla 3. 1. Categorización de los trabajadores y controles en función de los hábitos de fumar y consumir alcohol (n y %) y comparación estadística entre ambas poblaciones .....	107
Tabla 3. 2. Muestra los plaguicidas que utilizaron los aplicadores clasificados por su mecanismo de acción.....	110
Tabla 3. 3. Mezclas de plaguicidas utilizadas considerando la localidad de la explotación y el número de trabajadores .....	111
Tabla 3. 4. Valores promedio y desvío estándar de las actividades de Colinesterasas en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.....	116
Tabla 3. 5. Valores promedio y desvío estándar de los marcadores del Estado oxidativo en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.....	117
Tabla 3.6. Valores promedio y desvío estándar de los marcadores de Genotoxicidad en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.....	117
Tabla 3.7. BChE, AChE, IDEC, IDER, CAT y TBARS en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión .....	118
Tabla 3.8. BChE, AChE, IDEC, IDER, CAT y TBARS en los trabajadores rurales estratificados por factores de confusión .....	120
Tabla 3.9. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre BChE, AChE, CAT, TBARS, IDEC e IDER .....	121
Tabla 3.10. Análisis de correlaciones de Spearman de los diferentes biomarcadores en el grupo de trabajadores y controles .....	122
Tabla 3.11. Matriz de similaridad considerando las variables cualitativas y las cuantitativas dicotomizadas .....	124
Tabla 3.12. Análisis de las tablas de contingencia simples (2x2) para obtener el Odds Ratio (OR) con un Intervalo de Confianza (IC) del 95% .....	126
Tabla 4.1. Categorización de los controles y de los aplicadores de cultivos extensivos en función de los hábitos de fumar y consumir alcohol (n y %) y comparación estadística entre ambas poblaciones .....	146
Tabla 4. 2. Plaguicidas utilizados por los aplicadores clasificados por su mecanismo	

de acción .....	149
Tabla 4. 3. Mezclas de plaguicidas utilizadas considerando la localidad de la explotación y el número de trabajadores .....	150
Tabla 4. 4. Valores promedio y desvío estándar de las actividades de Colinesterasas en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.....	154
Tabla 4. 5. Valores promedio y desvío estándar de los marcadores del Estado oxidativo en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.....	154
Tabla 4.6. Valores promedio y desvío estándar de los marcadores de Genotoxicidad en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.....	155
Tabla 4.7. BChE, AChE, CAT, GSH/GSSG y TBARS en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión .....	156
Tabla 4.8. IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión .....	157
Tabla 4.9. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre BChE, AChE, CAT, TBARS, GSH/GSSG, IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB .....	159
Tabla 4.10. Análisis de correlaciones de Spearman de los diferentes biomarcadores en el grupo de aplicadores y controles .....	162
Tabla 4.11. Matriz de similaridad considerando las variables cualitativas y las cuantitativas dicotomizadas .....	163
Tabla 4.12. Análisis de las tablas de contingencia simples (2x2) para obtener el Odds Ratio (OR) con un Intervalo de Confianza (IC) del 95% .....	166



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Primeros colonos santafesinos (Fuente: bibliotecaesperanza.gov.ar) .....	21
Figura 1.2. Ubicación geográfica de la provincia de Santa Fe (Fuente: Ministerio de la Producción, Santa Fe).....	22
Figura 1.3. División política de la provincia de Santa Fe (Fuente: Mapas de Argentina) .....	23
Figura 1.4. Porcentaje de los principales cultivos hortícolas (Fuente: Rodríguez y Lenardón, 2007) .....	27
Figura 1.5. Porcentaje de los plaguicidas utilizados en los cultivos hortícolas (Fuente: Rodríguez y Lenardón, 2007).....	28
Figura 1.6. Índice de producción para los principales cultivos en Argentina 1961-2007 (Fuente: Lence, 2010).....	29
Figura 1.7. Tasas de Importación de fertilizantes, pesticidas y máquinas agrícolas, 1961-2007 (Fuente: Lence, 2010) .....	31
Figura 1.8. Zonificación agroeconómica de la provincia de Santa Fe (Fuente: Giorgi y col., 2008) .....	32
Figura 1.9. Fotos de una “Posta Sanitaria” cercana a una comunidad aborigen del área rural..	37
Figura 1.10. Fotos del Servicio de Atención Médica a la Comunidad (SAMCO) de la localidad Providencia, zona de cultivos extensivos.....	37
Figura 1.11. Fotos de envases de agroquímicos en la cercanía de hogares rurales .....	39
Figura 1.12. Trabajadores rurales y sus hijos en una quinta santafesina.....	41
Figura 1.13. Estructura química de los Organofosforados .....	45
Figura 1.14 Productos del daño de los radicales libres (Fuente: De Zwart y col, 1999).....	65
Figura 1.15. Célula sometida al Ensayo Cometa (Fuente: Mudry y Carballo, 2006) .....	71
Figura 1.16. Imágenes de Cometa (Fuente: Muñiz y col, 2007) .....	74
Figura 1.17. Micronúcleo en célula de mucosa bucal .....	75
Figura 2.1. Realización de la entrevista personal .....	80
Figura 2.2. Obtención de las muestras.....	82
Figura 2.3. Curva de calibrado de Peróxido de Hidrógeno a 240 nm .....	85
Figura 2.4. Curva de calibrado para la determinación de GSH.....	87
Figura 2.5. Curva de calibrado de la determinación de TBARS .....	89
Figura 2.6. Calibración del Ensayo Cometa utilizando Peróxido de Hidrógeno.....	93
Figura 2.7. Calibración de la enzima FPG .....	96

Figura 3.1. Distribución por género: a. de los controles (izquierda), b. de los trabajadores de cultivos intensivos (derecha).....	106
Figura 3.2. Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función del nivel educativo.....	106
Figura 3.3. Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función de las tareas realizadas.....	108
Figura 3.4. Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a la antigüedad laboral .....	108
Figura 3.5. Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función del uso de equipo de protección personal.....	109
Figura 3.6. Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función del conocimiento de los plaguicidas empleados.....	109
Figura 3.7. a. Distribución de los resultados obtenidos para BChE en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de BChE (derecha).....	112
Figura 3.8. a. Distribución de los resultados obtenidos para AChE en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de AChE (derecha).....	113
Figura 3.9. a. Distribución de los resultados obtenidos para la actividad de CAT en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). b. Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de CAT (derecha)....	114
Figura 3.10. a. Distribución de los resultados obtenidos para la medición de TBARS en los eritrocitos de los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). b. Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de TBARS (derecha) .....	114
Figura 3.11. a. Distribución de los resultados obtenidos para IDEC en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). b. Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de IDEC (derecha) .....	115
Figura 3.12. a. Distribución de los resultados obtenidos para IDER en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). b. Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de IDER (derecha) .....	115
Figura 3.13 Box-plots debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los marcadores BChE, AChE, IDEC y TBARS.....	122

Figura 3.14. Matriz de dispersión de las variables cualitativas y cuantitativas dicotomizadas .....	125
Figura 4.1. Distribución de los trabajadores de cultivos extensivos en función del nivel educativo .....	145
Figura 4.2. Distribución de los trabajadores de cultivos extensivos en función del uso de equipo de protección personal .....	147
Figura 4.3. Elemento de pulverización utilizado por los trabajadores de cultivos extensivos.....	147
Figura 4.4. Otras tareas realizadas por los aplicadores que involucran exposición a pesticidas .....	148
Figura 4.5. a. Distribución de los resultados obtenidos para BChE en los trabajadores de cultivos extensivos (izquierda). Distribución de los resultados obtenidos para AChE en los trabajadores de cultivos extensivos (derecha).....	150
Figura 4.6. a. Distribución de los resultados obtenidos para la actividad de CAT en los trabajadores de cultivos extensivos (izquierda). b. Distribución de los resultados obtenidos para la relación GSH/GSSG en los eritrocitos de los trabajadores de cultivos extensivos (derecha) .....	150
Figura 4.7. Distribución de los resultados obtenidos para la medición de TBARS en los eritrocitos de los trabajadores de cultivos intensivos .....	152
Figura 4.8. a. Distribución de los resultados obtenidos para IDEC en los trabajadores de cultivos extensivos (izquierda). b. Distribución de los resultados obtenidos para IDER en los trabajadores de cultivos extensivos (derecha) .....	152
Figura 4.9. a (izquierda) Distribución de los resultados obtenidos para Sitios FPG en los aplicadores de cultivos extensivos. b. Distribución de los resultados obtenidos para MNMB en los aplicadores de cultivos extensivos (derecha) .....	153
Figura 4.10 Box-plots debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los marcadores BChE, AChE, IDEC, IDER, Sitios FPG, MNMB, CAT, TBARS y la relación GSH/GSSG.....	160
Figura 4.11. Matriz de dispersión de las variables cualitativas y cuantitativas dicotomizadas .....	165

## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

ABPF: Agarosa de bajo punto de fusión

AC: Aberraciones cromosómicas

Ac: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

AMPA: ácido aminometilfosfónico

AP: Sitio a-purínico

APFN: Agarosa de punto fusión normal

ART: Aseguradoras de Riesgo de Trabajo

AZM: Metil-azinfos

BChE: Butirilcolinesterasa

BHT: Butilhidroxitolueno

CAT: Catalasa

CHO: Células de Ovario de Hámster chino

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTC: Ditiocarbamatos

DTNB: Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico)

EC: Ensayo Cometa

EPP: Equipo de Protección Personal

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FAO: Food and Agriculture Organization

FPG: Formamido Pirimidina Glicosilasa

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutation Reductasa

GSH: Glutación reducido o gamma-glutamylcisteinilglicina

GSSG: Glutation oxidado

GST: Glutation S-Transferasa

HCB: Hexacloro ciclo benceno

HCH: Hexacloro ciclo hexano

Hb: Hemoglobina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HFRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

IARC: Agencia Internacional de investigación de cáncer (International Agency for Research on Cancer)

IC: Intervalo de Confianza

ICH: Intercambio de Cromátidas Hermanas

IDEC: Índice de Daño Ensayo Cometa

IDER: Índice de Daño Ensayo de Reparación

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IUPAC: Unión Internacional de Química pura y aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

K-S: Kolmogorov-Smirnov

K-W: Kruskal-Wallis

MDA: Malondialdehído

MeC: Metilcarbamatos

MN: Micronúcleos

MNMB: Micronúcleos en mucosa bucal

NOAEC: concentración sin efectos adversos observados (No Observed Adverse Effect Concentration)

NOEC: concentración sin efectos observados (no observed effect concentration)

$\cdot\text{OH}$ : Radical hidroxilo

$\text{O}_2^{\cdot-}$ : Anion superóxido

OC: Organoclorados

OF: Organofosforados

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PBS: Buffer fosfato salino

POEA: Polioxietil amina

RL: Radicales libres

SAMCo: Servicio de Atención Médica a la Comunidad

SI.NA.V.E: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal

SFB: Suero Fetal Bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Acido Tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias Reactivas con el Acido Tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

U.S. EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)

U-Test: Mann-Whitney

**Agradecimientos:**

*A la Universidad Nacional del Litoral por otorgarme la beca de posgrado y los proyectos de investigación que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis doctoral.*

*A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por permitirme realizar mi carrera de Doctorado en esta Casa de Estudios y por haberme brindado los elementos necesarios para mi formación científica y académica desde mis inicios como estudiante.*

*A la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la financiación de los subsidios otorgados a la Prof. Dra. Marta Ana Carballo, que colaboraron con la concreción de este Trabajo de Tesis Doctoral.*

*A mi Directora de Doctorado Prof. Dra. Marta Ana Carballo, por confiar en mí, por las enseñanzas y oportunidades, por su apoyo y por brindarme la posibilidad de continuar avanzando en mi formación académica.*

*A mi Codirectora de Doctorado, Prof. Elisa Kleinsorge, por acompañarme en todo momento en este largo camino y a pesar de todo. Por toda su sabiduría, por sus consejos, por el cariño y por sus exigencias que hicieron de este trabajo un desafío y un placer.*

*A mis compañeros docentes de la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL): Mg. Jorge Scagnetti, Bioq. Raul Grigolato, Bioq. Alicia Loteste, Esp.Tox. Carlos Mastandrea, Bioq. Adriana Paonessa, Bioq. Jose Sylvestre, Méd. Sebastián Trossero, por las innumerables experiencias compartidas, por dejarme que los considere mis amigos.*

*A los integrantes del Grupo de Investigación de Citogenética Humana y Genética Toxicológica (CIGETOX) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, en especial Marcela, Erika y Natalia, por haberme dado un lugar y por compartir también lindos momentos.*

*A la Dra. Gisela Poletta por ser esa insuperable compañera de laboratorio, de viajes, de decisiones, de estudio, pero por sobre todas las cosas mi amiga.*

*A los estudiantes y algunos ya profesionales, Federico, Ana Clara, Sebastián, Caterina, Melina, Gimena y Mauro que estuvieron en muchísimos momentos, por su importantísima colaboración.*

*A Bioq. Guillermo Soltermann, Bioq. Cecilia Brissón, Bioq. Angela Pedro, Dr. Sergio Guerrero, Bioq. María G. Latorre, Bioq. Jorge Roldán, Bioq. Sandra Sánchez, Bioq. Patricia Spedaletti, Bioq. Mariela Rudolf, Bioq. Emanuel Dupouy, al personal del Hospital Protomédico, MSC. Elena T. Fernández de Carrera, Ing. Liliana Ester Contini y Lic. Stella Maris Vaira por haberme brindado su colaboración, apoyo y excelente disposición en muchas oportunidades.*

*Al Prof. Dr. Andrew R. Collins del Departamento de Nutrición, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oslo, Noruega, no solo por la donación de la enzima FPG, sino también por haberme brindado su apoyo y consejos.*

*A mis amigos, por ser parte de mi vida, por compartir muchísimos momentos.*

*A mi gigante familia, no solo por el número sino por el cariño, a cada uno, mis padres, mis hermanos, propios y prestados, mis amados sobrinos, por ser parte de esto.*

*A Graciela, mi segunda madre, que siempre me brindó su apoyo para no bajar nunca los brazos.*

*A mi familia, Marcelo, Martín y Pablo por ser lo más importante de mi vida.*



**Parte de los datos presentados en éste trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:**

“Biomonitoreo de Población Rural expuesta a Plaguicidas”. Simoniello, M. F.; Scagnetti J. A.; Mastandrea, C.; Grigolato R.; Paonessa A.; Gigena F.; Kleinsorge, E. C. (2007). Revista FABICIB, ISSN: 0329-5559. Ed. Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina). Vol 11, 73-85.

“DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides mixtures” Simoniello MF, Kleinsorge EC, Scagnetti JA, Grigolato RA, Poletta G, Carballo MA. (2008). Journal Applied Toxicology, ISSN: 0260-437X. Ed. Wiley (Chichester, Inglaterra). Vol 28(8) 957-965.

“Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population” Simoniello M. F., Kleinsorge E. C., Scagnetti J. A., Mastandrea C., Grigolato R. A., Paonessa A. M., Carballo M. A. Biomarkers. (2010). Print ISSN 1354-750X. Ed. Informa Pharmaceutical Science Journals. (London, UK). 15 (1): 52-60.

“Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas”. Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Carballo, M. A. (2010). Revista Medicina Buenos Aires. ISSN 0025-7680. Ed. Publicación de la Fundación Revista Medicina (Buenos Aires, Argentina). 70: 06- 489-498.

"Agrochemicals: horticulture. Use conditions determine genotoxic effects and oxidative damage in rural populations in Santa Fe, Argentina" Carballo, M.A; Simoniello, M.F; Kleinsorge, E.C. (2011). Chapter 17 (357-384) in: "Pesticides", ISBN 978-953-307-460-3 published by INTECH. Editorial Collegiums. Vienna, Austria. 357-384.

## **Exposición ocupacional a los Agroquímicos.**

### **Evaluación del Daño Genético y su relación con Procesos de Estrés Oxidativo.**

#### **Resumen**

Aunque el uso de plaguicidas es necesario, resulta fundamental evaluar los riesgos para la salud en los seres humanos que están profesional y/o ambientalmente expuestos a estos agroquímicos. Esta exposición puede ocurrir durante la preparación de la mezcla, en el procesamiento de carga y/o lavado de los equipos de fumigación y en el momento de su aplicación.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue utilizar un conjunto de biomarcadores para evaluar el daño inducido por la exposición de humanos a mezclas simultáneas de plaguicidas empleados en los cultivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe, con el fin de estudiar los posibles mecanismos involucrados en su toxicidad y su relación con aspectos laborales de la población en estudio.

Se evaluaron dos poblaciones de trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas: a) 105 trabajadores rurales y aplicadores del cordón hortícola del departamento La Capital (Santa Fe, Argentina) y 112 donantes como grupo control; b) 48 aplicadores de plaguicidas en cultivos extensivos que trabajan en los departamentos San Cristóbal, Las Colonias, San Javier, Garay (Santa Fe, Argentina) y 50 sujetos que conformaron el grupo control.

La valoración del daño generado por exposición directa a mezclas de pesticidas se realizó mediante el empleo de biomarcadores enzimáticos, de estrés oxidativo y de daño al ADN en sangre periférica. Los resultados mostraron alteraciones en el estado oxidativo en los trabajadores expuestos respecto a los controles, que se correlacionó con el daño al ADN. La antigüedad laboral y el uso de equipo de protección fueron factores que demostraron estar relacionados con el daño observado.

En conclusión: a) se debe recomendar a los agricultores el uso de medidas de protección durante todo tipo de manipulación de plaguicidas; b) se propone que los individuos expuestos sean monitoreados de manera frecuente para minimizar o reducir potenciales efectos dañinos de los pesticidas en el ADN; c) se debe continuar con la evaluación de los riesgos asociados con la exposición a pesticidas en la población expuesta de nuestro país.

**Palabras Claves:** Biomonitorio Humano, Plaguicidas, Genotoxicidad, Estrés Oxidativo.

## **Occupational exposure to agrochemicals.**

### **Genetic damage assessment and its relationship to oxidative stress.**

#### **Abstract**

Although the use of pesticides is necessary, it is important to assess health risks for humans that are professional and/or environmentally exposed to these chemicals. This exposure may occur during preparation of the mixture, load processing and/or washing of equipment as well as during application.

The aim of this study was to apply a set of biomarkers for the evaluation of damage induced in humans exposed simultaneously to different pesticide mixtures in North-Central region of Santa Fe province, in order to study possible toxicity mechanisms and its relationship with labor aspects of the studied population.

Two different populations of workers were evaluated: a) 105 farm workers and applicators from the horticultural cord of 'La Capital' department (Santa Fe, Argentina) and 112 donors as control group, b) 48 pesticide applicators working in extensive crops in San Cristobal, Las Colonias, San Javier and Garay departments (Santa Fe, Argentina) and 50 subjects comprising the control group.

The assessment of damage generated by direct exposure to pesticide mixtures, was carried out through oxidative stress, DNA damage and enzymatic biomarkers in peripheral blood. The results showed alterations in oxidative status which correlated with DNA damage in exposed workers. Factors such as labor length and the use of protective equipment were found to be related with the observed damage.

In conclusion: a) farmers should be advised to use protective measures during all activities that imply pesticide handling, b) individuals under exposure risk must be monitored frequently to minimize potentially harmful effects of pesticides on the DNA, c) the evaluation of population risks associated with pesticide exposure in our country should proceed.

**Keywords:** Human Biomonitoring, Pesticides, Genotoxicity, Oxidative Stress

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción y Objetivos**

## 1.1. Introducción

### 1.1.1. La provincia de Santa Fe

Las colonias agrícolas en la Argentina, debido a su contribución demográfica y económica, han sido trascendentales para la evolución del país.

Desde 1810, frente a las grandes extensiones de tierra fértil despobladas, los gobiernos estimularon la inmigración europea. Un decreto de 1812 protegía a los extranjeros y sus familias para que vinieran a trabajar y cultivar los campos entregándoles tierras en propiedad, dando comienzo de esta forma a una larga serie de disposiciones tendientes a estimular la corriente inmigratoria para despertar así las fuentes productoras del país.

La llegada de inmigrantes extranjeros, la entrega de territorios fiscales y la formación de colonias agrícolas fueron parte de la "utopía agraria" soñada por Sarmiento y Alberdi e impulsada luego de 1852. A partir de 1853, el presidente Justo José de Urquiza alentó el establecimiento de colonias agrícolas en la región Litoral de nuestro país (la zona de influencia de los ríos Paraná y Uruguay).

Esperanza, en la provincia de Santa Fe, fue la primera Colonia agrícola organizada formalmente en Argentina. Estuvo constituida por 200 familias de inmigrantes procedentes de Suiza, Alemania, Francia, Italia, Bélgica y Luxemburgo, que llegaron entre enero y febrero de 1856 a nuestro territorio. La fundación de la Colonia Esperanza daría comienzo a un proceso de notable crecimiento poblacional y económico que tendría su centro en la provincia de Santa Fe.



**Figura 1.1. Primeros colonos santafesinos (Fuente: bibliotecaesperanza.gov.ar)**

Por esos años, Urquiza habilita el puerto de Rosario sobre el río Paraná, al sur de la provincia, para su navegación marítima hacia el exterior, lo que produjo grandes cambios en la región. El

movimiento portuario generó importantes beneficios económicos que ayudaron al incremento de la expansión agrícola de Santa Fe.

Este crecimiento se encuentra directamente relacionado con el crecimiento de la red ferroviaria, el cual se extiende y se convierte en un elemento clave para la pampa húmeda. En aquellas regiones donde las condiciones del suelo eran óptimas y el acceso al transporte se veía facilitado por el acceso al ferrocarril, la agricultura crecía. Si hacemos un breve repaso de la evolución de la producción de las colonias encontramos que, en 1874 la Argentina tuvo que importar trigo, mientras que ya en 1880 las colonias agrícolas abastecieron las necesidades internas del país.

Hacia fines del siglo XIX, Argentina fue el primer país exportador de trigo del mundo. Entre 1888 y 1895 la superficie cultivada aumentó de 2,5 millones a casi 5 millones de hectáreas. La expansión más notable se produjo en la provincia de Santa Fe. A finales del siglo XIX y durante las dos primeras décadas del siglo XX, una nueva ola de expansión de la agricultura se produjo en tierras que antes habían sido total o parcialmente dedicadas a la ganadería (Conde, 1986).

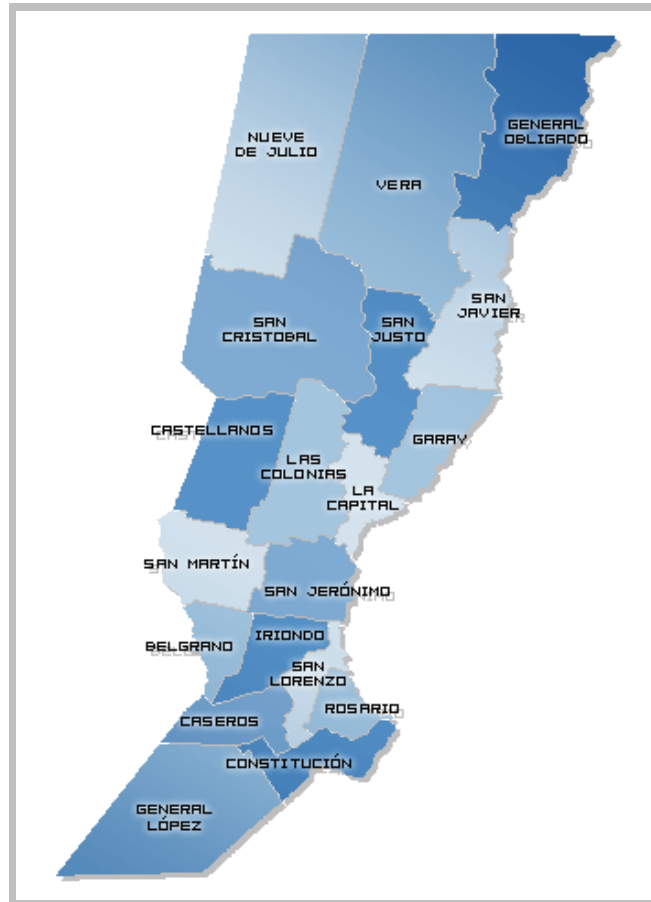


**Figura 1.2. Ubicación geográfica de la provincia de Santa Fe**

(Fuente: Ministerio de la Producción, Santa Fe)

En la actualidad, la provincia de Santa Fe, favorecida por su clima y una densa red hidrográfica, integra la región pampeana con uno de los niveles de desarrollo económico más

elevados del país. En su territorio se encuentran las más productivas y valorizadas tierras de Argentina, donde 70.000 km<sup>2</sup> (7 millones de ha) han demostrado ser excelentes para la agricultura.



**Figura 1.3. División política de la provincia de Santa Fe**

(Fuente: Mapas de Argentina.com)

Santa Fe, ubicada en la Región Centro de la Argentina está dividida políticamente en 19 departamentos (Figuras 1.2 y 1.3). Su capital es la Ciudad de Santa Fe de la Vera Cruz (Departamento La Capital), concentrándose la mayoría de sus industrias en el sur de la provincia (Departamento Rosario).

La provincia se encuentra ubicada en un punto central de los grandes corredores bioceánicos que vinculan al Mercosur, consolidando la conexión territorial y comercial con los países vecinos, desde Porto Alegre (Brasil) hasta Valparaíso (Chile), y desde San Pablo (Brasil) hasta Coquimbo (Chile).

La salida hacia el mundo de la producción santafesina queda evidenciada con su contribución de 21 % por ciento al total nacional exportado. Santa Fe es la segunda provincia exportadora

del país y el ritmo de crecimiento promedio anual de sus exportaciones en el último decenio es superior al 11 %, por encima de la media nacional. Los rubros impulsores de esta evolución favorable han sido los productos primarios y las manufacturas de origen agropecuario, creciendo un 60 % y un 100 % respectivamente en la última década. Dentro de los productos primarios se destacan las exportaciones de soja, girasol, trigo, maíz y arroz. Entre las manufacturas de origen agropecuario que se exportan en la actualidad, se encuentran las harinas proteicas, las grasas y aceites, carne bovina, leche en polvo, quesos, dulce de leche, crema de leche y cueros, entre otros (Ministerio de la Producción, 2010).

La importante producción agrícola está sustentada por diversos factores: por un lado, la extensa superficie de la provincia en sentido norte-sur, que le confiere características climáticas diversas, posibilitando distintos tipos de cultivos y por otro, el potencial productivo de sus suelos, prácticamente sin limitaciones para las actividades agrícolas. A los principales cultivos tradicionales (soja, trigo, maíz, sorgo, girasol) se suman los llamados regionales: arroz, algodón, caña de azúcar y los cultivos frutihortícolas.

La soja sigue siendo el cultivo más relevante entre los granos oleaginosos. Santa Fe ocupa el primer lugar entre las provincias productoras, con casi el 32 % del total nacional. En el sur, se cultiva el 70 % de la producción granífera provincial, obteniéndose los mejores rendimientos. Es el área cerealera por excelencia, debido a su clima templado y suelos aptos. En el norte, con clima subtropical, altas temperaturas y pocas precipitaciones, los principales cultivos son los industriales, como la caña de azúcar y el algodón. En la zona denominada "La Costa", donde lo determinante es el río Paraná, se cultiva arroz y productos frutihortícolas. La horticultura tiene, también, un desarrollo diversificado alrededor de los grandes centros urbanos, especialmente Santa Fe y Rosario. Posee un mercado en fuerte expansión, debido al crecimiento significativo del mercado nacional de productos frescos y congelados.

### **1.1.2. Cambios agrícolas y técnicos**

El liderazgo agrícola de la provincia de Santa Fe, tanto en cultivos tradicionales como regionales marcaron su trayectoria. Sobre la base de la información obtenida por el Censo Nacional Agropecuario 1988, se identificaron y caracterizaron los principales sistemas productivos de la provincia (INTA, 2002). Desde esa época hasta el presente se ha verificado una profunda transformación estructural del sector y una notable concentración de los establecimientos agrícolas y por consiguiente de productores agropecuarios. Por el momento



esta es una fuerte apreciación que necesariamente deberá ser evaluada en todas sus dimensiones e implicancias económicas y sociales.

#### **1.1.2.1. Sistemas productivos intensivos**

Sin duda los productos hortícolas simbolizan la seguridad y soberanía alimentaria de las diversas regiones y una línea productiva siempre presente en los cinturones urbanos.

Las zonas hortícolas en la Argentina se clasifican en tres tipos:

- ✓ cinturones verdes,
- ✓ zonas hortícolas especializadas
- ✓ áreas de horticultura extensiva.

Los cinturones verdes son las quintas o huertas que rodean a las grandes ciudades donde los cultivos predominantes son hortalizas de estación y/o verduras de hoja. Las zonas hortícolas especializadas se componen de huertas dedicadas a cultivos particulares con presencia de mano de obra asalariada. Las áreas de horticultura extensiva corresponden a zonas con cultivos más mecanizados donde se siembran superficies significativas, se los rota con cultivos no hortícolas y el destino de la producción puede ser industrial (Vigliola y col., 1991).

La forma familiar es la más antigua de las practicas de explotación agrícola y tiende a satisfacer las necesidades de las comunidades en las que se encuentran. Se desarrolla en pequeñas superficies (entre 0,5 y 5 ha) con una producción muy diversificada en pequeña escala y en general se trabaja con bajo nivel técnico, sin mano de obra asalariada. Se estima que no son necesarias más de 2 personas por hectárea y su influencia económica generalmente no queda registrada en estadísticas nacionales.

El “Cinturón verde del Departamento La Capital” es un ejemplo de estos sistemas diversificados que rodean a las grandes ciudades. Incluye a productores que poseen de 5 a 10 ha, con gran diversidad de cultivos a lo largo del año (hasta 10), con uso intensivo del suelo, agroquímicos y tecnología rudimentaria. Pueden emplear mano de obra asalariada pero escasamente especializada. Estas explotaciones por lo general producen especies de hoja y hortalizas de estación.

Actualmente, el sistema hortícola diversificado está en manos de pequeños productores y sus familias, que se encuentran en una situación de estancamiento y empobrecimiento provocado por factores externos e internos que amenazan la sustentabilidad de estos sistemas productivos.

Entre los aspectos relevantes que hacen a esta situación Van Konijnenburg y col. (2010) destacan:

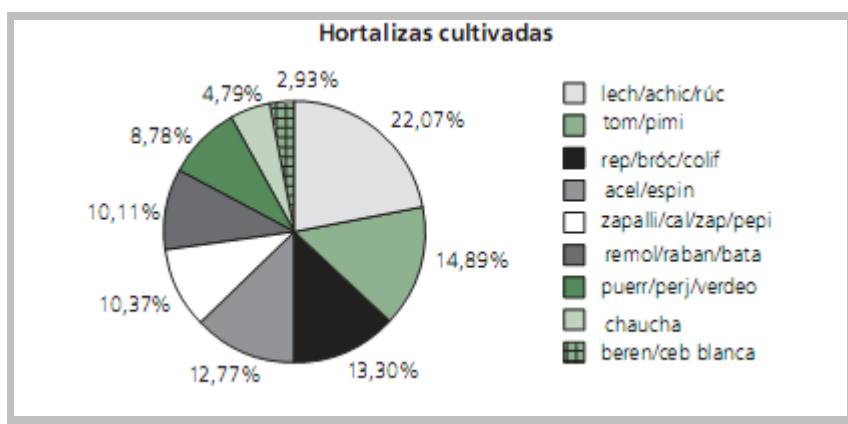
- ✓ el tamaño de las parcelas productivas es muy pequeño y las explotaciones tienen baja rentabilidad;
- ✓ muy pocos productores son dueños de la tierra que trabajan normalmente por imposibilidad de acceso. Cada año, el arrendamiento de tierras de calidad para cultivos hortícolas es más difícil, no solo por la mayor demanda de suelos aptos para cultivos especiales, sino también por el incremento del precio/ha de alquiler o subalquiler con contratos a muy corto plazo;
- ✓ la gran mayoría de los productores no cuenta con tractores y herramientas de labranza. Recurren al alquiler de los implementos a medida que avanzan los cultivos y en muchas oportunidades, al tener que esperar que estos se desocupen, las labores se realizan fuera de tiempo;
- ✓ en general, el parque de maquinarias muestra un gran deterioro originado no solo por su antigüedad sino por la falta de mantenimiento;
- ✓ la eficiencia empresarial de los productores es baja;
- ✓ los rendimientos específicos de las distintas variedades pierden importancia por la gran cantidad de producto que queda sin cosechar. En los hechos, el rendimiento final no está dado por la potencialidad de las semillas o los cuidados en el cultivo, sino por lo que se puede vender a un precio razonable;
- ✓ el nivel de informalidad en las transacciones comerciales es altísimo;
- ✓ fuera del Mercado de Concentración local, hay muy pocos lugares donde el encuentro entre la oferta y la demanda esté concentrado.

La zona hortícola santafesina también tiene su origen en las corrientes inmigratorias del Siglo XIX. La Familia Beckmann, proveniente de Hannover (Alemania) llegó en 1864 a Argentina para luego asentarse en la ciudad de Santa Fe. Guillermo Beckmann que tenía oficio de zapatero y pocos conocimientos sobre cultivos, se propuso transformar su vida y comenzó a trabajar las tierras en la zona norte de la ciudad. Aún en nuestros días, esa zona es denominada Monte Zapatero y constituye parte del área del cinturón hortícola de la ciudad de Santa Fe, en referencia a su persona.

En la actualidad, el Cinturón Verde Santafesino aporta un 1,2 % al mercado nacional con sus productos. Comprende unas 3100 ha de las cuales son cultivadas en forma intensiva unas 1200 ha en las que trabajan, hasta 3400 personas (Rodríguez y Lenardón, 2007).

A través de los años, la actividad modificó sus principales parámetros debido a la baja rentabilidad, el atraso técnico e intensos fenómenos climáticos (inundaciones y granizo). De unos 350 productores en 1980, se redujo a unos 150 en 2008, debido a una reducción de tierras destinadas a estos cultivos intensivos. A partir de 2006, los establecimientos productivos con mayor superficie (más de 50 ha) han ido reemplazando la actividad hortícola por los cultivos extensivos. La falta de acciones cooperativas hace que la mayoría de los productores, por lo general pequeños, participen solo en la producción y muy escasamente en la comercialización. La tendencia de este tipo de explotación es negativa y gradualmente va siendo sustituida por los cultivos hortícolas especializados o bien, reemplazados por cultivos extensivos de trigo, soja y alfalfa.

La producción hortícola en la actualidad se concentra en cultivos de hortalizas de hoja representadas principalmente por lechuga, achicoria, rúcula, acelga, espinaca, repollo, brócoli y coliflor. Le siguen tomate, pimiento, zapallito, calabaza y pepino y en mucho menor porcentaje otras verduras (remolacha, rabanito, batata, berenjena, puerro, perejil, chaucha, etc.).



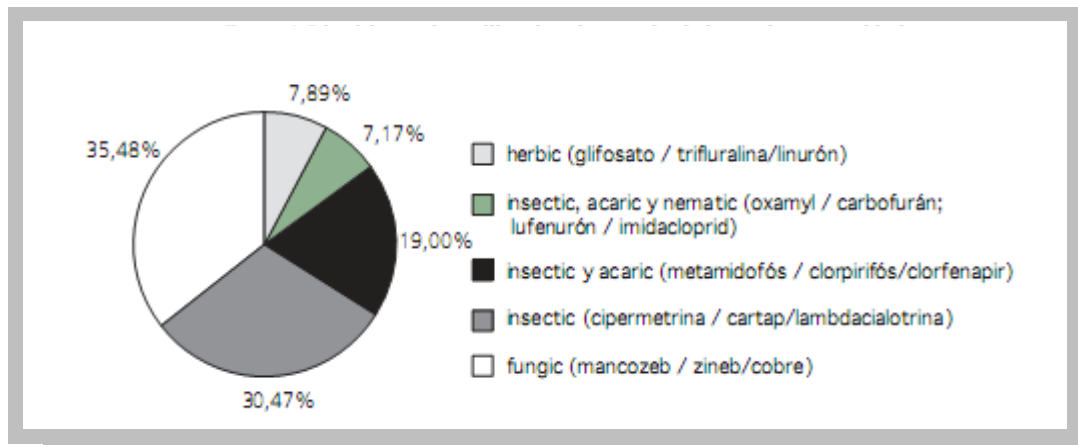
**Figura 1.4. Porcentaje de los principales cultivos hortícolas**

(Fuente: Rodríguez y Lenardón, 2007)

En comparación con otros tipos de producciones agrícolas, la horticultura se caracteriza por un uso intensivo de agroquímicos por unidad de superficie. En el Cinturón Verde Santafesino los cultivos considerados de alto riesgo reciben tratamientos seriados con insecticidas y fungicidas a lo largo de su proceso de desarrollo. Un ejemplo de ello es el cultivo del tomate cuya

productividad está severamente limitada por plagas y enfermedades y puede llegar a recibir hasta 40 tratamientos con agroquímicos. Los plaguicidas más utilizados en el cultivo del tomate son mancozeb, cipermetrina, deltametrina, buprofezin, imidacloprid, clorpirifos, metamidofos y oxiclóruo de cobre. A menudo la aplicación incluye tres ingredientes activos, a la vez o secuenciados (Castignani y col., 2004).

Los relevamientos desarrollados en la zona demuestran que un 57 % de los productores solo emplean biocidas, mientras que el 43 % restante además aplican abono foliar, urea, adherentes, etc. (Rodríguez y Lenardón, 2007).



**Figura 1.5. Porcentaje de los plaguicidas utilizados en los cultivos hortícolas**

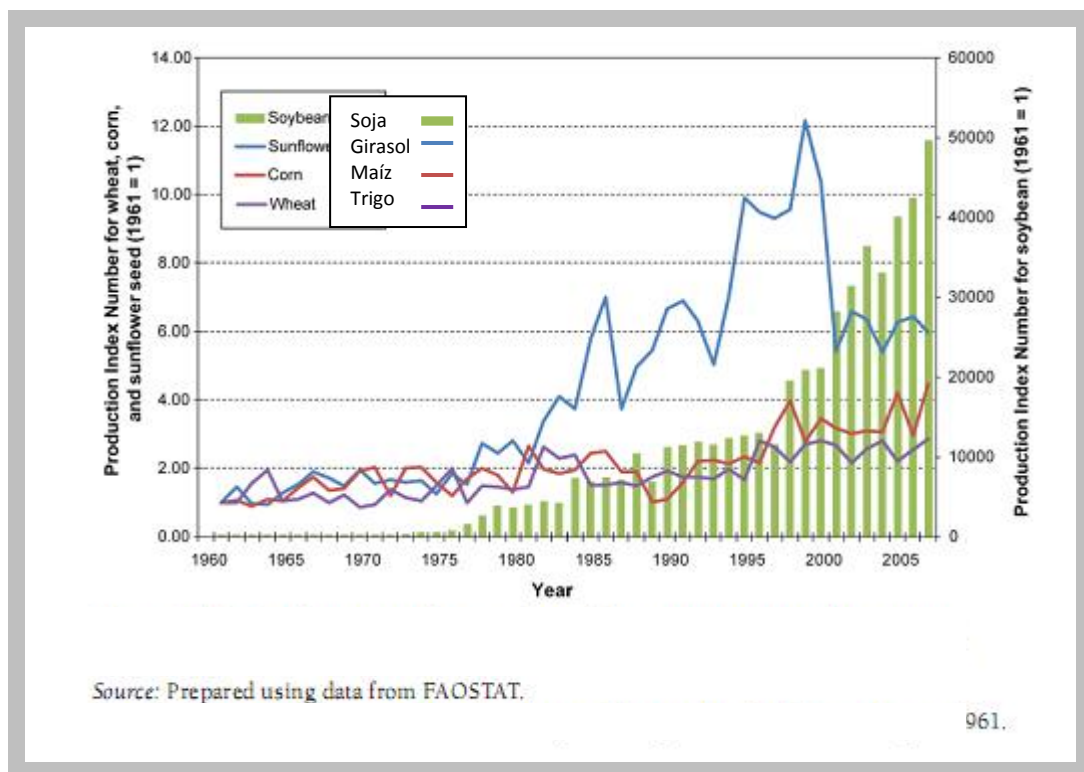
(Fuente: Rodríguez y Lenardón, 2007)

Los plaguicidas más utilizados son los insecticidas, nematicidas y acaricidas (57 %), herbicidas (8 %) y fungicidas (35 %) (Castignani y col., 2004; Rodríguez y Lenardón, 2007; Simoniello y col., 2008).

#### 1.1.2.2. Sistemas productivos extensivos

Históricamente, Argentina ha sido uno de los líderes mundiales en la producción y exportación de productos agrícolas. La principal razón es que se trata de un país relativamente poco poblado y rico en recursos naturales para la producción agrícola. Según datos de la *Food and Agriculture Organization* (FAO), en 2006, Argentina representó sólo el 0,59 % de la población mundial, pero con un 2,10 % de la superficie mundial total de la tierra. El país posee el 2,23 % de la tierra cultivable del mundo y con un dato aún más importante, el 2,96 % del área del planeta con prados y pastos permanentes.

Evaluando los datos del siglo XX, la producción de maíz y de trigo creció a un ritmo relativamente constante desde la década del 60. La producción de semillas de girasol, en cambio, aumentó seis veces entre finales de los años 1970 y 2000, para luego disminuir casi a la mitad desde el año 2000. Entre los cultivos, el desarrollo más importante fue el crecimiento explosivo de la soja, que de ser prácticamente desconocido a principios de 1970 pasó a convertirse en el cultivo más importante. En el período 2005 a 2007, más de la mitad de la superficie cultivada y alrededor del 45% del valor de los cultivos producidos correspondieron a la soja. Los patrones de evolución de la producción de cultivos fueron inducidos por los cambios en la rentabilidad relativa de los diferentes granos, principalmente derivados de cambios en la oferta y la demanda mundial, la introducción de nuevas tecnologías y las políticas agrícolas nacionales (Lence, 2010).



**Figura 1.6. Índice de producción de los principales cultivos en Argentina 1961-2007 (Fuente: Lence, 2010).**

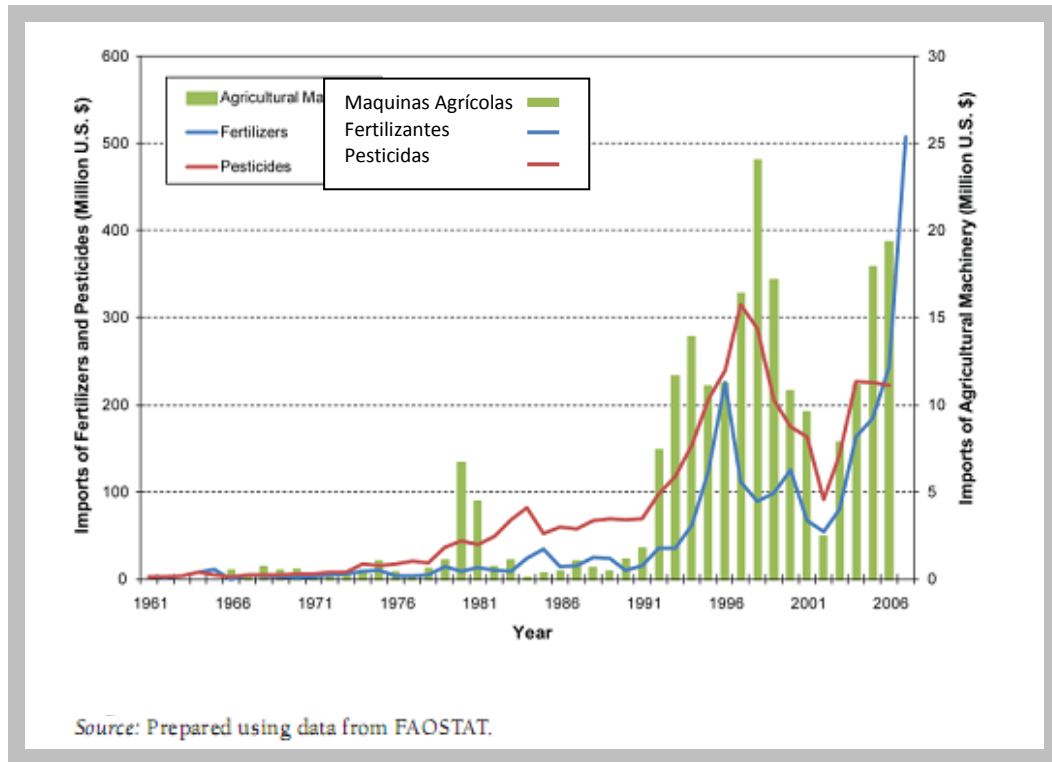
Argentina, fue intensificando su agricultura muy rápidamente. Al evaluar lo ocurrido en los últimos treinta años, observamos que la producción total de granos estuvo estancada entre la década del '80 y '90 en aproximadamente 32/38 millones de toneladas y logró duplicarse en la

última década superando ligeramente los 70 millones de toneladas, lo que significa un desempeño realmente espectacular (Figura 1.6).

La composición de los cultivos de granos cambió y hoy el 50% del área y del tonelaje está cubierto prácticamente por soja. El maíz y el trigo alcanzan el 37% del área destinada a granos. Los rendimientos unitarios en trigo pasaron de alrededor de 1.6 t/ha a 2,4 t/ha; en maíz el incremento fue de 3 a 5,5 t/ha, alcanzando las 6 toneladas en el 2002. Es evidente que esto no se logra solo con mejoramiento genético, sino también con tecnología en la producción de semillas. La producción de semillas en Argentina tiene un grado de crecimiento comparable al de los países más desarrollados en técnicas agrícolas. La duplicación de la producción total de granos es un claro ejemplo de que los cambios en el proceso productivo fueron efectivos, liderados por la difusión de cultivos transgénicos (Domingo, 2004).

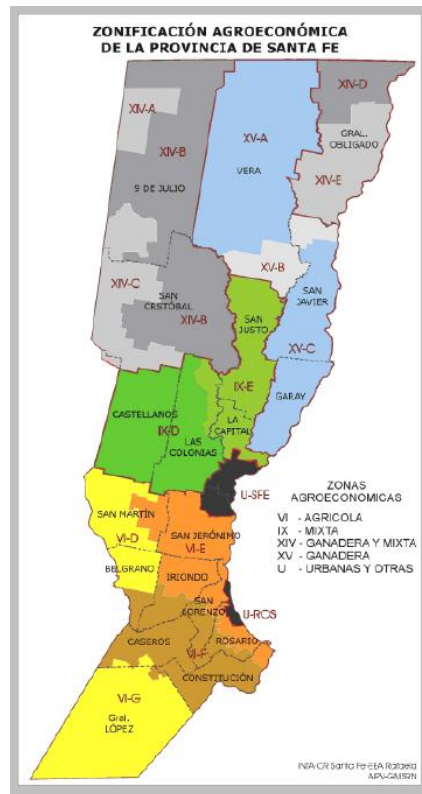
Los cambios en las políticas que se relacionan directamente con la agricultura implicaron la supresión de las restricciones cuantitativas y la reducción de los aranceles sobre las importaciones de insumos agrícolas (por ejemplo, fertilizantes, herbicidas, maquinaria y equipos de riego). Además, otros cambios de política provocaron un aumento sustancial en las importaciones de fertilizantes, pesticidas y maquinaria agrícola: la eliminación de impuestos a la exportación, la reducción significativa de la burocracia en el canal de comercialización y eliminación de las tasas fiscales en los combustibles de uso agrario, que se tradujo en el uso mucho mayor de insumos agrarios (Figura 1.7). Como resultado, la superficie cultivada con los principales cultivos anuales se expandió durante el decenio de 1990 y como era de esperar, la producción agrícola creció a un ritmo mucho más rápido en la década de 1990 que en décadas anteriores (Lence, 2010).

También en la provincia de Santa Fe, en los últimos años del siglo pasado y en lo que va del presente se han producido cambios profundos en el sector agropecuario, promovidos entre otras cosas por el crecimiento y la expansión del cultivo de soja. Durante mucho tiempo la provincia, por su naturaleza y tradición agrícola, especialmente su porción sur (pampa húmeda), fue la que tuvo mayor superficie implantada y mayor volumen de producción de cereales (Spontón y col., 2004).



**Figura 1.7. Tasas de Importación de fertilizantes, pesticidas y máquinas agrícolas, 1961-2007 (Fuente: Lence, 2010).**

De acuerdo al uso actual de las tierras, el territorio provincial puede dividirse en zonas agrícolas, mixtas y ganaderas. Se considera que, las zonas agrícolas son aquellas en las que la agricultura ocupa 66% ó más de la superficie bajo uso rural y las ganaderas comprenden las tierras en las que la ganadería ocupa 66% ó más y en las que no se prevé un avance importante de la agricultura. En tanto, las mixtas incluyen dos situaciones: a) aquéllas en las que ninguna de las actividades es netamente dominante y b) a las ganaderas, donde la agricultura tiene importancia local y es previsible que avance en el futuro cercano. En la Fig. 1.8 se identifican las zonas y sub-zonas (Giorgi y col., 2008) de la provincia mediante colores diferentes: las sub-zonas netamente ganaderas en celeste, las ganaderas y mixtas en grises, las mixtas verdes y las netamente agrícolas en amarillo, naranja y marrón.



**Figura 1.8. Zonificación agroeconómica de la provincia de Santa Fe**

(Fuente: Giorgi y col., 2008).

La expansión del cultivo de soja en la provincia obedece a varios factores que contribuyen a este verdadero “fenómeno agrícola” analizado por Baigorri y Pereyra, (2002):

- ✓ existe un mercado muy firme para la exportación de soja y sus derivados, por su alto contenido tanto de proteína como de aceite
- ✓ la variación en el tipo de cambio ha impactado favorablemente sobre la renta de los sistemas agrícolas
- ✓ el desarrollo de técnicas de producción innovadoras facilitaron y tornaron más eficiente el proceso ( mayor rentabilidad e incremento de la productividad)

Sin embargo, no debería confundirse crecimiento económico con desarrollo. En numerosas comunidades existe como consecuencia de la “sojificación” una gran expansión económica, que se concentra en manos de "grandes productores". La calidad de vida de los habitantes del lugar no mejora significativamente, debido a que las zonas rurales se siguen despoblando, merced al éxodo hacia las grandes ciudades ya que las actividades productivas modernas implican la disminución de mano de obra, reemplazada por una alta tecnificación.



Otros factores no menos importantes son las pérdidas económicas por factores climáticos y por plagas. Es importante mencionar que este cultivo puede ser atacado por una gran diversidad de especies de orugas defoliadoras durante el período vegetativo, mientras que durante la etapa de fructificación se incrementan las poblaciones de chinches, insectos que representan una seria amenaza por su gran efecto negativo en rendimiento y calidad de la semilla (Aragón, 2003).

La soja está íntimamente relacionada con el consumo de plaguicidas y este es diferente de acuerdo a la región. En el centro de la provincia de Santa Fe, se estima que los productores de soja efectúan un promedio de una aplicación de insecticida por lote por año, mientras que en regiones productoras del norte de la provincia, las aplicaciones necesarias para la protección del cultivo alcanzan promedios de 2 a 4 por lote, según los años. Para ello se dispone de varios insecticidas registrados a base de productos fosforados y mezclas de éstos con piretroides (Baigorri y Pereyra, 2002). La soja está ligada al uso casi exclusivo de variedades transgénicas, donde las semillas genéticamente modificadas son resistentes a la acción del herbicida glifosato. Pero no están bien definidas las prácticas más eficientes para el manejo de las malezas a nivel predial en siembra directa, y menos aún a nivel de región.

**Tabla 1.1. Datos comparativos para los períodos 2008-09 y 2009-2010 de los principales cultivos de la Argentina (Fuente: Bolsa de Cereales)**

**Avances siembra y cosecha Argentina.**

Fecha: 8/04/10	Soja 08/09	Soja 09/10	Girasol 08/09	Girasol 09/10	Maíz 08/09	Maíz 09/10	Trigo 08/09	Trigo 09/10
Siembra Mil ha.	17.750	19.000	2.230	1.285	2.860	2.500	4.550	3.080
Perdida mil ha	1.090	0.150	0.142	0.066	0.340	0.025	0.350	0.320
Cosechable Mil ha	16.660	18.850	2.003	1.219	2.120	2.475	4.200	2.760
Avance Cos/Siemb %	100	27.5	100	90.4	100	50.0	100	100
C. Año anterior %	100	35.1	100	100.0	100	-	100	100
Rinde T/ha	1.920	3.360*	1.450	1.740	5.910	9.070	2.100	2.700*
R. Año anterior T/ha	2.870	1.920	1.710	1.450	6.840	5.910	2.930	2.100
Prod/Siem Mil t ó ha.	31.888	17.389	3.008	1.917	12.521	11.215	8.100	7.440
Proyección Mil t	32.000	54.5*	3.008	2.100*	12.521	20.200	8.100	7.440*

Fuente: Elaborado a partir de Bolsa Cereales 25/03/2010) \*Proyectado

Analizando los informes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) para el año 2010 (Tabla 1.1), donde se presentaron los resultados a nivel nacional de los distintos granos, podemos observar las perspectivas y proyecciones en miles de toneladas para cada uno de los cultivos. La provincia de Santa Fe, contribuye en gran medida a estos rindes, la soja

ocupa el primer lugar en la producción provincial, y contribuye en un 30 % con la producción nacional de esta oleaginosa (Muñoz, 2010).

El maíz es otro cultivo muy importante (contribuye con el 14,7% a la producción nacional), que participa en muchas secuencias agrícolas o ganaderas en la zona central de Santa Fe debido a sus múltiples usos y a los interesantes márgenes brutos que se obtienen. La oferta de híbridos en el mercado es importante y año a año se renueva constantemente. Para la región centro, se recomienda la preparación del suelo con una mezcla de herbicidas: glifosato y atrazina. El tratamiento post-emergente incluye el uso de glifosato, atrazina y un insecticida-acaricida: metil-pirimifos y buprofezin, y para el control de plagas mezcla de insecticidas: clorpirifos y lambdacihalotrina (Fontanetto y col., 2009).

El trigo santafesino constituye el 11% de la producción nacional. En información proporcionada por el INTA de la región centro, el control de malezas se efectúa en presiembra con la aplicación de “barbecho químico” mezcla de los herbicidas: glifosato, 2,4-D y metsulfurón-metil (Cencig y col., 2008). El girasol contribuye con un 6 % al total argentino y para este cultivo se recomienda el control de malezas en presiembra con glifosato y en pre-emergencia con los herbicida acetoclor y fluorocloridona (Villar y Cencig, 2009).

En la Tabla 1.2. se resumen los costos que debe enfrentar el productor argentino para cada cultivo, expresando los datos en dólares por hectárea para los distintos insumos. Son muchos los factores que deben considerarse para determinar el margen bruto de ganancias, aunque la soja sigue siendo el cultivo más rentable. Mientras que las prácticas de fertilización del suelo no insume costos elevados para el productor comparado con otros cultivos, los costos en servicios suelen ser elevados debido a la necesidad de maquinarias específicas y el elevado uso agroquímicos, los que se encuentran íntimamente relacionados con la producción de la soja.

Considerando el incremento de este cultivo mayoritario en las últimas décadas, las proyecciones para las próximas temporadas y la necesidad de insumos específicos para su producción (pesticidas), deben ser profundamente evaluadas las consecuencias sobre la salud humana y su hábitat.

**Tabla 1.2. Costos por ha para los distintos cultivos.**

(Fuente: INTA EEA Pergamino, 2010).

Fecha 16/04/2010	TRIGO		GIRASOL		MAÍZ		SOJA	
Rendimiento Qq/ha	35	45	18	25	75	95	28	38
Precio futuro u\$/qq	13,9	13,9	24,0	24,0	11,2	11,2	22,3	22,3
Ingreso Bruto u\$/Ha	487	626	432	600	840	1064	624	847
G Comercialización %/IB	20	20	12	12	25	25	16	16
Ingreso Neto u\$/Ha	389	500	380	528	630	798	524	712
Labranzas u\$/Ha	48	48	49	49	42	42	66	66
Semilla u\$/Ha	40	40	35	35	80	80	46	46
Urea, FDA u\$/Ha	157	157	62	62	132	132	28	28
Agroquímicos u\$/Ha	18	18	25	25	28	28	45	45
Cosecha u\$/Ha	34	44	35	48	59	74	37	51
Costos Directos u\$/Ha	-297	-307	-206	-219	-341	-356	-222	-236
Margen Bruto u\$/Ha	92	194	175	309	289	442	302	476
SIEMBRA PORCENTAJE								
MB-40%IB u\$/Ha	-102	-57	2	69	-47	16	52	137
ARRENDAMIENTO								
Alquiler promedio qq/Ha	12	12	9	9	30	30	18	18
M B- Alquiler u\$/Ha	-75	27	-41	93	-47	106	-99	75

Márgenes brutos de los cultivos en dólares. FDA: fertilización con fosfato diamónico

### 1.1.3. Exposición a plaguicidas: Condiciones socio-ambientales

En diferentes estudios se ha tratado de identificar una amplia gama de factores que pueden estar asociados con la exposición humana a plaguicidas. De estos análisis se podrían desprender un conjunto mínimo de consideraciones necesarias para comprender la exposición y los efectos sobre la salud, tanto de las poblaciones como de los trabajadores, a través de un conjunto de interrelaciones y de factores predictores de la exposición a pesticidas.

Se ha planteado que existen factores proximales y distales de la exposición a plaguicidas. Los determinantes proximales de la exposición son generalmente los comportamientos practicados ya sea por los trabajadores agrícolas en el lugar de trabajo o por los trabajadores agrícolas y los miembros de su familia, co-residentes en el hogar. Estos determinantes incluyen el uso de equipo de protección personal (EPP) y las normas de higiene utilizadas en el lugar de trabajo, así como las prácticas de lavado e higiene de vestimentas y enseres en el ámbito doméstico.

Los factores distales incluyen las condiciones ambientales en el trabajo (por ejemplo, formación en seguridad), en el hogar (por ejemplo, el número de trabajadores que habitan en una misma la vivienda), y en la región (por ejemplo, grandes extensiones tratadas con agroquímicos). Estos factores ambientales afectan a la exposición a través del comportamiento. La asociación de factores ambientales y de comportamiento es moderado por factores psicosociales, incluyendo las actitudes, valores, creencias y el conocimiento de los trabajadores rurales o de los aplicadores de pesticidas.

### **1.1.3.1. Acceso a la población.**

En nuestro país, los trabajadores rurales viven con sus grupos familiares y estos se encuentran dispersos en diferentes áreas, a menudo dentro de las distintas quintas o establecimientos que se encuentran separadas por distancias relativamente cortas pero sin pavimentos o mejorados en las calles.

Los trabajadores agrícolas constituyen una población de no fácil acceso y de la que es sumamente difícil reclutar participantes para actividades sociales y/o sanitarias. Por lo general y en particular en el cinturón verde de Santa Fe (región de estudio), no existe una lista de trabajadores rurales a nivel oficial que permita seleccionar una muestra poblacional con esos fines. Frecuentemente los propietarios de las quintas y/o capataces son refractarios a que los trabajadores agrícolas participen en investigaciones sanitarias.

La organización del trabajo agrícola, su estructura temporal, los métodos de producción y la dependencia económica del trabajador, son las principales dificultades para la realización de evaluaciones, que han sido reportadas por diferentes investigadores (Quandt y col., 2002, 2004).

*¿Cómo, dónde y cuándo los trabajadores pueden ponerse en contacto con un grupo de investigadores y ser evaluados?* El acceso a los trabajadores incide sobre todos los aspectos de la investigación y es un elemento crítico ya que afecta el análisis necesario para investigar las hipótesis que se desean probar, para poder determinar las tasas y los predictores de exposición. Esto decide cómo se puede desarrollar la investigación, así como el diseño de la muestra del proyecto y la recopilación de datos. Pero además, el acceso también tiene importancia ética: los investigadores deben considerar si los trabajadores agrícolas se estarían exponiendo al riesgo de sanciones o a perder el puesto de trabajo.

Para acceder a los trabajadores rurales en sus lugares de trabajo, los investigadores deben conocer qué explotaciones agrícolas emplean trabajadores y los períodos de mayor actividad productiva. El acceso a los lugares de trabajo es controlado por los productores, en el caso de los trabajadores rurales, así como por los dueños de las empresas de fumigación, en el caso de los aplicadores. Debe gestionarse el acceso a los lugares de trabajo pero este puede ser negado por el productor o el capataz con la sola justificación de no detener o entorpecer el trabajo. Además, los productores o propietarios pueden preocuparse por la responsabilidad que les pudieran generar los informes si las investigaciones determinan que las normas y leyes no se respetan, que un trabajador está expuesto o se enferma por la exposición a agroquímicos.



**Figura 1.9. Fotos de una “Posta Sanitaria” cercana a una comunidad aborigen del área rural**



**Figura 1.10. Fotos del Servicio de Atención Médica a la Comunidad (SAMCo) de la localidad Providencia, zona de cultivos extensivos**

El acceso a los servicios de salud (dispensarios y hospitales zonales designados SAMCo: Servicio de Atención Médica a la Comunidad) no siempre es fácil. Los médicos a veces son refractarios a participar en la investigación, ya que puede afectar el flujo de trabajo y aumentar sus tiempos y costos. También a menudo hay desconfianza en colaborar con la investigación en función de las experiencias anteriores de los servicios de salud con evaluaciones que no han aportado datos y soluciones.

Dos aspectos de la estructura temporal de la producción agrícola son críticos en las etapas de muestreo, medición y recopilación de datos: la estacionalidad y el período de producción.

Por otra parte, se utilizan diferentes plaguicidas durante cada campaña agrícola y esta heterogeneidad provoca dificultades en el muestreo y posterior análisis, como también en la recolección de datos referentes a las tareas que realizan los trabajadores. El limitado tiempo dentro de cada fase de la producción complica la investigación y además, los factores externos, como lluvias, anegamientos e inundaciones, pueden tener un efecto aún más dramático en el acceso a la población.

### **1.1.3.2. Características del trabajo rural.**

Los trabajadores rurales migratorios y temporales son trabajadores eventuales. La fuerte dependencia entre las formas agrotécnicas y las relaciones laborales ocasionales crea varios retos para el diseño y ejecución de la evaluación de exposición a fitosanitarios. En primer lugar, la ausencia de un régimen de empleo a largo plazo en el trabajo agrícola disminuye la capacidad de proseguir con las evaluaciones a través del tiempo y pone límites a la capacidad de los investigadores para valorar la exposición acumulativa a agroquímicos, a corto y largo plazo, las consecuencias para la salud y la efectividad de las intervenciones de vigilancia sanitaria para evitar la exposición.

El empleo de jornaleros (comúnmente llamados peones “golondrina”) en algunos sectores de la agricultura crea problemas para delimitar si la exposición a agroquímicos se produjo como consecuencia solo de las labores agrícolas evaluadas o de actividades llevadas a cabo en otro trabajo anterior. Por último, la ausencia de relaciones de empleo a largo plazo crea dificultades en la definición y creación de muestras representativas (Arcury y col., 2006).

La exposición a agroquímicos es probable que sea mayor entre los trabajadores agrícolas de temporada o jornaleros, en contraste con los "permanentes". Los trabajadores agrícolas permanentes (más estables, no temporarios) pueden llegar a adquirir un conocimiento más eficiente sobre el uso de los equipos de aplicación y vestimentas que los trabajadores agrícolas estacionales o jornaleros. Algunas investigaciones sostienen que los jornaleros generalmente están más expuestos a tareas con riesgo que los trabajadores permanentes (Quintana y col., 2001). También, los jornaleros podrían ser menos propensos a poseer o a solicitar equipos de protección o a informar a los propietarios sobre los peligros potenciales por temor a que esto pueda poner en peligro el trabajo (Aronsson 1999; Aronsson y col., 2002; Quinlan y col., 2001).

Uno de los aspectos primordiales del entorno de trabajo, directamente relacionados con la exposición a plaguicidas, es el entrenamiento o capacitación en seguridad que puedan tener los

trabajadores. Varios trabajos en distintos países demuestran que los trabajadores rurales no tienen una formación conforme a lo dispuesto por las normativas, aunque las tasas varían con el tiempo (Arcury y col., 1999; Elmore y Arcury 2001).

Las normas de capacitación en uso seguro de plaguicidas o al menos su contenido mínimo, forma parte de las actividades obligatorias de las aseguradoras de riesgo de trabajo (ART) tanto para los trabajadores rurales como para los aplicadores. Sin embargo, el carácter temporario de los trabajadores, la ausencia de vigilancia sanitaria y la falta de sindicalización, no contribuyen al cumplimiento de las normas o leyes vigentes.

También se ha observado que, aún cuando el entrenamiento se produce, es poco entendido tanto por problemas educativos como por barreras del lenguaje (Salazar y col., 2004). Por otro lado investigaciones con aplicadores (Martínez y col., 2004) y con trabajadores rurales (Perry y Layde, 2003) demostraron que el entrenamiento de seguridad produce un mayor conocimiento, pero no necesariamente adecuados comportamientos de seguridad.

### **1.1.3.3. El ambiente doméstico: aspectos físicos y sociales.**

#### **1.1.3.3.1. Trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos**

La proximidad de las viviendas a los campos agrícolas tratados con pesticidas se ha sugerido como un factor estrechamente relacionado con la exposición (Fenske y col., 2000). Los estudios de muestras de polvo de los hogares de trabajadores agrícolas apoyan esta sugerencia, tanto en términos de las concentraciones de plaguicidas (McCauley y col., 2001) como en el número de pesticidas hallados en el hogar (Quandt y col., 2002, 2004).

Por otra parte, la presencia de depósitos de agroquímicos y sus envases vacíos, en las proximidades de las viviendas, constituye uno de los problemas más serios en nuestra región (Rodríguez y Lenardon 2007).



**Figura 1.11. Fotos de envases de agroquímicos en la cercanía de hogares rurales**

Varios indicadores de calidad de la vivienda se han relacionado con una mayor exposición a los pesticidas de las familias rurales. La antigüedad y las condiciones de higiene de la vivienda así como una historia de los diferentes ocupantes puede llevar a la acumulación de importantes cantidades de plaguicidas y estar asociadas con una mayor exposición (Quandt y col., 2004).

La composición de los hogares rurales puede tener influencia sobre la exposición a pesticidas en la vivienda (Arcury y col., 2005; McCauley y col., 2001, 2003). El tamaño de las familias rurales y las condiciones de hacinamiento, fue relacionado por varios autores con la exposición a los plaguicidas y las conductas de seguridad en el hogar (Quandt y col., 2004; Goldman y col., 2004).

Las mujeres, por lo general tienen gran participación en la actividad hortícola. Sin embargo su percepción del riesgo es más baja puesto que no se reconocen a sí mismas como “trabajadores”. Así, para su entendimiento, ellas no estarían expuestas a pesticidas, ya que solamente están “ayudando” a sus maridos o padres, en actividades de protección de los cultivos. Varios estudios informan elevadas tasas de intoxicación por pesticidas entre el grupo de mujeres (SINITOX, 2003; SI.NA.V.E, 2003) y en algunos casos las mujeres que residen en hogares rurales reportaron dificultades en la higiene del hogar y las ropas de trabajo ya que los roles de género limitan la autoridad de las mujeres sobre el comportamiento del hombre trabajador rural (Arcury y col., 2005 y Quandt y col., 2004).

Los hijos de los trabajadores rurales se encuentran frecuentemente en contacto con los cultivos ya sea para trabajar o bien recibir algún control mientras la madre trabaja. Esto ha sido descrito también por otros autores (Cooper y col., 2001, Hernández-Valero y col., 2003; Mandel y col., 2005) que demostraron la presencia de plaguicidas en sangre, hallando relación entre la duración del trabajo agrícola y el incremento significativo en los niveles de exposición.

Varios investigadores han tratado de evaluar el conocimiento de los trabajadores agrícolas sobre los plaguicidas y analizar sus creencias que provienen de la simple exploración, comprobándose que los trabajadores consideran que solamente el producto húmedo o líquido puede dañarlos y que solo la exposición aguda puede causarles enfermedad ya que no consideran la exposición cotidiana o seriada (crónica). Los trabajadores rurales y los aplicadores estiman que hay trabajadores más “sensibles” a ciertos productos (susceptibilidad individual), y que enfermarse es “parte del trabajo”; ya que trabajar en condiciones inseguras



es aceptable cuando las remuneraciones son satisfactorias (Quandt y col., 1998, 2001; Salazar y col., 2004)



**Figura 1.12. Trabajadores rurales y sus hijos en una quinta santafesina**

La comunicación con los trabajadores hortícolas se ve dificultada por diferencias en el lenguaje y serias limitaciones en el grado de instrucción escolar (Arcury y col., 2001; Kamel y Hoppin, 2004; McCauley y col., 2001). El vocabulario de los trabajadores incluye expresiones muy particulares: los fitosanitarios suelen denominarse “liquido” o “producto”, otras veces “veneno” y a la aplicación se la denomina “fumigación” o “cura”.

Naturalmente, el nivel de educación y alfabetización de la población afecta la comunicación entre los investigadores y los trabajadores del campo. Los jornaleros generalmente tienen menos de 7 años de escolaridad (duración de la escuela primaria). En conjunto, estas características hacen del contacto, el reclutamiento y la obtención del consentimiento informado de los trabajadores, una etapa difícil. Como consecuencia también se hace complejo el proceso de recopilación de datos y el suministro de instrucciones para la recolección de muestras.

#### **1.1.3.3.2. Aplicadores de pesticidas en cultivos extensivos.**

Los aplicadores de agroquímicos en cultivos extensivos muestran diferencias importantes en los aspectos socio-culturales, como también en las condiciones de vida (vivienda, agua potable, etc.) respecto de los trabajadores hortícolas. Por lo general tienen escolaridad completa e incluso en algunos casos han recibido educación técnica.

El conocimiento de los aplicadores se pone en evidencia en su participación en las charlas de formación sobre seguridad con agroquímicos. Algunos estudios han tratado de medir la asociación de los conocimientos sobre plaguicidas y las creencias con el comportamiento ante los fitosanitarios (Martínez y col., 2004; Perry y col., 2000). Diferentes estudios muestran que un mayor conocimiento aumenta la percepción de los riesgos de los plaguicidas y la voluntad de poner en práctica comportamientos de uso seguro para reducir la exposición y los posibles daños (Vaughan, 1993; Grieshop y col., 1996; Arcury y col., 2002; McCauley y col., 2002). Entre los aplicadores que han experimentado anteriormente efectos adversos, también se observa una mayor predisposición a adoptar mayores precauciones cuando trabajan con pesticidas (Lichtenberg y Zimmerman, 1999).

Los métodos de producción en grandes extensiones, en particular el grado de mecanización, introducen otros desafíos para la investigación de exposición a agroquímicos, ya que la tecnificación influye en la forma de exposición. En la década pasada, era frecuente emplear como banderilleros a trabajadores jóvenes y ágiles e incluso a los miembros de la familia del aplicador (incluyendo esposa e hijos), prácticas que se perdieron con la utilización de los banderilleros satelitales. Cuando las tareas agrícolas se basan en el trabajo humano, tanto la vía respiratoria como la dérmica son las rutas comunes de exposición, siendo esta última importante cuando los aplicadores son los encargados de lavar y/o reparar los equipos sin el uso de adecuadas medidas protectivas. La inhalación puede ser la forma principal de absorción cuando el control de plagas depende por completo de las máquinas aplicadoras.

#### **1.1.3.4. Consideraciones finales.**

A pesar de la integridad de varias de las relaciones señaladas, las diferencias en la exposición a pesticidas entre los trabajadores agrícolas en los diferentes tipos de cultivos, no se han estudiado por lo menos de forma explícita en nuestro país. Del mismo modo es posible que los tipos de cultivo intensivos y extensivos, se encuentren asociados a distintos niveles de exposición a pesticidas, ya que pueden existir diferencias en las prácticas técnicas asociadas las necesidades de mano de obra y los modelos de aplicación de pesticidas.

#### **1.1.4. Plaguicidas: conceptos generales**

El uso de plaguicidas ha transformado nuestro planeta ya que ambientes que previamente eran inhabitables debido a enfermedades transmitidas por diversos vectores son ahora aptos, los monocultivos pueden crecer con mínima invasión de malezas y los insectos en el hogar pueden ser más fácilmente controlados.

Desde la simple definición de Pesticida como producto destinado a combatir las plagas, lo ubicuo de su uso en el último siglo condujo a una nueva definición. La Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la FAO define como “Plaguicida” a *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en, o sobre sus cuerpos”* (FAO, 2010).

El término incluye las sustancias empleadas como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o para evitar la caída prematura de la misma, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro que se genera durante el almacenamiento y transporte. El término comprende a todos los ingredientes activos en cualquiera de sus formas, sin importar si fueron formulados para su aplicación. Incluye también las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro que se genera durante el almacenamiento y transporte, pero no así los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal ni aditivos alimentarios (FAO, 2010).

Como sinónimo de plaguicida es frecuente utilizar los términos: pesticida, producto fitosanitario, fitoterápico, producto de sanidad vegetal, agroquímico, biocida.

A pesar que se introducen al mercado nuevos productos agroquímicos con mayor selectividad sobre el vector a controlar y por tanto menor toxicidad para los organismos no-blanco, lo determinante de su peligrosidad en ocasiones, es la forma y condiciones de su aplicación. En la actualidad, en los países desarrollados son poco frecuentes los incidentes en humanos por exposición aguda a plaguicidas. Ello se debe, tanto a las severas restricciones en el uso de productos altamente tóxicos como también al empleo de nuevos productos de menor toxicidad

para los mamíferos y otras especies, pero fundamentalmente al estricto cumplimiento del marco regulatorio vigente. Por ello, en la actualidad, la preocupación de los investigadores está centrada en los efectos crónicos o a largo plazo de los plaguicidas.

En países en desarrollo, en cambio, los estudios epidemiológicos (Jeyaratnam 1990; McCauley y col., 2006) estiman que 25 millones de personas por año padecerían alguna forma de intoxicación por plaguicidas. En Brasil, por ejemplo, en el año 2003, se registraron aproximadamente 8.000 casos de intoxicación por pesticidas con un 75 % de casos por exposición agrícola (SINITOX, 2003). Si se considera que por cada caso registrado, habría 50 no declarados, la cantidad podría aumentar a 400 mil. En Argentina, según datos provistos por el Ministerio de Salud a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SI.NA.V.E, 2003) se registraron 3881 casos de intoxicaciones con plaguicidas (30% del total de intoxicaciones) pero solo aproximadamente el 5 % de ellas fueron de origen ocupacional. Según el organismo este bajo porcentaje podría deberse, por un lado a un sub-registro de casos y por otro a que, muchos de los casos caratulados como “accidentales” (68 %), provendrían de una errónea tipificación etiológica.

En esta sección de este trabajo de Tesis Doctoral se presenta una breve reseña de los productos fitosanitarios más utilizados en los cultivos de nuestra región

Puesto que los plaguicidas se clasifican de acuerdo a diversos criterios: estructura química, mecanismo de acción, forma de aplicación, modo de acción sobre el vector, la plaga a combatir, etc. (Ecobichon, 2005) en este trabajo de Tesis se ha optado por clasificarlos en insecticidas, fungicidas y herbicidas, comprendiendo de este modo a grupos químicos muy diferentes entre sí, agrupados según la plaga a combatir.

#### **1.1.4.1. Insecticidas**

Los insecticidas más utilizados son aquellos capaces de alterar la transmisión de impulsos nerviosos. A este grupo pertenecen los organoclorados (OC), los organofosforados (OF), los carbamatos y los piretroides. Un segundo grupo, está constituido por compuestos que son capaces de formar complejos metalo-enzimáticos a distintos niveles celulares del organismo biológico. Se debe destacar que, buscando una mayor selectividad sobre el organismo considerado plaga, en la última década se han incorporado los insecticidas “bioracionales” que se caracterizan por una acción particular sobre cada insecto. Generalmente no son el resultado

de síntesis química y tienen la particularidad de interferir en procesos biológicos tales como el crecimiento, el apareamiento, la puesta de huevos o la alimentación, entre otros mecanismos.

#### 1.1.4.1.1. Insecticidas Organoclorados

Los OC comprenden un grupo muy heterogéneo en cuanto a su estructura química y pueden ser clasificados en tres grandes grupos:

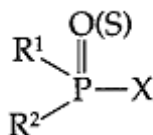
- ✓ Grupo del DDT o Clorobenzilatos: DDT, metoxicloro, pertano, keltano, DDD y prolan
- ✓ Grupo del hexaclorociclohexano: Isómeros  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH y  $\phi$ -HCH (Lindano)
- ✓ Ciclodienos: derivados del dimetanonaftaleno (aldrín, dieldrín, isodrín y endrín); derivados del indano (clordano, heptacloro, heptacloroepoxido); derivados del bicicloheptano (endosulfán, bromodán).

El mecanismo de acción tóxica de los OC resulta de interferir en la transmisión axonal de impulsos nerviosos, provocando alteraciones del SNC. Por su gran liposolubilidad y alta persistencia, se acumulan en la cadena trófica provocando importantes cambios en el ambiente. Por su condición de persistencia y bioacumulación, el uso de los OC ha sido restringido y/o prohibido en muchos países. En Argentina fueron prohibidos desde 1990 hasta el presente los siguientes OC: aldrin, canfeclor, captafol, clordano, clorobencilato, DDT, dieldrin, endrin, HCB (hexacloro ciclo benceno), heptacloro, HCH (hexacloro ciclo hexano), lindano, metoxicloro. (SENASA, 2003).

En nuestro país y en particular en los cultivos de la región, se emplea el endosulfán a pesar que su uso como insecticida y acaricida, ha sido prohibido en más de 50 países (Carballo y col., 2011a) por su actividad como disruptor endocrino y por ser altamente tóxico en la exposición aguda.

#### 1.1.4.1.2. Insecticidas Organofosforados

Los OF comprenden un grupo de pesticidas cuya estructura básica esta indicada en la Figura 1.13, donde  $R^1$  y  $R^2$  son por lo general grupos alquilo o arilo simples, los cuales se pueden enlazar directamente al átomo de fósforo o vincularse por el puente -O-O-S-. Las características del grupo saliente, X, dan como resultado cuatro categorías principales: (1) X contiene un nitrógeno cuaternario, (2) X = F, (3) X = CN, OCN, SCN o un halógeno como ser F, y (4) X = restos de otros grupos como alquilo alcoxi, o alquiltio, arilo, o heterocíclicos.



### **Figura 1.13. Estructura química de los Organofosforados**

Según su estructura química la OMS (2009) clasifica a los OF, desde Clase I (altamente peligroso) a III (ligeramente peligroso). Por su gran incidencia en intoxicaciones fatales y siguiendo la normativa internacional, se prohibió en Argentina al: monocrotofos, etil-paration, y metil-paration y se limitó el uso de otros, como por ejemplo disulfoton, etil-azinfos, etion, metamidofos y fenitrotrion (SENASA, 2003).

La acción tóxica principal de los OF sobre insectos y mamíferos, es la fosforilación de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en las terminaciones nerviosas a través de una unión covalente P=C. El neurotransmisor Acetilcolina (Ac) es degradado continuamente por la AChE. Como resultado de la inhibición de la actividad de la AChE por parte de los OF, se produce una excesiva estimulación de los receptores de Ac, afectando los sistemas simpático y parasimpático, el sistema neuromuscular y terminaciones nerviosas en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Chambers y Oppenheimer, 2004).

Los plaguicidas derivados del ácido metil-carbámico, llamados metilcarbamatos (MeC) son también inhibidores de la AChE produciendo la carbamilación de las esterasas. Aquí, la unión C=C es reversible y por lo tanto estos plaguicidas son de menor toxicidad que los OF (Perkins y Schlenk, 2000).

La intoxicación aguda con OF y su peligrosidad ha sido descripta en numerosos estudios (Repetto y col., 1995, Bradberry y Vale, 2005).

Se han estudiado además, en poblaciones expuestas a OF durante largos periodos, diversos tipos de manifestaciones: enfermedades dérmicas, o de la piel (Cellini y Offidani, 1994) leucemia (Morris y col., 1990), neuro-toxicidad (Jamal y col., 2002), linfoma no Hodgkin (Hoar y Blair, 1992), aberraciones cromosómicas (AC) (Rupa y col., 1989), alteraciones en funcionamiento hepático (Kamal y col., 1990), aumento en la mortalidad (Cantor y Booze, 1990; Amoateng y col., 1995). Por otra parte se ha evaluado la presencia de sintomatología general e inespecífica con niveles de colinesterasa normales o deprimidos pero dentro de límites establecido para población no expuesta (Gordon y Richter, 1991; Richter y col., 1992; Peedicavil y col., 1991; Mc Conell y col., 1994; Stokes y col., 1995).

Sin embargo son escasos los estudios para evaluar efectos crónicos de los OF sobre reproducción, teratogenicidad y carcinogenicidad. En cuanto a la genotoxicidad se han reportado estudios utilizando el test de Ames para diclorvos generando un aumento en la

frecuencia de mutaciones (U.S. EPA, 1988). El cloropirifos ha demostrado ser no cancerígeno (Young y col., 1990), no teratógeno (Deacon y col., 1980), y no afectar la reproducción (Breslin y col., 1996), no obstante en leucocitos de sangre periférica de ratón produce significativo daño al ADN (Rahman y col., 2001).

El malation (grado técnico), produce AC y micronúcleos (MN) en animales de experimentación (Dulout y col., 1982; Hoda y Sinha, 1991; Salvadori y col., 2004). Otros estudios *in vitro*, en linfocitos humanos también han mostrado resultados positivos (Nicholas y col., 1979; Galloway y col., 1987; Herath y col., 1989; Garry y col., 1990; Balaji y col., 1993).

#### **1.1.4.1.3. Insecticidas Carbámicos**

Los carbamatos son derivados del ácido carbámico, cuya estructura química tipo es: RO-NC-(CH<sub>3</sub>)-R<sup>1</sup>, donde R<sup>1</sup> es a menudo hidrógeno o un grupo metilo por lo que se los designa MeC para diferenciarlos de los tio y ditiocarbamatos (DTC). En algunos casos, R<sup>1</sup> puede ser N ó S ó restos sustituidos que dan lugar a la formación de un pro-insecticida que requiere del metabolismo para tener acción tóxica.

Los MeC, como los OFs, son inhibidores de la actividad de la enzima AChE. Aunque los signos y síntomas de intoxicación aguda son similares a los de los OF, la dosis a la que aparecen los primeros síntomas son muy distantes de aquella capaz de causar la muerte.

La mutagenicidad de carbamatos se ha explorado utilizando una variedad de ensayos. En general, la evidencia sugiere que los carbamatos no son mutagénicos. Ha sido reportado mutagenicidad débil en el test de Ames para aminocarb, carbaril, carbofurano y etiofencarb y en cultivos celulares de roedores para aminocarb, carbaril, carbofurano, formetanato y mecarbam, aunque en el mismo trabajo se reporta actividad mutagénica para aldicarb en *S. typhimurium*, tiodicarb en *Saccharomyces cerevisiae* y carbaril en fibroblastos humanos *in vitro* (Rose y col., 1999). En ensayos *in vivo* con ratones a los que se administró con el alimento carbofurano, etiofencarb, formetanato y propoxur se observó un aumento en la frecuencia de AC en los eritrocitos de médula ósea (Rose y col., 1999).

#### **1.1.4.1.4. Nuevos Insecticidas Químicos**

Lo primordial para los nuevos insecticidas lanzados al mercado, es que deben ser muy activos contra los insectos económicamente más importantes con el fin de ser comercialmente viables y al mismo tiempo deben demostrar un alto margen de seguridad para el medio ambiente, personas y animales. Estos agroquímicos, a menudo, presentan nuevos modos de acción,

demuestran mínimo riesgo para el desarrollo de resistencia de los insectos o resistencia cruzada a otros insecticidas, tienden a ser baratos para su producción y comercialmente competitivos en un mercado cambiante que incluye enfoques tales como la tecnología de plantas transgénicas. En este grupo de químicos encontramos spinosyns, insecticidas cloronicotínico, fipronil y análogos de hormonas juveniles.

- *Insecticidas Cloronicotínico*

Uno de estos productos naturales con actividad insecticida es la nicotina, extraído de la planta del tabaco, *Nicotiana tabacum*. A pesar que sus propiedades insecticidas se conocen desde hace décadas, el desarrollo comercial de este compuesto fue menor debido a su alta toxicidad en mamíferos y actividad insecticida relativamente baja.

Nithiazine es un compuesto heterocíclico, de estructura química similar a la nicotina y que actúa en el mismo receptor. A diferencia de la nicotina, es altamente activo contra los insectos, con muy baja de toxicidad para los mamíferos y por lo tanto sirvió de base para una nueva clase de productos: los insecticidas cloronicotínico (por ej. imidacloprid). Debido a su acción planta-sistémico, se usan en el tratamiento de semillas y plántulas en cultivos hortícolas de la provincia de Santa Fe.

- *Insecticidas Bioracionales*

Los insecticidas bioracionales se caracterizan por tener una acción particular en cada insecto. Interfieren en procesos biológicos propios del insecto como por ejemplo: mudas de larvas, crecimiento, apareamiento de insectos, puesta de huevos, además pueden alterar la reproducción, la alimentación del insecto o la detección olfativa. Entre estos insecticidas se encuentran numerosos aceites derivados de productos refinados del petróleo, productos de origen botánico (piretro, extractos de ajo, de ají, aceites esenciales), de origen microbiano (bacterias, hongos, nematodos, virus), minerales (derivados arsenicales, del azufre, del flúor), jabones, hormonas reguladoras del crecimiento (hormona juvenil) y feromonas.

Un ejemplo muy conocido es el de la abamectina, obtenida por fermentación de *Streptomyces avermectilis*, que tiene un uso adicional como acaricida.

Otro grupo importante son los inhibidores de la formación de quitina ó exoesqueleto del insecto, por lo que las larvas de los insectos no pueden desarrollarse y mudar. Otros productos evitan la eclosión de los huevos y si alguno llega a buen fin, las larvas recién emergidas sucumben al poco tiempo. Dentro de este grupo se encuentran las benzoilureas, como el



diflubenzurón, clorfluazurón, flufenozurón, hexaflumurón entre otros. También pueden considerarse como insecticidas bioracionales a las feromonas.

#### **1.1.4.2. Fungicidas**

Los hongos que subsisten a expensas de organismos vegetales pueden reducir considerablemente los rendimientos agrícolas. En contraste con los daños por insectos y malas hierbas, las enfermedades causadas por hongos son prácticamente imposibles de controlar sin aplicaciones de productos químicos. Los fungicidas son productos fitosanitarios que actúan sobre hongos patógenos, capaces de producir enfermedades criptogámicas.

Los hongos proliferan en esporas que generalmente se desarrollan luego de una etapa de hibernación ó latencia; por lo tanto están preparados para resistir condiciones climáticas muy adversas. Suelen ser transportadas por diferentes vectores a grandes distancias desde donde se originaron, esto hace que su control y erradicación sea difícil.

La aplicación de un fungicida puede hacerse:

- ✓ directamente al suelo para el control de hongos que parasitan órganos subterráneos y/o semillas en germinación;
- ✓ sobre las semillas previo a la siembra para controlar los hongos presentes en el suelo y
- ✓ en las plantas, para controlar enfermedades que afecten a tallos, hojas, flores y frutos.

Los fungicidas aplicados en forma preventiva o curativa actúan por contacto o por acción sistémica. Puesto que los fungicidas actúan sobre las funciones vitales de los hongos se los puede clasificar como:

- *Fungicidas que actúan como tóxicos generales*

A este grupo pertenecen el Azufre elemental (utilizado en fruticultura); las ftalamidas, que reaccionan con grupos -tiol desnaturalizando proteínas y provocando la muerte del hongo; los fungicidas a base de Cobre, que penetran en la espora alterando el metabolismo, sustituyendo metales de metaloenzimas e inactivándolas y los DTC como el nabam (sal sódica), maneb (complejo de manganeso), y zineb (complejos con zinc), entre otros.

- *Fungicidas que actúan sobre la respiración*

Actúan a nivel mitocondrial en la cadena de transporte de electrones, como las carboxamidas y las estrobilurinas. Son muy importantes en fruti-horticultura. Se incluyen aquí los dinitrofenoles que desacoplan la fosforilación oxidativa.

- *Fungicidas que actúan sobre la división celular, la síntesis de ácidos nucleicos y la biosíntesis de proteínas*

En este grupo se encuentran:

- ✓ Los imidazoles que alteran la biosíntesis de tubulina impidiendo la división celular;
- ✓ Los fenilcarbamatos que actúan de igual manera, y
- ✓ Los benzimidazoles, que tienen una mayor selectividad.

- *Fungicidas que actúan sobre la integridad de la pared celular*

Estos productos alteran la biosíntesis de esteroides, impidiendo que los hongos crezcan por alteración de la permeabilidad de la membrana. Suelen actuar en las últimas etapas y son muy selectivos. A este grupo también pertenecen los imidazoles, las pirimidinas complejas, las piperazinas, las morfolininas y las guanidinas que tienen carácter surfactante, que son moléculas que pueden repartirse en una interfase agua-lípido y consiguen generar una emulsión alterando la integridad de la membrana afectando su selectividad.

- *Fungicidas sin un mecanismo de acción definido*

Las dicarboximidinas, tienen mucha importancia en fruticultura, dado que controlan el crecimiento de un hongo endófito, el *Botrytis cinerea*.

La mayoría de los fungicidas tienen limitados efectos crónicos, muchos de los cuales se observan sólo a las dosis más altas que se pueden administrar. Ejemplo de ellos fueron las intoxicaciones alimentarias con granos de cereales tratados con fungicidas en Turquía en los años 1955-59 y en Irak en 1972 (Rose y col., 1999).

En los cultivos hortícolas regionales los fungicidas más empleados son los DTC (tiram, mancozeb, maneb, zineb, ferbam y metamsodium), cuya actividad se atribuye a la producción de un radical isotiocianato ( $-N = C = S$ ), que inactiva a grupos SH en los aminoácidos contenidos en los esporos. Para estos fungicidas los principales problemas de su uso son las interacciones con el alcohol, los efectos antitiroideos y el potencial teratogénico y carcinogénico.

La exposición ocupacional a muchos DTC puede dar lugar a irritación de la piel, inflamación de nariz y garganta, dolor de cabeza, fatiga, náuseas y en casos extremos, convulsiones y pérdida del conocimiento. También se han observado alteraciones en la función hepática, anemia moderada, y otros cambios en la sangre.

Zineb y su formulado Azurro, utilizado en Argentina, fue extensamente estudiado utilizando distintos puntos finales de evaluación genotóxica en linfocitos humanos (Soloneski y col., 2001, 2002a) y en células de ovario de hámster chino (CHO) (Gonzalez y col., 2003, Soloneski y col., 2002b, 2003), sugiriendo la existencia de lesiones en el material genético de las células evaluadas.

Los efectos antitiroideos (reducen la absorción de yodo radiactivo y causan hipertrofia tiroidea) fueron observados a pequeñas dosis de DTC administrados a los animales de experimentación. El maneb, zineb y mancozeb, dan como resultado la supresión de la síntesis de la tiroxina, lo que lleva a desequilibrios hormonales, dando lugar a potenciales respuestas cancerígenas. Los estudios en animales indican que maneb, zineb, mancozeb, y disulfiram, producen efectos reproductivos adversos que incluyen infertilidad, muerte fetal temprana y desarrollo anormal de ojos, oídos, pared abdominal, SNC y sistema musculo-esquelético (Rose y col., 1999).

#### **1.1.4.3. Herbicidas**

Los herbicidas son productos fitosanitarios utilizados para controlar especies vegetales, no deseadas por su impacto negativo en la producción y rendimientos. Aunque de una manera más amplia, también es definido como cualquier compuesto que tiene la capacidad de matar o lesionar gravemente plantas, y puede utilizarse para eliminación del crecimiento de plantas o matar parte de plantas.

Los herbicidas son el grupo de fitosanitarios con mayor crecimiento en su uso, fundamentalmente debido a las nuevas técnicas agrícolas: los monocultivos, la no rotación de cultivos y la mecanización.

Los herbicidas pueden ser clasificados por su estructura química, por su aplicación (cómo y cuándo se aplica), según su mecanismo de acción, su selectividad y su residualidad. También pueden ser preemergentes o postemergentes; sistémicos o de contacto. Cabe señalar que un mismo herbicida, puede estar incluido en distintas categorías de clasificación.

Los herbicidas selectivos son aquellos que se utilizan para matar las malezas sin dañar el cultivo. La selectividad se puede obtener como resultado de diferencias en el metabolismo, en el modo de acción, en el momento y/o modo de aplicación. El reciente desarrollo de cultivos resistentes a los herbicidas a través de la tecnología transgénica permite que los herbicidas no selectivos sean utilizados como tóxicos selectivos.

De acuerdo a la forma en que se aplican a las plantas o al suelo, existen herbicidas de contacto que son los que afectan a la porción de la planta tratada con el producto, y herbicidas de suelo que se absorben por las raíces para luego distribuirse a los diferentes tejidos del vegetal. Estos productos también pueden ser agrupados considerando sus efectos bioquímicos y fisiológicos, teniendo sitios blanco específicos como son la fotosíntesis y la respiración, la regulación del crecimiento y la inhibición de las vías bioquímicas específicas (aminoácidos, carotenoides, lípidos). La mayoría de los recientes avances en la química de los herbicidas se han dirigido a enzimas específicas de la planta.

Más de 200 ingredientes activos se utilizan como herbicidas en todo el mundo. En Argentina, más del 77% del peso total de los ingredientes activos son herbicidas (CASAFE, 2010), en tanto en Estados Unidos es más del 54%.

Si bien los herbicidas pueden ser menos tóxicos que otros pesticidas, los modelos agrotécnicos de uso masivo y su uso combinado con otros agroquímicos, hacen que sea importante entender aspectos de los efectos crónicos sobre la salud que puedan relacionarse con estos productos químicos de uso creciente. En forma breve describiremos algunos que se emplean en cultivos de la región.

#### **1.1.4.3.1. Herbicidas clorofenoxi**

Los herbicidas clorofenoxi, como 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA y silvex, son reguladores del crecimiento. Actúan como auxinas sintéticas u hormonas de crecimiento, alterando el metabolismo de la planta y posterior crecimiento. La selectividad de estos compuestos es el resultado de las diferencias inherentes entre las respuestas de los sistemas enzimáticos de cultivos y de malezas.

El cuadro de intoxicación aguda por estos compuestos es multisistémico, producen efectos sobre el SNC y periférico, el aparato digestivo, el sistema respiratorio y renal, los músculos esqueléticos y la piel.

La exposición crónica de humanos a estos herbicidas, se caracteriza principalmente por la presencia de cloracné aunque se han descripto otros signos deletéreos como trastornos neurológicos, incluyendo cambios en la personalidad, trastornos del sueño, pérdida de energía, problemas de visión, diferencias en el sabor y en la coordinación muscular. Estas acciones se deberían fundamentalmente a la presencia de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), como un contaminante que se genera durante la producción. Algunos casos de trastornos

neurrológicos también han sido reportados entre los trabajadores expuestos al 2,4-D (Ecobichon, 2005).

La genotoxicidad del 2,4-D y su formulado la sal dimetilamina de 2,4-D que se utiliza en Argentina, fue evaluada en células CHO (González y col., 2005) y en linfocitos humanos *in vitro* utilizando los test de intercambio de cromátides hermanas (ICH), progresión del ciclo celular e índice mitótico, concluyendo que inducen daño citogenético en las condiciones del cultivo (González y col., 2005; Soloneski y col., 2007).

#### **1.1.4.3.2. Herbicidas Bipiridilos o Bipiridilicos**

En este grupo se incluyen paraquat, diquat y difenzoquat. Son selectivos y de aplicación por contacto después del brote. Las plantas tratadas rápidamente mantienen una apariencia congelada debido a la destrucción de la membrana celular. El resultado es el marchitamiento y la desecación rápida seguida de caída de las hojas.

El mecanismo de la toxicidad del paraquat y del diquat implica la producción de radical superóxido en respuesta a la oxido-reducción cíclica del compuesto en los tejidos, siendo similar el mecanismo de toxicidad tanto en plantas como animales.

Los estudios que examinan el potencial mutagénico de paraquat y diquat utilizando el test de Ames han arrojado datos negativos. Sin embargo, el paraquat produce aumento de AC en *Allium fistulosum* y *Hordeum vulgare*, conversión génica en *Saccharomyces cerevisiae*, reparación del ADN en *Salmonella typhimurium* y mutaciones génicas en *Aspergillus nidulans*. Estos resultados sugieren que estos compuestos son clastógenos pero no mutágenos no existiendo informes de formación de tumores ni efectos reproductivos o teratogénicos en animales o humanos (Rose y col., 1999).

#### **1.1.4.3.3. Triazinas**

La triazina y los productos triazol incluyen herbicidas, fungicidas e insecticidas. Algunos de los más comúnmente utilizados son los herbicidas atrazina, simazina, metribuzin, cianazina y propazine. Estos productos son inhibidores potentes de la fotosíntesis y se utilizan principalmente como herbicidas pre y post-emergentes.

Las pruebas de toxicidad crónica de estos herbicidas indican que en general hay pocos efectos adversos.

Numerosos estudios de reproducción y mutagénesis se han llevado a cabo en varios de estos herbicidas siendo generalmente negativos. Sin embargo, la atrazina demostró producir tumores

mamarios en ratones y ratas Sprague-Dawley al igual que la simazina, en dosis de 100 ppm. En base a estos resultados, la atrazina ha sido clasificada por la U.S. EPA como un cancerígeno de clase 2 B (Rose y col., 1999). En humanos la atrazina y compuestos relacionados han generado dermatitis y quemaduras de moderada a severa en ojos.

#### **1.1.4.3.4. Glifosato**

El glifosato es un herbicida que controla malezas anuales y perennes, gramíneas y latifoliadas. Se aplica en post-emergencia ya que ingresa a la planta por el follaje y se mueve por xilema y floema. Este herbicida sólo es selectivo de cultivos transgénicos (soja RR y maíz RR) que poseen una enzima EPSP sintasa que no es inhibida por el glifosato. En estos casos se puede emplear en cualquier etapa de crecimiento de estos cultivos.

El glifosato es un ácido orgánico débil que consiste en una glicina y un resto fosfometil. La fórmula empírica es  $C_3H_8NO_5P$  y su nombre químico es N-(fosfometil) glicina según la nomenclatura de la IUPAC.

Es usualmente formulado como una sal del ácido de glifosato desprotonada y un catión, por ejemplo, isopropilamina o trimetilsulfonio, con una pureza para el glifosato grado técnico generalmente superior al 90%.

En animales de experimentación, el glifosato técnico posee una toxicidad aguda muy baja por vía oral y dérmica. Siendo considerablemente más tóxico por vía intraperitoneal. Se han realizado estudios a corto plazo en distintas especies animales utilizando la alimentación como ruta de ingreso, pero se observaron escasos efectos en la mayoría de las pruebas. La toxicidad a largo plazo se ha estudiado en ratones y ratas y los pocos efectos observados se produjeron a dosis relativamente altas (20000-30000 mg/kg). Los estudios disponibles no indican que el glifosato técnico es mutagénico, carcinogénico o teratogénico (Arregui y col, 2010).

Williams y col., (2000) realizaron una revisión general sobre datos de efectos deletéreos de la formulación Roundup®, el surfactante POEA (polioxietil amina), el principio activo glifosato y su metabolito principal AMPA (ácido aminometilfosfónico), reportando que no existe evidencia convincente de daño directo al ADN *in vitro* o *in vivo* y que los estudios realizados no pudieron demostrar ningún potencial tumorigénico para glifosato por lo que no se considera carcinogénico. Tampoco se encontraron datos de efectos teratogénico o embriotóxico para POEA, AMPA o glifosato. Estos autores concluyeron que ni el Roundup® ni ninguno de sus

componentes produce mutaciones somáticas o hereditarias en humanos y que, bajo las condiciones esperadas de uso, no poseen riesgo alguno para los seres humanos.

Sin embargo otro grupo de autores encuentran resultados positivos en estudios *in vitro* para glifosato (Monroy y col., 2005), la formulación comercial a base de glifosato (Siviková y Dianovsky, 2006) y el principal metabolito del glifosato, AMPA (Mañas y col., 2009b) así como en estudios *in vivo* (Piésova 2005; Mañas y col., 2009a). Mladinic y col. (2009) evaluaron la genotoxicidad y el potencial oxidativo del glifosato en linfocitos humanos *in vitro* a concentraciones probables en exposiciones laborales y residenciales (0,50-580 µg/ml), observando un incremento en el daño al ADN a la concentración más alta pero concluyeron que, debido a la falta de una relación dosis-respuesta, el glifosato no representaría un riesgo significativo para la salud a concentraciones relevantes para exposición humana.

De los estudios sobre población humana se destaca la investigación de Bolognesi y col., (2009), quienes realizaron un monitoreo citogenético utilizando como biomarcador la frecuencia de MN. Estudiaron cinco regiones de Colombia caracterizadas por el uso de glifosato como único pesticida y una sexta región donde se empleaban otros pesticidas diferentes. Las mujeres en edad reproductiva (137 personas de 15 a 49 años de edad) y sus cónyuges (137 personas) fueron entrevistados para obtener datos sobre el estado actual de salud, historia clínica, estilo de vida, incluyendo exposición ocupacional a pesticidas actuales y pasadas, factores que pueden estar asociados con un aumento de frecuencia de MN. En general, los datos sugieren que el daño y el riesgo genotóxico asociado a la aspersión de glifosato para el control de los cultivos ilícitos (coca y amapola) evaluados a través de MN es pequeño y parece ser transitorio.

### **1.1.5. La problemática de las mezclas de plaguicidas**

Como hemos planteado en el punto 1.2. al referirnos a los cambios agrícolas y técnicos en las prácticas agrotécnicas tanto de cultivos intensivos como extensivos de nuestra región, es frecuente la aplicación de fitosanitarios en mezclas y su aplicación en forma secuenciada en cortos periodos. Este hecho nos obliga a considerar algunos aspectos relevantes de la problemática de las mezclas.

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos de las sustancias químicas en los sistemas biológicos se lleva a cabo en un producto químico, a un tiempo. Sin embargo, en el mundo real las personas están expuestas a mezclas, no a productos químicos únicos. Aunque varias

sustancias pueden tener acciones totalmente independientes, en muchos casos dos sustancias pueden actuar en un mismo sitio o blanco, de manera que pueden ser aditivas o no.

Muchas interacciones más complejas se pueden producir si dos sustancias químicas actúan sobre objetivos diferentes pero relacionados entre sí. En el caso extremo, puede haber efectos sinérgicos, en cuyo caso los efectos de dos sustancias juntas son mayores que la suma de cualquiera de estos efectos individuales. En realidad, la mayoría de las personas están expuestas a muchas sustancias químicas, no sólo a una o dos, y por lo tanto los efectos de una mezcla química es extremadamente complejo y pueden diferir de mezcla en mezcla en función de su composición química. Esta complejidad es uno de los mayores desafíos para la Toxicología.

Calabrese en 1990 expresa: *"Sin embargo una inquietud importante en nuestro programa global de evaluación es que cada agente se prueba por separado y los juicios sobre su aceptación se hacen sobre esa base. Desafortunadamente los seres humanos no están expuestos como lo fueron ratones y ratas experimentales, a un solo agente, sino a toda una gama de agentes químicos y de hecho a un mar de niveles generalmente bajos de agentes químicos. El problema para la salud humana, por lo tanto, no es sólo la probabilidad de que un agente simple cause efectos adversos a la salud, sino también cómo nuestras pruebas y sistemas predictivos traten la realidad de la exposición a las mezclas complejas en el mar de toxinas ambientales"*.

En los últimos 15 años, varios estudios con mezclas químicas (por ejemplo, sustancias químicas hormonalmente activas o plaguicidas) en concentraciones cerca o por debajo de la concentración sin efectos observados (NOEC o NOAEC) han informado respuestas biológicas potencialmente perjudiciales (Cavieres y col., 2002; Rajapakse y col., 2001; Welshons y col., 2003). Es evidente que el interés y la investigación sobre las mezclas químicas se ha intensificado en la última década, como lo demuestran varios artículos de revisión (Carpenter y col., 2002; Feron y col., 2002).

Aunque ni el concepto de interacción química ni las leyes en materia de mezclas son nuevos, el actual interés y la atención sobre las mezclas sí lo son. El enfoque en las interacciones químicas, sobre todo en concentraciones ambientales relevantes, es un paso importante para avanzar en nuestra comprensión del impacto de las mezclas sobre salud humana y ambiente.

Hay tres tipos de interacciones entre los componentes de la una mezcla que pueden afectar la respuesta de la muestra completa:



1. Interacciones agente-agente, que se producen antes de cruzar las barreras de un organismo, tal como sucede con los hidrocarburos atmosféricos y el óxido de nitrógeno en presencia de radiación ultravioleta para producir el ozono troposférico.
2. Interacciones toxicocinéticas, que se producen una vez que los componentes de la mezcla han cruzado las barreras de un organismo y que puede realzar o inhibir la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de uno o más componentes de la mezcla.
3. Interacciones toxicodinámicas, como resultado de la exposición a los constituyentes de la mezcla, sus metabolitos o productos de reacción que pueden alterar los mecanismos de daño, de reparación, de compensación o de señal (U.S. EPA, 2000; Thomas y col., 2002).

El efecto de las interacciones (o su ausencia) entre los componentes de la mezcla sobre las relaciones dosis-respuesta de toxicidad empíricamente observables se pueden dividir en cuatro grandes categorías: independencia, dosis-adición, sinergismo y antagonismo (Hertzberg y Teuschler 2002, U.S. EPA 2003).

Si los agentes de la mezcla actúan en forma independiente (es decir, que no están relacionadas de alguna manera), la toxicidad de la mezcla es cualitativamente y cuantitativamente equivalente a los distintos efectos separados (esencialmente "aditividad de respuesta").

Si los componentes de la mezcla no actúan de forma independiente (por ejemplo, tienen un mecanismo similar de acción tóxica), pero no se producen interacciones significativas, entonces la dosis toxicológicamente relevante es equivalente a la suma de las dosis de los componentes. Esta situación se conoce como "adición de dosis" o "dosis-aditiva."

Cuando el efecto tóxico de la mezcla es mayor que el esperado por la suma de las dosis de constituyentes, significa que los efectos combinados de dosis son más que aditivos: se dice que la interacción es sinérgica.

Por el contrario, cuando el efecto tóxico de la mezcla es menor que la esperada bajo el supuesto de aditividad de dosis, las interacciones se dice que son antagónicas.

Las interacciones toxicocinéticas se producen cuando un factor afecta el transporte o el metabolismo de una sustancia química ambiental de una manera tal que modifica el perfil de concentración y el tiempo de su metabolito activo final a nivel del de acción en el organismo provocando algún efecto adverso (por ejemplo inhibición o inducción de los sistemas de transporte activo o los sistemas de biotransformación). Las principales formas por la que la exposición a una sustancia química puede cambiar el metabolismo de otro agente se deriva de la cinética molecular simple de Michaelis-Menten.

El otro enfoque que integra los efectos de mezclas químicas es el biomonitorio. Las exposiciones a mezclas de plaguicidas OFs fueron estudiadas y evaluadas en diferentes ocasiones (McCauley y col., 2006). Sin embargo, la capacidad de realizar estudios epidemiológicos en poblaciones de trabajadores agrícolas se ve limitada por el acceso a los servicios de salud (dispensarios, hospitales) y la naturaleza de la mano de obra por lo general transitoria y migrante.

Los marcadores biológicos ofrecen oportunidades para evaluar los efectos sobre la salud en las poblaciones de trabajadores agrícolas que no dependen de programas o registros de salud. Los estudios centrados en los fluidos biológicos y mecanismos de acción así como la incorporación del estudio de posibles interacciones genético-ambientales son cada vez más comunes.

La evaluación de exposición a plaguicidas se ve actualmente obstaculizada por tres problemas relacionados entre sí:

- a) Se sabe relativamente poco sobre la magnitud, duración, frecuencia y tiempo de exposición acumulada a importantes mezclas de agroquímicos en el ambiente.
- b) Existe escasa evidencia disponible acerca de si los efectos relacionados con la mezcla de agroquímicos son antagónicos, sinérgicos o aditivos en los niveles de exposición a que se encuentra habitualmente la población.
- c) Hay un conocimiento insuficiente y una inadecuada comprensión sobre los mecanismos interactivos de toxicidad que se producen entre los componentes de la mezcla.

En el corto plazo, la evaluación cuantitativa de efectos acumulativos de las mezclas depende no sólo de la investigación focalizada, sino también del desarrollo de métodos científicos y de procedimientos, que sean aplicables a los datos existentes de exposición y efecto, con el fin de caracterizar, con un grado aceptable de precisión, los riesgos de salud relacionados con la mezcla.

Según Sexton y Hattis (2006) esto implica, inevitablemente, decisiones de política científica sobre la mejor manera de cerrar la brecha entre la escasez de evidencias científicas consistentes y la necesidad de estimar los daños acumulativos como parte integrante de las decisiones de la gestión de riesgos.

Por lo tanto, para ser relevante, la evaluación del riesgo acumulativo debe proporcionar orientación sobre las innumerables mezclas, que ya son parte de nuestro día a día y representan riesgos importantes para la salud. Donde, "importante" significa que hay una probabilidad razonable de que efectos combinados de los componentes de la mezcla, en los

niveles de exposición reales, pueden constituir un riesgo grave para la salud, que no puede ser adecuadamente explicado por los métodos tradicionales de evaluación del riesgo.

### **1.1.6. Biomonitoreos y biomarcadores**

En la medicina ocupacional y clínica, el biomonitoreo puede ser utilizado como una herramienta de vigilancia para ayudar a interpretar un problema clínico o para evaluar y controlar una determinada exposición.

A pesar del valor potencial del monitoreo biológico, enormes desafíos encierran su uso:

- ✓ la capacidad del investigador para diseñarlos,
- ✓ la interpretación de sus datos y que significan para la salud pública,
- ✓ los usos éticos de esos datos y
- ✓ como comunicar los resultados a los participantes del estudio, a los responsables políticos y al público en general (Burke, 2006).

Así como se incrementa el número de biomonitoreos, también aumenta el número de sujetos y productos químicos evaluados y por lo tanto se genera la necesidad de una depuración de los usos apropiados y de la interpretación correcta de los datos. El público en general y los funcionarios de salud pública deben conocer el significado y las limitaciones de los datos obtenidos, lo que a menudo se llama interpretación de los resultados. Los datos de los biomonitoreos pueden ser interpretados a través de dos enfoques: *descriptivos o basados en el riesgo*.

Los enfoques *descriptivos* presentan una revisión estadística de los datos que relacionan una determinada población con una población comparable o de referencia.

Los *enfoques basados en los riesgos* son mucho más estrictos en la interpretación de los datos y pueden utilizarse orientaciones toxicológicas, epidemiológicas o de modelado matemático, para relacionar los datos del biomonitoreo. Los enfoques basados en los riesgos potenciales, pueden ofrecer mejor información sobre los efectos de salud relacionados con el control biológico de datos. Sin embargo, para la mayoría de los productos químicos que pueden ser medidos en el cuerpo humano, los datos disponibles son insuficientes para evaluar los riesgos sobre la base de concentraciones internas solamente (Burke, 2006).

A los fines de ser útiles en epidemiología, estos eventos mensurables deberían representar solo un cambio subclínico. Un marcador no es un ensayo de valor diagnóstico, sino un indicador de la ocurrencia de un cambio temprano que podría llevar más tarde a una enfermedad con

expresión clínica. En especial, para su uso en medicina preventiva este cambio debería ser totalmente reversible (Grandjean, 1995).

El término “biomarcador” se utiliza en un sentido amplio para designar cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo de un organismo vivo o en sus productos y refleja una interacción entre este organismo y un agente determinado, que puede ser químico, físico o biológico (IPCS, 1993).

Para que los biomarcadores puedan contribuir en una evaluación, ya sea a nivel ambiental o de la salud laboral, deben ser relevantes y válidos. La relevancia se refiere a la fortaleza de los biomarcadores para proporcionar información sobre cuestiones de interés e importancia para aquellos que toman decisiones: las autoridades de salud pública y de medio ambiente. El uso de biomarcadores relevantes permite responder a importantes cuestiones de salud pública, además de aportar información útil que no puede ser obtenida por otros métodos, tales como cuestionarios, mediciones ambientales o revisiones de registros (Muscat, 1996).

La segunda característica de los biomarcadores potencialmente útiles es la validez, la cual ha sido ampliamente discutida por distintos investigadores (Hernberg y Aitio, 1987; Schatzkin y col., 1990; Schulte y Perera, 1993; Boffetta, 1995; Bernard, 1995; Dor y col., 1999). Incluye tanto aspectos epidemiológicos como de laboratorio y se refiere a una serie de características que son la mejor aproximación de la verdad o falsedad de un biomarcador, o sea que más que un estado de "todo o nada", es un sentido de grado. La validez de un biomarcador es función de las cualidades intrínsecas de los biomarcadores y las características de los procedimientos analíticos (Dor y col., 1999).

En la validación deben participar tanto los analistas de laboratorio, epidemiólogos, clínicos así como también los estadísticos. Al abordar los obstáculos para la validación en los aspectos relacionados a factores sociales, una gama aún más amplia de disciplinas, tales como la ética, la legislación y la economía deben participar.

Considerando entonces a un biomarcador como una alteración inducida por un xenobiótico en componentes o procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicas, que es susceptible de medición en un sistema o muestra biológica, podemos clasificar a grandes rasgos a los biomarcadores en tres grupos: marcadores de exposición, efecto y susceptibilidad (Casarett y Doull, 2005).

La presencia de una sustancia xenobiótica o de sus metabolitos, o el producto de una interacción entre un xenobiótico y alguna de las moléculas o célula blanco que se mide dentro de un compartimiento de un organismo, puede clasificarse como un *biomarcador de exposición*.

Los *biomarcadores de efecto* se definen como cualquier alteración bioquímica, fisiológica o de otro tipo dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede reconocerse como un deterioro de la salud o enfermedad establecida o potencial. Mientras que los *biomarcadores de susceptibilidad* sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos.

Un biomarcador ideal tiene que cumplir con al menos algunas de las siguientes características:

1. alta especificidad por el efecto de interés
  2. reflejar un efecto temprano
  3. que su análisis sea simple y económico
  4. que las metodologías de muestreo sean lo menos invasivas posibles
  5. el nivel basal sea bajo en el fluido biológico de interés
  6. tenga una bien establecida relación entre la respuesta del biomarcador y la exposición
  7. evidente relación entre la respuesta del biomarcador y el daño inducido por la exposición
- (De Zwart y col., 1999).

Para mejorar la confiabilidad de los diseños de estudios epidemiológicos sobre poblaciones, se encuentran en desarrollo nuevas técnicas biológicas y genéticas que representan una promesa para el estudio de efectos en la salud relacionados con la exposición crónica a xenobióticos (ej. metales, plaguicidas, solventes, etc.) a bajos niveles ambientales.

Estas nuevas técnicas incluyen principalmente tres áreas: los marcadores de daño o reparación del ADN, los indicadores de estrés oxidativo y los marcadores de los cambios en la expresión de genes relacionados con la exposición a los pesticidas (Bolognesi 2003; Toraason y col., 2004). Muchos de estos biomarcadores se encuentran en estado de desarrollo, no se han utilizado aún en poblaciones rurales y para algunos faltan evidencias de asociación entre el biomarcador y los daños específicos a la salud. No obstante, proporcionan un interesante potencial para aumentar la comprensión de los mecanismos biológicos asociados con los resultados sobre la salud que se han asociado con la exposición a plaguicidas en múltiples investigaciones epidemiológicas.

En el presente trabajo de Tesis, se han seleccionado un grupo de ensayos que evalúan estrés oxidativo y genotoxicidad como biomarcadores de efecto de la exposición crónica a plaguicidas, junto con clásicos biomarcadores utilizados para evaluar a poblaciones expuestas en forma laboral a mezclas de pesticidas, como son las enzimas colinesterasas, que se han considerado sustitutas de exposición crónica a plaguicidas (Hernández y col., 2005).

#### **1.1.6.1. Biomarcadores sustitutos de exposición a organofosforados y metilcarbamatos**

La Ac es un neurotransmisor (que se almacena en las vesículas de la terminación nerviosa presináptica) que cuando llega un impulso nervioso es liberada en la membrana postsináptica aumentando la permeabilidad de la entrada de iones sodio a través de la membrana. Como resultado de la despolarización, el interior de la membrana es cada vez más positivo y el exterior es más negativo. Este proceso puede propagar un potencial de acción a lo largo de una fibra nerviosa, o puede dar lugar a la contracción del músculo. La Ac es rápidamente destruida por la AChE presente en la lámina basal de la unión neuromuscular. Si la Ac no se destruye, como es el caso de la inhibición de la AChE por la presencia de los insecticidas OF o MC, la transmisión de los impulsos se hace constante, produciendo los síntomas de la intoxicación aguda característicos de estos insecticidas, o sea los síndromes muscarínicos (aumentan las secreciones, babeo, sialorrea, meiosis puntiforme), nicotínicos (actúa sobre musculo liso, parálisis respiratoria) y neurológicos (parálisis respiratoria a nivel central, paro cardiaco) (Bhagavan, 2001).

Para monitorear los efectos biológicos de estos plaguicidas, las mediciones de la actividad de butirilcolinesterasa plasmática (BChE) y de AChE eritrocitaria se han utilizado desde hace años en los casos de intoxicación aguda y en la vigilancia de trabajadores con alto riesgo de exposición (Cocker y col, 2002). Por lo tanto, la medición de ambas enzimas se ha recomendado en toxicología clínica y para el seguimiento de las actividades ocupacionales de alto riesgo (Heath y Vale, 1992; HSE, 2000; Cocker y col, 2002). Ambas enzimas se encuentran en cerebro, musculo y sangre, mientras que en el plasma solo se halla BChE y en los eritrocitos solo AChE

##### **1.1.6.1.1. Actividad de la enzima Butirilcolinesterasa**

La medición de la actividad de BChE plasmática (EC 3.1.1.8) o pseudocolinesterasa está ampliamente disponible en laboratorios clínicos debido a que constituye un índice de función hepática. La medición de la actividad de BChE además es un biomarcador común de

exposición en pulverizadores de pesticidas, metodológicamente simple de ensayar aunque su inhibición no está necesariamente asociada con síntomas de toxicidad por anticolinérgicos.

#### **1.1.6.1.2. Actividad de la enzima Acetilcolinesterasas**

La AChE eritrocitaria (EC 3.1.1.7) o colinesterasa verdadera está presente en los eritrocitos y en los terminales sinápticos del tejido nervioso y la determinación de su actividad ha sido el biomarcador de efecto más utilizado en las poblaciones de trabajadores agrícolas. Refiriéndose al grado de validación de la prueba, se lo considera como un biomarcador “*Gold Standard*”, lo que significa que es suficiente por sí mismo para demostrar exposición a OF (Casarett y Doull, 2005). La detección de inhibición de la AChE, como resultado de la exposición a plaguicidas OFs es obligatoria en los aplicadores de pesticidas que se encuentran bajo regímenes de las ART aunque este grupo es francamente minoritario en nuestro país.

El examen de la inhibición de la actividad de AChE como biomarcador tiene sus ventajas y desventajas. La depresión en la actividad de la colinesterasa se puede observar antes que los signos clínicos se manifiesten, lo que permite el reconocimiento temprano de los individuos y las operaciones de trabajo de alto riesgo (Wessels y col., 2003). Pero la interpretación de los resultados del seguimiento AChE se complica por la variación inter e intraindividual en la actividad enzimática y la influencia de los factores de confusión. Se requiere una exposición a altas dosis de plaguicidas OFs para que se produzca una inhibición significativa de la AChE, y por lo tanto, es más apropiado utilizarla como un indicador de la toxicidad a niveles de alta exposición en lugar de niveles bajos (He, 1999).

#### **1.1.6.2. Biomarcadores del estado oxidativo**

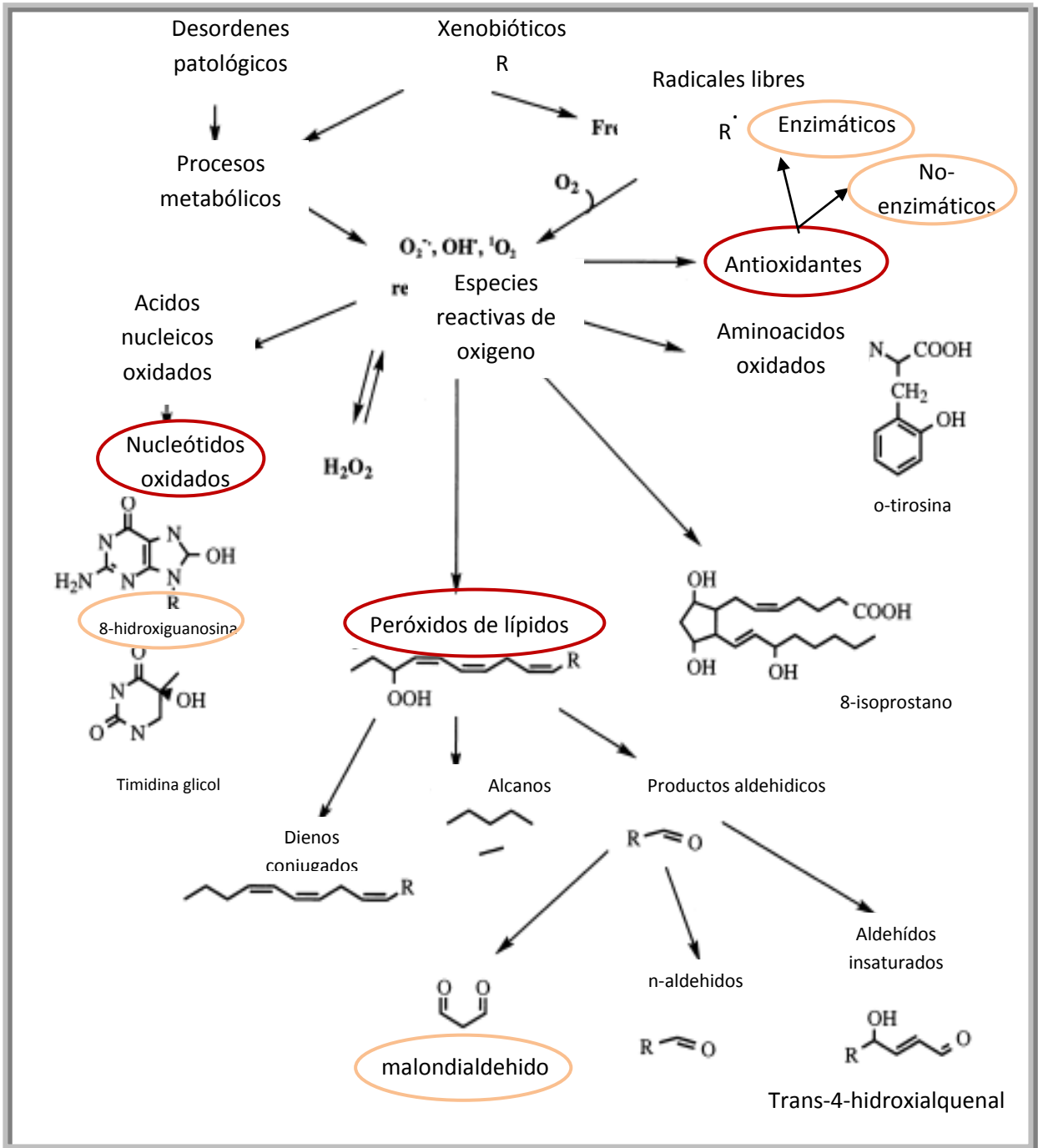
Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células, el cual es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad.

Los RL pueden actuar como oxidantes (robando un electrón) o como reductores (donando el electrón no apareado). Esta es una característica esencial, pues permite que los RL den reacciones en cadena, extendiéndose una reacción que en un principio es puntual (Castillo y col., 2003). Los RL derivados del oxígeno, representan la clase más importante de especies

radicales generadas por los sistemas vivos (Miller y col., 1990). Estas especies reactivas de oxígeno (EROs) pueden generarse por agentes del medio ambiente, así como también por fuentes endógenas del metabolismo celular. Dentro de las EROs se incluyen radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), aniones superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los cuales es sabido que son indispensables para mantener la homeostasis celular, para combatir las infecciones (Babior, 1978) y en los últimos años se ha evidenciado su papel en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento que están involucrados en la regulación proliferativa (Finkel, 1998; Ryter y Tyrrel, 1998). Sin embargo, si los niveles de moléculas oxidantes aumentan más que su contraparte de moléculas y sistemas enzimáticos antioxidantes, la célula se encuentra sometida a lo que se ha denominado estrés oxidativo (López Díaz-Guerrero y col., 2003).

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades. Por su alta inestabilidad atómica los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula (Rodríguez Perón, y col., 2001).





**Figura 1.14. Productos del daño de los radicales libres (Fuente: De Zwart y col, 1999).**

Como se observa en la Figura 1.14, los RL pueden reaccionar con diferentes macromoléculas tales como ADN, membranas celulares o proteínas, las que pueden conducir a muchos tipos de productos distintos. Los posibles caminos que se plantean evaluar para cuantificar la génesis de estrés oxidativo en humanos expuestos a mezclas de plaguicidas, se marcaron en rojo en la figura precedente.

### 1.1.6.2.1. Sistemas de defensas Antioxidantes

Las defensas antioxidantes están compuestas tanto por sistemas enzimáticos como no enzimáticos, que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo.

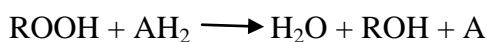
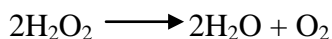
Halliwell y Gutteridge (1989) definen como antioxidante a toda sustancia que estando presente en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico.

Los antioxidantes llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL. Los más importantes miembros de las defensas antioxidantes enzimáticas son Superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPx) y Catalasa (CAT). Los no enzimáticos pueden a su vez clasificarse en endógenos y exógenos: ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutación (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros.

El daño oxidativo se cree que es un mecanismo importante del efecto nocivo de los plaguicidas OFs (Banerjee y col., 2001; Halliwell, 2002). Los plaguicidas en general pueden generar EROs y alterar los sistemas antioxidantes (Bagchi y col., 1995; Delescluse y col., 2001).

#### 1.1.6.2.1.1. Defensas Antioxidantes Enzimáticas: Actividad de Catalasa

CAT (EC 1.11.1.6) es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas más eficientes conocidas hasta el momento, tanto que no puede ser saturada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ninguna concentración (catalizando su conversión en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>) y para proteger a las células del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se genera en su interior con dadores de Hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, etc.), presenta actividad peroxidasa.



Por lo tanto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la CAT y otras peroxidasas. En los vertebrados, el peróxido de hidrógeno se detoxifica mediante las actividades de la enzimas CAT y GPx. Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las mismas.

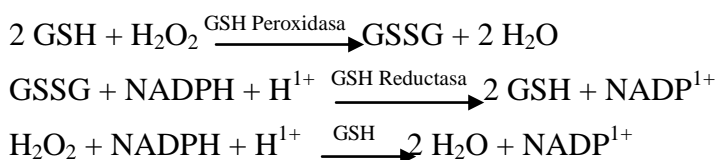
La CAT descompone el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y lo convierte en una de las principales especies reactivas de oxígeno, que en presencia de hierro u otros iones metálicos causa citotoxicidad.

#### 1.1.6.2.1.2. Defensas Antioxidantes No-Enzimáticas: Glutacion

El GSH (gamma-glutamilcisteinilglicina) es un tripéptido natural cuyas propiedades nucleofílicas y reductoras juegan un rol importante en las vías metabólicas así como en el sistema antioxidante de la mayoría de las células aeróbicas. GSH es necesario como una coenzima por una variedad de otras enzimas, incluyendo la GPx, Glutacion S-Transferasa (GST) y tiol transferasa, jugando un rol mayor en el metabolismo de drogas, calcio, el ciclo gamma-glutamil, y funciones en plaquetas y membranas celulares.

GSH es crucial en una variedad de procesos de la vida, incluyendo la detoxificación de xenobióticos, el mantenimiento de los niveles de -SH en proteínas, el intercambio tiol-disulfuro, la remoción de hidroperóxidos y RLs y el transporte a través de membranas de los aminoácidos.

Este sistema antioxidante está compuesto por GSH en conjunto con dos enzimas GPx y Glutacion Reductasa (GR). Ese sistema también cataliza la dismutación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno siendo que el glutacion opera en ciclos entre su forma oxidada (GSSG) y su forma reducida (GSH). El GSH reduce el peróxido de hidrógeno a agua en presencia de GPx formando un puente disulfuro y, en seguida, el GSH es regenerado.



En los eritrocitos humanos, aproximadamente el 99% del glutati6n existe en su forma reducida en condiciones fisiol6gicas normales (Bukowska, 2004).

Los estresores oxidativos, pueden disminuir el contenido de GSH y cambiar el balance dinámico entre GSH y su forma oxidada GSSG (Machado y col., 2008).

GSH mantiene el estado redox crítico de las proteínas sulfidrilas, que son necesarias en la reparaci6n y expresi6n del ADN. GSSG se acumula y la relaci6n GSH/GSSG es una buena medici6n del estr6s oxidativo de un organismo (Jones y col., 2000; Nogueira y col., 2004).

Se ha sugerido, que los pesticidas podrían generar un una disminuci6n de GSH y el correspondiente incremento de GSSG en eritrocitos (Bukowska, 2004). Por la tanto la relaci6n

GSH/GSSG podría ser un indicador del efecto pro-oxidante generado por la mezcla de pesticidas.

#### **1.1.6.2.2. Peroxidación de Lípidos: Medición de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico**

La peroxidación de lípidos es probablemente el proceso inducido por RL más investigado. La abundante presencia de fosfolípidos en los sitios donde los RL en general y más específicamente las EROs son formados, facilitan el acceso a sus blancos endógenos (De Zwart, 1999). Este mecanismo también se ha relacionado a los pesticidas, a través de la generación de EROs que podrían producir peroxidación lipídica (Halliwell, 2002; Marnett, 2000). El Malondialdehído (MDA), uno de los productos más abundante generado en la peroxidación, puede reaccionar con el ADN para formar aductos con desoxiguanosina, desoxiadenosina y desoxicitidina que son mutagénicos en células bacterianas y de mamíferos. La sensibilidad de la medición de las sustancias reactivas con el Acido Tiobarbitúrico (TBARS) lo ha hecho el ensayo de elección para el *screening* y monitoreo de la peroxidación lipídica, y además un indicador importante de estrés oxidativo. Las reacciones en cadena que ocurren durante la oxidación de los lípidos conducen a la formación de hidroperóxidos, los cuales se descomponen en muchos productos secundarios como aldehídos y cetonas. Dentro de los aldehídos formados se forma MDA. El ácido tiobarbitúrico (TBA) se une a MDA dando un compuesto coloreado que constituyen una medida indirecta de la lipoperoxidación de las membranas provocada por los RL. Sin embargo en la literatura, ha sido ampliamente discutida la especificidad del ensayo de TBARS respecto a los distintos compuestos del MDA, pero aún así, sigue siendo el ensayo más ampliamente usado para determinar peroxidación lipídica.

Como es el caso de la mayoría de estos marcadores biológicos de efecto, las posibles modificaciones oxidativas no se han asociado con OFs específicos y pueden ser inducidas por múltiples agentes. Sin embargo, ofrecen una instancia significativa en la comprensión del mecanismo de acción de estos agentes tóxicos para poder realizar comparaciones útiles de exposición y efectos potenciales sobre la salud de poblaciones expuestas a mezclas de pesticidas.

#### **1.1.6.3. Biomarcadores de daño genotóxico**

Varios marcadores están disponibles para evaluar la exposición de los seres humanos a los posibles mutágenos y cancerígenos de origen ocupacional. Las ventajas de la vigilancia

humana de los individuos estudiados incluyen: la identificación de la exposición, la identificación de los mutágenos/carcinógenos ambientales, y la determinación del posible grado de susceptibilidad de los seres humanos a los mutágenos y carcinógenos específicos. Debido a que la mayoría de los carcinógenos humanos son genotóxicos, pero no todos los agentes genotóxicos se han demostrado ser carcinogénicos en seres humanos, es importante reconocer que el monitoreo humano de genotoxicidad es independiente del cáncer como criterio de valoración.

Los métodos clásicos para evaluar genotoxicidad incluyen AC, MN y evaluaciones de daño en el ADN (por ejemplo, aductos, rupturas de cadenas, entrecruzamiento, sitios álcali-lábiles). Los ensayos con estos criterios de valoración implican ensayos bioquímicos o electroforéticos, tales como el Ensayo Cometa (EC), ICH, y ensayos de aductos de proteína o ADN, e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HFRT) (Albertini y col., 2000). Todos estos métodos pueden ser considerados biomarcadores de exposición, de efectos, y en algunos casos de susceptibilidad, y son característicos de la epidemiología molecular.

Ciertos xenobióticos (entre ellos algunos pesticidas), pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud, particularmente transformaciones malignas. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales, su acción sobre el material genético.

Existe una variedad de pruebas que se pueden utilizar como determinantes de daño al material genético. El sistema más simple es cuando el punto final corresponde al blanco. En este caso se puede considerar una relación directa entre la interacción bioquímica o física del compuesto con el blanco y el efecto o punto final. A nivel celular, cuando el punto final es diferente del blanco, se pueden considerar tres niveles dependiendo de los pasos que separan la interacción inicial del agente químico con el blanco y el punto final que se utilice. Así, es posible considerar niveles proximales, intermedios y distales, donde:

- a) Proximal: el punto final está cercano pero aún es diferente del blanco, (mutaciones génicas, alteraciones estructurales y/o numéricas de cromosomas o mutaciones del genoma). Este punto es muy importante para evaluar el riesgo de efectos mutagénicos y cáncer.
- b) Intermedio: el punto final está separado por algunos pasos del blanco, (análisis de reparación y de caminos metabólicos).
- c) Distal: el punto final es resultado de alteraciones complejas en las actividades celulares después de la interacción inicial del compuesto con el blanco, (análisis de apoptosis, de necrosis y de supervivencia celular) (Kirsch-Volders y col., 2003).

La exposición a plaguicidas se ha asociado con el cáncer, las enfermedades degenerativas neurológicas, y la respuesta inmune alterada, entre otras, pero el mecanismo de acción no está claro. El potencial genotóxico es un factor de riesgo principal para los efectos a largo plazo, como el cáncer y posibles consecuencias sobre la salud reproductiva.

Hagmar y col. (2001) y Bolognesi (2003) examinaron la utilidad de los marcadores citogenéticos en poblaciones expuestas a pesticidas como criterios de valoración intermedia en la carcinogénesis y concluyeron que la frecuencia de las AC predice el riesgo de cáncer en sujetos sanos, pero estas asociaciones no se han encontrado para el ICH y MN. Luego, en 2008, Murgia y col, determinaron que MN en linfocitos de sangre periférica era predictor de cáncer luego de analizar los datos de 1650 personas reclutadas entre los años 1991 al 1993.

El seguimiento genotóxico en las poblaciones de trabajadores agrícolas podría ser una herramienta útil para estimar el riesgo de la exposición crónica a mezclas complejas de plaguicidas. En las dos últimas décadas, el EC se ha establecido como método sensible y rápido para la detección de roturas de ADN de cadena simple y reparación por escisión incompleta (Fairbain y col., 1995). Este marcador de genotoxicidad ha sido bien desarrollado con una alta fiabilidad interlaboratorios, pero no es específico de la exposición a plaguicidas y hasta la fecha no se han asociado con riesgo para cáncer u otras enfermedades en humanos.

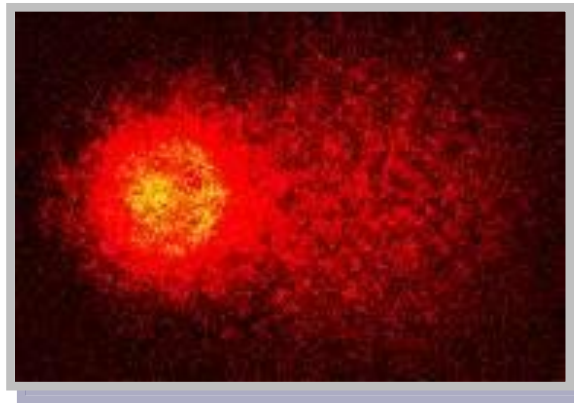
Cuando la sensibilidad de un método de genotoxicidad se considera alta, significa que puede detectar gran variedad de compuestos con potencial genotóxico desconocido (evitando así resultados falso negativos) y además, que la prueba puede detectar compuestos genotóxicos conocidos a bajos niveles (Kawaguchi y col., 2010).

#### **1.1.6.3.1. Ensayo Cometa**

Varias versiones del EC se encuentran en uso en la actualidad aunque la más conocida y utilizada también denominada electroforesis en gel de una sola célula, fue introducida por Singh y colaboradores en 1988. Esta versión alcalina ( $\text{pH} > 13$ ), es capaz de detectar daños en el ADN debido a roturas de cadena simple, a sitios álcali-lábiles, a sitios de reparación y a enlaces cruzados (cross link) en células individuales.

Brevemente, se trata de un método simple, rápido y sensible para la medición de roturas en el ADN en un pequeño número de células. Las células en estudio se encuentran inmovilizadas en

una capa delgada de agarosa sobre un portaobjetos, luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas, se retiran dejando el ADN super-enrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina de ADN y posterior electroforesis causa el desenrollamiento de los bucles y permite a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza generalmente por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se asemejan a la de un cometa, y el contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las roturas (Figura 1.15).



**Figura 1.15. Célula sometida al Ensayo Cometa**

(Fuente: Mudry y Carballo, 2006)

En la mayoría de los estudios es frecuente utilizar leucocitos, aunque los glóbulos blancos no son representativos de todas las células del cuerpo, y en particular, no son las células diana para el cáncer. Sin embargo, debido a que circulan por todo el organismo, su estado celular, nuclear y metabólico (incluyendo el ADN) refleja la exposición total del cuerpo. Otras células apropiadas de diversos tejidos y órganos han sido utilizadas en ocasiones, incluyendo las células epiteliales exfoliadas de la vejiga, nasal y bucal, (Rojas y col., 1996; Eren y col., 2002; Fortoul y col., 2004; Szeto y col., 2005; Pinhal y col., 2006) las células epiteliales del conducto lagrimal, (Rojas y col., 2000) y las células de biopsias (Pool-Zobel y col., 2004), pero los cometas pueden presentar altos niveles de daño en comparación con los linfocitos, y probablemente esto se relaciona con la desagregación física o enzimática de los tejidos necesaria para su procesamiento, o la presencia de células muertas o seniles. Los espermatozoides se han utilizado en varios estudios (Hughes y col., 1996; Sergerie y col., 2005; Migliore y col., 2006) pero el empaquetamiento del ADN en el espermatozoide es muy

diferente del ADN en las células somáticas, y esto afecta la producción de los cometas (Collins y Dusinska, 2009).

Los principales usos de este ensayo en Toxicología Genética incluyen:

- ✓ Ser un ensayo potencial para *screening* debido a ser un precursor de las AC.
- ✓ Permitir el estudio del probable mecanismo de acción de un agente dado mediante la utilización de modificaciones de la metodología básica.
- ✓ Posibilitar la distinción entre un agente genotóxico y citotóxico ante la inducción de AC.
- ✓ Formar parte de los protocolos de estudio “*in vivo/in vitro*” utilizados para la regulación de nuevos fármacos (normativas en espera de aprobación).

Como un ensayo de genotoxicidad, el EC puede identificar posibles mutágenos y carcinógenos humanos (Anderson y col., 1998). No obstante, no se espera obtener una perfecta correlación entre sustancias químicas que resulten positivas para este ensayo y carcinogenicidad. Sin embargo puede esperarse una buena correlación entre la clase de químico y el mecanismo de carcinogenicidad involucrado (Tice y col., 2000).

En estudios de genotoxicidad, las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales (Gadano, 2006).

#### **1.1.6.3.2. Ensayo de Reparación**

Uno de los aspectos más interesantes del EC es que permite estudiar el nivel basal de daño al ADN como así también determinar la cinética de reparación del daño para cada individuo (Singh y Khan, 1995; Bowden y col., 2003).

Distintos investigadores han buscado la forma de poner en evidencia la capacidad que tiene cada individuo de manejar una situación de estrés oxidativo y con qué mecanismos cuenta para compensar el daño generado (López Díaz-Guerrero y col., 2003; Blasiak y col., 2004; Lueken y col., 2004; Simoniello y col., 2008). Para evaluar la susceptibilidad individual a agentes oxidantes se propone utilizar una modificación del EC que permite evaluar la influencia de los mecanismos de reparación puestos en juego para inhibir el daño generado *in vitro* por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al ADN de los linfocitos. Mediante este Ensayo de Reparación del daño oxidativo, se pueden cuantificar los mecanismos relacionados con las defensas antioxidantes



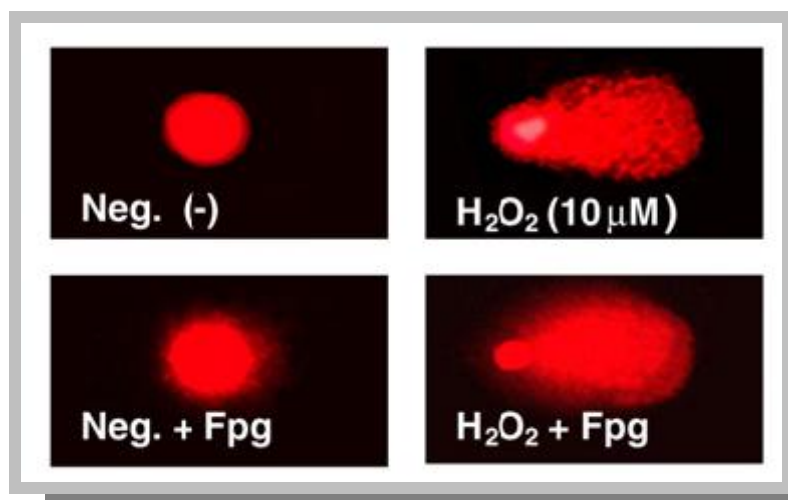
que controlan el ingreso del daño a la célula y generan la posterior reparación del ADN celular en un medio adecuado (Singh y Kahn, 1995).

#### **1.1.6.3.3. Ensayo Cometa modificado por el agregado de la enzima Formamido Pirimidina Glicosilasa**

La mayoría de las investigaciones que involucran lesiones oxidativas del ADN y su reparación se centraron en las roturas de la cadena de ADN. A fines del siglo pasado, las investigaciones permitieron explicar los efectos de las modificaciones químicas en las estructuras de las bases y sus precursores que son probablemente tan importantes como las roturas para la función celular y su supervivencia, especialmente bajo condiciones normales de estrés oxidativo endógeno. La reparación del ADN que contiene bases oxidadas, se realiza predominantemente por el camino que involucra la escisión de bases, iniciado por ADN glicosilasas, aunque ciertos tipos de lesiones oxidativas también parecen ser reparadas por la escisión de nucleótidos y reparación *mismatch* (Bjelland y col., 2003).

Existen endonucleasas bacterianas de reparación que fácilmente se pueden incorporar en un protocolo de EC modificado. La Formamido Pirimidina Glicosilasa (FPG), actúa en condiciones fisiológicas como glicosilasa, o sea que reconoce una variedad de purinas oxidadas en el ADN y las elimina, dejando un sitio a-purínico (AP), una actividad asociada AP-endonucleasa y a continuación provoca una ruptura en el ADN (Dusinska y Collins, 1996). Esta enzima fue llamada así por su habilidad para reconocer las purinas imidazólicas de anillo abierto o formamidopirimidinas (Fapy Ade y Fapy Gua), que se producen durante la ruptura espontánea de purinas dañadas (el sustrato más importante en el daño oxidativo al ADN es 8 oxoGua) (Boiteux, 1993). Con FPG se evalúa la presencia purinas oxidadas, lo que refleja el daño causado por las especies reactivas del oxígeno en el ADN de las células evaluadas (Collins y col., 1993).

Para evaluar la presencia de lesiones oxidativas en el ADN se ha propuesto un modelo enzimático (Collins y col., 1993, 1996, 1997) que puede ser usado en la versión alcalina del EC. Las células expuestas (*in vitro* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o *in vivo* a agentes oxidantes) se lisan de la forma habitual, se incuban los nucleoides resultantes con FPG durante 30 minutos a 37 °C, y luego se continúa con el EC estándar, el tratamiento con álcalis y la electroforesis.



**Figura 1.16. Imágenes de Cometa.**

(Fuente: Muñiz y col, 2007).

**Arriba:** (izquierda) sin tratar (control negativo); (derecha) Linfocito tratado con 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control positivo). **Abajo** (izquierda) imagen de Cometa control negativo + FPG; (derecha) Linfocito tratado con 10 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min (control positivo) + FPG.

En la Figura 1.16 se pueden observar las diferencias en las imágenes de cometa según la célula esté en presencia de 10 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de FPG o de ambos.

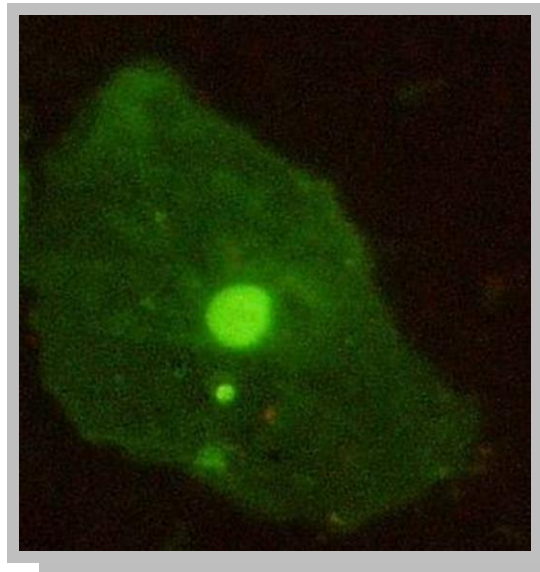
Las aplicaciones del EC modificado por el uso de la enzima permite: el estudio de los mecanismos de acción de productos químicos genotóxicos, la investigación del daño oxidativo como factor de una enfermedad, la vigilancia de estrés oxidativo en animales o seres humanos generados por el ejercicio, la dieta o por exposición a agentes ambientales, el estudio de los efectos de los antioxidantes en la dieta, y la vigilancia de la contaminación del medio ambiente mediante el estudio de organismos centinela.

Una de las aplicaciones más productivas del EC modificado con enzimas lesión-específicas en biomonitoreos humanos se desarrolló en el ámbito de la Nutrición (Duthie et al, 1996; Pool-Zobel et al, 1997; Mitchell et al, 1999; Boyle et al, 2000; Porrini y Riso, 2000; Collins et al, 2001, 2003; Møller et al, 2002, 2003, 2004a,b,c, 2006; Miller et al, 2005, Bjelakovic et al, 2007).

#### **1.1.6.3.4. Micronúcleos en Mucosa Bucal**

Los MN se originan durante la división celular; si se altera el proceso de replicación o los cromosomas se rompen o se dañan por la acción de un agente físico, químico o biológico, la

distribución del material genético durante la anafase de la división celular se puede ver afectada, de manera que cromosomas enteros o fragmentos de estos no se incorporan al núcleo principal de las células hijas. En la telofase, estas estructuras cromosómicas se envuelven en membrana nuclear y asumen gradualmente la morfología y demás características de un núcleo en interfase, con un tamaño mucho menor que el primario, de ahí el nombre de Micronúcleo (Schmid, 1975). Esto puede ser visualizado como una masa de cromatina, que tiene la forma de un núcleo pequeño, y que aparece cerca del núcleo principal (Figura 1.17).



**Figura 1.17. Micronúcleo en célula de mucosa bucal, tinción con Naranja de Acridina.**

El Test de MN en diversas líneas celulares y tejidos tiene un alto valor predictivo en estudios que tratan de detectar precozmente efectos citogénéticos en exposiciones ocupacionales y medioambientales.

El índice de MN en células de roedores y/o humanas se ha convertido en uno de los criterios de valoración estándar de citogenética y marcadores biológicos utilizados en toxicología genética *in vivo* o *ex vivo*. En los seres humanos, los MNs pueden ser fácilmente evaluados en los linfocitos y células epiteliales exfoliadas (por ejemplo, oral, urotelial, nasal) para obtener una medida del daño inducido al genoma *in vivo*. Los tejidos epiteliales se dividen rápidamente, de modo que para el ensayo de MN en células epiteliales no es necesario la división nuclear *ex vivo*, como frecuentemente se utiliza para otros análisis citogénéticos (AC o ICH) que están basados en el análisis de los cromosomas en metafase.

La recolección de células bucales es posiblemente el método menos invasivo disponible para medir el daño al ADN en los seres humanos, especialmente en comparación a la obtención de muestras de sangre para el análisis de linfocitos, biopsias o tejidos. El test de Micronúcleos en mucosa bucal (MNMB) es un sistema de prueba simple y rápido, con un punto final bien definido y fácilmente reconocible. Las células pueden ser fijadas y se pueden almacenar los preparados por largos períodos de tiempo. El Test de MNMB ha sido utilizado para demostrar efectos citogenéticos inducidos por modificaciones medioambientales, exposiciones ocupacionales, estilos de vida, deficiencias dietarias y diferentes enfermedades (Holland y col., 2008).

## **1.2 Objetivos del Trabajo de Tesis**

### **1.2.1. Objetivos Generales**

El objetivo de este trabajo de Tesis es utilizar un conjunto de biomarcadores de daño inducido por la exposición de humanos a mezclas simultáneas de plaguicidas empleados en los cultivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe, con el fin de evaluar los posibles mecanismos involucrados en su toxicidad y su relación con aspectos laborales de la población en estudio.

La evaluación del daño generado por exposición directa a mezclas simultáneas de pesticidas en humanos expuestos, será realizada mediante el empleo de biomarcadores enzimáticos, de estrés oxidativo y de daño al ADN de los individuos expuestos.

El desafío es lograr la sustentabilidad de una agricultura de gran escala, con mayor producción, que consolide el desarrollo regional y nacional, con el compromiso fundamental de preservar la salud de los trabajadores y la conservación ambiental.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- 1) Evaluar el daño generado por exposición a mezclas simultáneas de pesticidas en trabajadores de cultivos intensivos y extensivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe y confrontarla, en todos los casos, con una población no expuesta (grupo control) que cumpla con las características socio-económico-culturales de la primera.
- 2) Caracterizar la exposición mediante la determinación de las actividades de Butirilcolinesterasa Plasmática y Acetilcolinesterasa Eritrocitaria en ambas poblaciones de trabajadores y controles.
- 3) Evaluar el efecto de los plaguicidas sobre el estado oxidativo midiendo la actividad de CAT como marcador del sistema antioxidante, la relación GSH/GSSG como marcador del balance redox y los niveles de TBARS como marcador de la peroxidación de lípidos en los eritrocitos de ambos grupos.

- 4) Aplicar el Ensayo Cometa, el Ensayo de Reparación y sitios FPG en los linfocitos de sangre periférica y determinar la frecuencia de MN en células exfoliativas del epitelio bucal para determinar el efecto de las mezclas de plaguicidas sobre el ADN de los trabajadores y controles.
- 5) Integrar los resultados de acuerdo a las variables tenidas en cuenta en la anamnesis de los trabajadores y de los controles, considerando aquellas que actúen como factores de confusión y considerando también las prácticas laborales de cada modelo agro técnico.

## **CAPÍTULO 2**

### **Materiales y Métodos**

## 2.1. Selección de la población

### 2.1.1. Cuestionario

Los estudios de casos y controles suelen realizarse para responder a una serie de preguntas específicas que relacionan la exposición de las personas a sustancias o situaciones peligrosas con efectos posteriores en la salud. Casi todas las investigaciones de este tipo se basan en un cuestionario que constituye la herramienta básica para la recolección de datos, incluso cuando deben colectarse materiales biológicos como muestras sanguíneas de las personas expuestas y no expuestas que participan en el estudio.

El cuestionario individual es esencial para caracterizar correctamente la exposición, así como para registrar en forma organizada y sistemática las características individuales y/o colectivas, ofreciendo la mayor posibilidad de recoger datos complejos y exactos. Puesto que la finalidad de un cuestionario es obtener datos sobre las personas incluidas en el estudio, su diseño debe respetar las normas establecidas para el tratamiento ético de los seres humanos. Estas directrices se aplican en la misma medida a los datos obtenidos a través de un interrogatorio como también a las muestras biológicas como sangre y orina, o a las pruebas genéticas (Palacios Nava, 2003).



**Figura 2.1. Realización de la entrevista personal**

Para poner a prueba el instrumento, se realizó una prueba piloto con el cuestionario citando los primeros donantes en el Hospital Protomédico Dr. Manuel Rodríguez, de la localidad de Recreo. Se solicitó la colaboración del equipo de trabajadores sociales para lograr el acercamiento a la población encuestada, poniendo especial atención en aspectos tales como relevancia de las preguntas, correcta formulación, ambigüedad, sugerencia de respuesta desde el enunciado, secuencia y tiempo que demandaba su realización.



El formulario utilizado incluyó un total de 30 preguntas recopilando información : a) Socio-demográfica: edad, lugar y tiempo de residencia, educación, tipo de vivienda y agua de consumo; b) Hábitos y costumbres: hábito de fumar y consumir alcohol; c) Datos laborales: condiciones de trabajo actual, antecedentes laborales, uso anterior y actual de plaguicidas, puesto de trabajo, etapa del proceso agrícola, modalidad, frecuencia y forma de aplicación de plaguicidas, tipo de equipo utilizado para pulverizar, antigüedad en el puesto, horas trabajadas por semana, tipo y uso de equipo de protección personal, síntomas compatibles con intoxicación por plaguicidas, atención recibida. Los cuestionarios utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral se adjuntan en el Anexo I.

Los criterios de inclusión consideraron a los trabajadores rurales y aplicadores de plaguicidas que trabajaban y vivían en la zona de estudio (de cultivos intensivos o de cultivos extensivos), con una antigüedad laboral mínima de un año. Los controles se seleccionaron de la población que vivía en la misma zona geográfica, pero que no tenían antecedentes laborales relacionados con exposición a agroquímicos. Dentro de lo posible, por cada trabajador se reclutó un control, con características socio-demográficas semejantes, fundamentalmente teniendo en cuenta los factores edad y sexo. Las entrevistas de los expuestos y controles se realizaron dentro de la misma semana.

Los criterios de exclusión se basaron en la edad con un intervalo en el que no eran aceptables los participantes que tenían menos de 18 años o más de 55 años.

### **2.1.2. Consentimiento Informado**

Un procedimiento imprescindible en las investigaciones con seres humanos lo constituye el otorgamiento por los participantes del consentimiento informado para su inclusión en el estudio (Declaración de Helsinki, 2000). Este procedimiento es reconocido por algunos autores como la forma fundamental de proteger los intereses del sujeto (Biros y col., 1999). Los numerosos aspectos que deben ser informados a los potenciales participantes de una investigación no solo tienen una importancia ética insustituible sino que además pueden repercutir en los resultados del estudio (Montenegro Suris, 2003).

El consentimiento informado en este trabajo de Tesis fue el instrumento de expresión de las dos voluntades (los participantes y los investigadores) debidamente conocedoras, competentes y autónomas que decidieron contribuir a un procedimiento científico, el cual garantiza que el sujeto expresó (después de haber comprendido la información que se le ha brindado acerca de los objetivos y procedimientos del estudio) su intención de participar en la entrega de

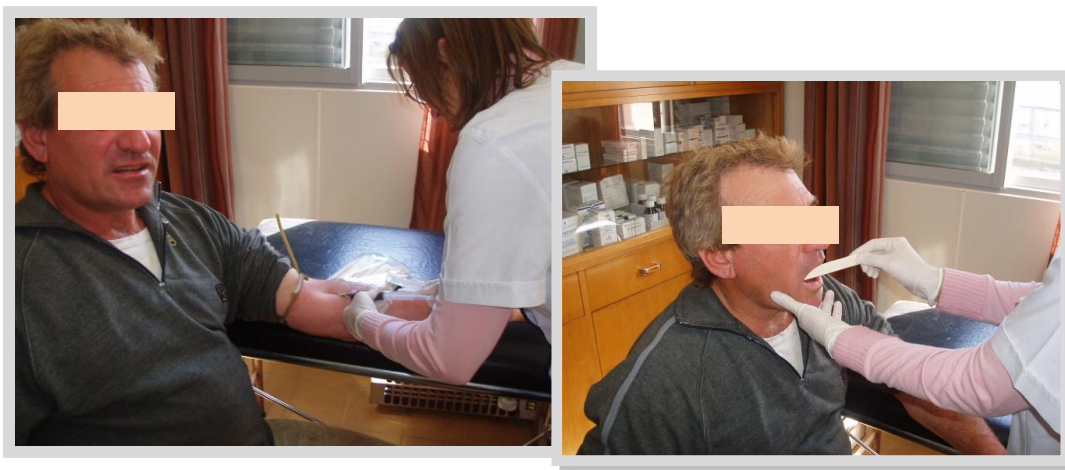
información a través del instrumento de recopilación de datos (encuesta o cuestionario) y en la aceptación en la toma de las muestras biológicas correspondientes. El formulario de consentimiento se adjunta en el Anexo II. El Comité de Ética del Hospital Provincial José María Cullen estableció las normas para el desarrollo del estudio y el consentimiento informado fue otorgado por cada individuo antes del comienzo del estudio.

## 2.2. Obtención de las muestras

De cada donante incluido en el estudio se obtuvo una muestra de sangre (10 ml) de la vena braquial con jeringa heparinizada y se dividió en dos viales de 5 ml cada uno. Las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y procesadas dentro de las 2 h.

El contenido de uno de los viales se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos para la separación de los eritrocitos. El plasma se separó para la determinación de BChE. La capa leucocitaria fue removida y los eritrocitos restantes (capa inferior) se lavaron tres veces en solución salina fría ( $8,9 \text{ g l}^{-1}$  de NaCl) por centrifugación 5 min a 1300 g y  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se realizó la dosimetría de Hemoglobina sobre los eritrocitos lavados (Método de Drabkin). Las alícuotas de los glóbulos rojos se mantuvieron a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  para las determinaciones del estado oxidativo por un tiempo no superior a cuatro semanas. Las determinaciones de actividad de las enzimas BChE y AChE se realizaron dentro de las 8 horas. El segundo vial de sangre entera se utilizó para el estudio de daños al ADN dentro de las 4 horas de extracción.



**Figura 2.2. Obtención de las muestras.**

Para la determinación de MNMB, se raspó el interior de ambas mejillas del dador con un cepillo dental pequeño, posteriormente se colocó en un tubo cónico (Falcon) conteniendo 3 ml del buffer celular y las muestras así obtenidas fueron transportadas al laboratorio refrigeradas, siendo procesadas el mismo día de la extracción.

## 2.3. Metodologías

### 2.3.1. Biomarcadores sustitutos de exposición a organofosforados y metilcarbamatos

#### 2.3.1.1. Determinación de la Actividad de Butirilcolinesterasa (Ellman y col, 1961)

- Fundamentos

Butiriltiocolina en presencia de BChE se desdobra en tiocolina y butirato; la tiocolina generada en presencia del reactivo DTNB produce un producto coloreado amarillo: 2-nitro-5-mercaptopbenzoato que puede ser medido espectrofotométricamente a 405 nm.

- Reactivos y soluciones

Se utilizó el kit comercial Wiener lab ®

- Preparación de las muestras

Se utilizó el plasma obtenido luego de la centrifugación (1000 g por 5 min) de la sangre heparinizada.

- Técnica Operatoria

Es un procedimiento con  $\Delta T$  fijo (25 °C) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Jenway®, Geneva. En una cubeta mantenida a la temperatura elegida, se colocó 3 ml de sustrato reconstituido. Se pre-incubó unos minutos a 25 °C. Luego se agregó 20  $\mu$ l de plasma, se mezcló inmediatamente y leyó la absorbancia a 405 nm disparando simultáneamente el cronómetro. Se volvió a leer luego de 30, 60 y 90 segundos exactos. Se determinó la diferencia promedio de absorbancia cada 30 segundos ( $\Delta A/30$  seg) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores.

- Cálculos

Actividad de Butirilcolinesterasa (U/l) =  $\Delta A/30$  seg x 22.710

Los resultados se expresaron como U de BChE l<sup>-1</sup>

#### 2.3.1.2. Determinación de la Actividad de Acetilcolinesterasa (Ellman y col, 1961)

- Fundamentos

La enzima AChE, presente en una dilución de eritrocitos, produce la degradación del sustrato acetilcolina. La tasa de hidrólisis de la acetilcolina se mide espectrofotométricamente a 405 nm por la reacción del producto de la hidrólisis con DTNB a 25 °C, pH 7,0, para dar un

producto coloreado amarillo: 5-tio-2-nitrobenzoato que es proporcional a la actividad enzimática.

- Reactivos y soluciones

*Buffer/DTNB (pH 7):* 0,03 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5,36 g l<sup>-1</sup>); 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,94 g l<sup>-1</sup>); 0,25 mM DTNB (0,10 g l<sup>-1</sup>).

*Sustrato:* 0,1 M Ioduro de acetilcolina (45 g l<sup>-1</sup>)

*Solución Fisiológica:* Na Cl 8,9 g l<sup>-1</sup>

- Preparación de las muestras

*Solución de eritrocitos:* dilución en solución fisiológica 1:10 de eritrocitos lavados previamente.

- Técnica Operatoria

En un tubo con 3 ml de buffer/DTNB se agregó 20 µl de la dilución de eritrocitos y en el momento previo de iniciar la lectura cinética se agregó 0,1 ml del sustrato, mezclándose inmediatamente. Se midió el tiempo transcurrido para que la lectura de absorbancia a 405 nm presente un cambio de 0,100 unidades de absorbancia, se tomaron tres ΔT y se utilizó el promedio para realizar los cálculos. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway®, Geneva, fijando las condiciones de trabajo a 25 °C.

- Cálculos

Actividad de AcetilColinesterasa = (70376 / ΔT) x 10

70376: factor de extinción molar; 10: factor de dilución.

Los resultados se expresaron como U de AChE l<sup>-1</sup> de eritrocitos.

### **2.3.2. Biomarcadores del Estado Oxidativo**

#### **2.3.2.1. Determinación de la Actividad de Catalasa (Aebi, 1984)**

- Fundamento

La CAT captura el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de que pueda reaccionar dentro de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. La reacción de CAT es una reacción de primer orden: la concentración de la enzima es proporcional a la actividad enzimática y los resultados pueden ser reportados tanto en actividad como en concentración. El procedimiento consiste en determinar la disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contenido en buffer de fosfatos en presencia de una dilución de eritrocitos a 240 nm a 25 °C por 60 segundos.

- Reactivos y soluciones

*Buffer Fosfatos 0,05 M, pH 7:*

37 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05M ( $6,8 \text{ g l}^{-1}$ ); 63 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M ( $8,7 \text{ g l}^{-1}$ )

*Solución de 0,053 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  en buffer de fosfatos:* 60  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 100 volúmenes en 10 ml de Buffer de Fosfatos 0,05 M, pH 7.

- Preparación de las muestras

*Hemolizado de eritrocitos al 1%:* 10  $\mu\text{l}$  de eritrocitos lavados en 1000  $\mu\text{l}$  de agua mili Q fría.

- Técnica Operatoria

A 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  54 mM en 50 mM de buffer de fosfatos, pH 7, se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de hemolizado (eritrocitos 1 %). La disminución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue medida a 240 nm a 25 °C por 60 segundos utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Jenwey®, Geneva. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los  $\Delta A$  fueron promediados.

- Cálculos y Calibrados

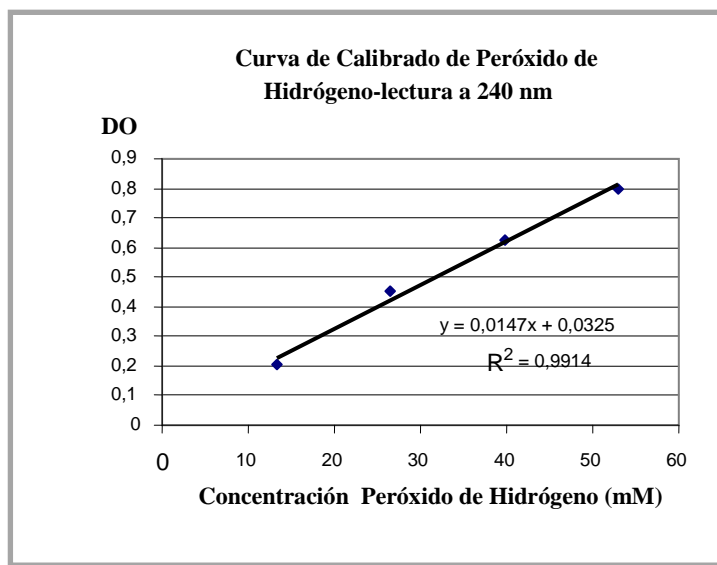
Unidades/ml=  $\frac{\Delta A \text{ 240 nm} \times \text{volumen de cubeta (ml)} \times \text{factor dilución} \times 1 \text{ cm}}$

$43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times \text{volumen de la muestra usada (ml)}$

Actividad Específica= (Unidades/ml) /  $\text{mg ml}^{-1} \text{ Hb}$

Los resultados se expresaron como kU de CAT por  $\text{g}^{-1}$  de Hb.

Se realizó una curva de calibrado con peróxido de hidrógeno para obtener los parámetros de calidad del método a 240 nm (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Curva de calibrado de Peróxido de Hidrógeno a 240 nm**

### 2.3.2.2. Determinación de la relación GSH/GSSG (Venturino y col., 2001)

- Fundamento



Para determinar el GSH+GSSG presente en la muestra se utiliza la enzima GR que logra la conversión cuantitativa del GSSG en GSH. La técnica usa el equilibrio de la reacción desplazado hacia GSH en forma prácticamente total, utilizando luego la precipitación ácida para terminar la acción enzimática. Inmediatamente se realiza detección del GSH total (GSH+GSSG) utilizando DTNB y se obtiene un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente. Utilizando la misma reacción de color, pero sin el uso de la enzima, se determina el GSH de la muestra.

- Reactivos y soluciones

*Buffer de Muestra:* Buffer Pi (2X) 286 mM + Na<sub>2</sub> EDTA 12.6 mM, pH 7.5: 15,5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (34,3g l<sup>-1</sup>) + 84,5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (40,60 g l<sup>-1</sup>) + Na<sub>2</sub> EDTA 0,469 g

*Buffer de Reacción:* Buffer Pi (1X) 143 mM + Na<sub>2</sub> EDTA 6.3 mM, pH 7.5: 1:2 Buffer de muestra

*Buffer de Neutralización:* Buffer Fosfato (Pi) 0.25 M, pH 8.0: 20 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (29,9 g l<sup>-1</sup>) + 80 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (35,49 g l<sup>-1</sup>)

*Solución GR:* 24 UI/ml en buffer de reacción

*Solución de NADPH:* 4.2 mM (3,5 g l<sup>-1</sup>) en Buffer de Reacción

*Solución de Tricloroacético (TCA):* 50 g l<sup>-1</sup>

*Solución Reactivo de Ellman (DTNB):* 1.5 mM (0,595 g l<sup>-1</sup>) en Buffer de muestra

- Preparación de las muestras

*Muestra:* 200 µl de eritrocitos lavados, se mezclaron con 600 µl agua mili Q fría, se homogenizó y agregó 600 µl de TCA 10%. Se centrifugó a 10.000 g en microcentrífuga refrigerada a 4 °C por 10 min. Con el sobrenadante se prepararon dos tubos *ependorff* (para determinar GSH y para GSH+GSSG)

- Técnica Operatoria

**Tabla 2.1.** Técnica operatoria para la determinación de GSSG+GSH y GSH.

Reactivo	GSSG+GSH	GSH
Muestra o Testigo (curva)	0.45 ml	0.45 ml
NADPH 4.2 mM (0.21 mM final)	25 µl	---
GR 24 UI/ml (0.6 UI en tubo)	25 µl	---
Buffer de Muestra Pi 1X (143 mM + Na <sub>2</sub> EDTA 6.3 mM)	---	50 µl
Se agita. Se incuba 30 min. a 25 °C		
TCA 10%	0.5 ml	0.5 ml
Centrifugar a 10000 x g 10 minutos. Usar el SN para seguir con la técnica de Ellman (1959).		
SN	100 µl (triplicado)	100 µl (triplicado)
DTNB	1 ml	1ml
Se dejó transcurrir la reacción 5 min. Se realizó la lectura contra blanco de reactivos a 412 nm.		

▪ Cálculos y Calibrados

Curva estándar en TCA al 5%.

Estándar GSH 1mM (µl)	TCA 5% (µl)	nmoles GSH/tubo nmol
0	450	0
90	360	1
180	270	2
270	180	3
360	90	4
450	0	5

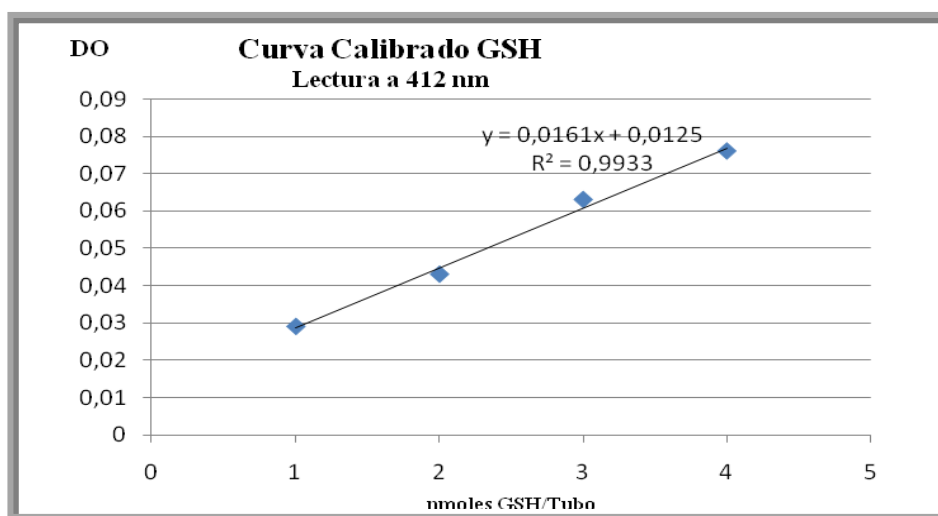


Figura 2.4. Curva de calibrado para la determinación de GSH

Los datos proporcionados por la curva (Figura 2.4) permitieron calcular  $\mu\text{mol}$  de Glutation total por  $\text{mg}^{-1}$  Hb para el tubo GSH+GSSG y  $\mu\text{mol}$  de Glutation por  $\text{mg}^{-1}$  Hb para el tubo de GSH. Por sustracción de ambos se obtuvo GSSG. Se calculó la relación GSH/GSSG.

### **2.3.2.3. Determinación de Sustancias Reactivas con el Acido Tiobarbitúrico como medida de peroxidación lipídica (Beuge y Aust, 1978)**

#### ▪ Fundamento

El MDA forma un 1,2 aducto con el TBA, lo que produce MDA:TBA (1:2) una base de Schiff color rosa fluorescente, que puede ser medido por espectrofotometría. Las sustancias reactivas al TBA (TBARS) se generan a partir de la oxidación enzimática del ácido araquidónico, y también como producto final de la degradación oxidativa de algunos ácidos grasos poliinsaturados que poseen tres o más dobles enlaces. Por lo tanto, constituyen una medida indirecta de la lipoperoxidación de las membranas provocada por los RL.

#### ▪ Reactivos y soluciones

*Solución de trabajo:* 15% TCA, 0.375 % TBA y 0.25 mol/l HCl: TCA 9 g + TBA 0,225 g + 1,25 ml HClc en csp. 60 ml H<sub>2</sub>O

*Solución de Butilhidroxitolueno (BHT):* 680  $\mu\text{M}$ : 40 g l<sup>-1</sup> en etanol

#### ▪ Preparación de las muestras

50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos lavados, se mezclaron con 200  $\mu\text{l}$  agua mili Q fría, homogeneizando posteriormente la mezcla.

#### ▪ Técnica Operatoria

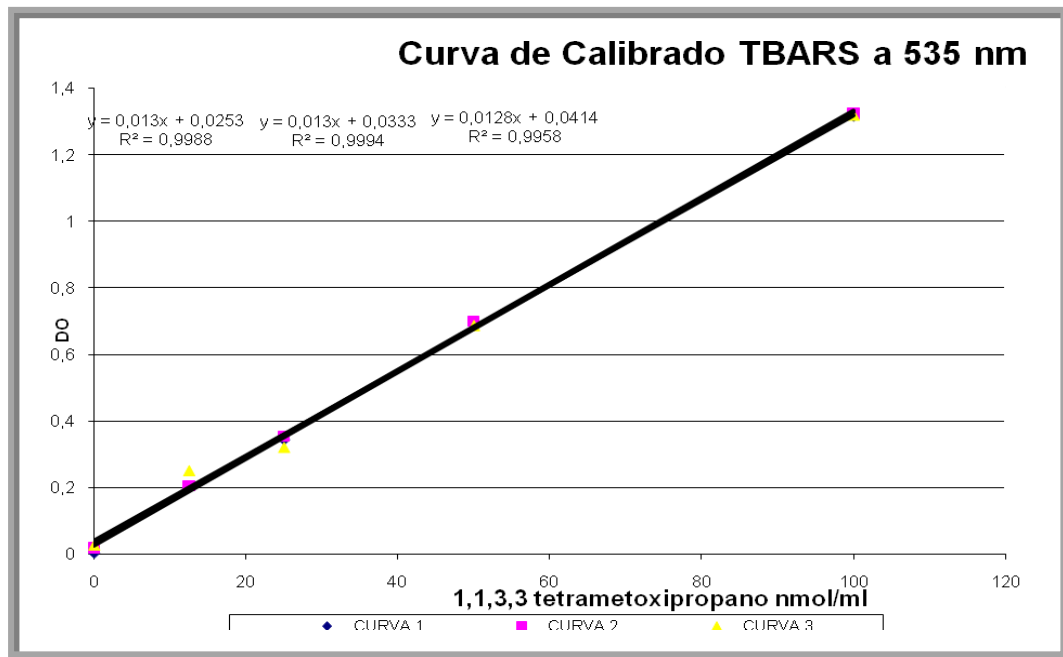
Se mezclaron 250  $\mu\text{l}$  de muestra + 25  $\mu\text{l}$  de solución de BHT + 1 ml de solución de trabajo. La mezcla se calentó por 45 min en baño de glicerina de 92 °C. Posteriormente se enfrió en baño de hielo para detener la reacción. Los flóculos precipitados se removieron por centrifugación a 10000 g por 10 minutos. La absorbancia de la muestra se determinó a 535 nm contra blanco de reactivos utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Jenwey®, Geneva. Para evitar las interferencias, se usaron tubos libres de hierro y agua desionizada para el ensayo.

#### ▪ Cálculos y Calibrados

La concentración de TBARS fue calculada usando el coeficiente de extinción:  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como nmol de TBARS por  $\text{g}^{-1}$  Hb.



La calibración se realizó con 1,1,3,3 tetrametoxipropano para obtener los parámetros de calidad de la técnica (Figura 2.5).



**Figura 2.5. Curva de calibrado de la determinación de TBARS.**

### 2.3.3. Biomarcadores de Daño Genotóxico

#### 2.3.3.1. Ensayo de Viabilidad (Mercille y Masie, 1994)

- Fundamento

Las células viables se visualizaron de color verde debido a que el colorante vital Naranja de Acridina se intercala en el ADN. Los núcleos teñidos de color rojo son indicativos de muerte celular ya que el Bromuro de Etidio penetra en estas células pero es excluido de las viables y aquellas células que presentan ambos colores se encuentran comprometidas.

- Reactivos y soluciones

*Solución de tinción:* 100 µg/ml Bromuro de Etidio + 100 µg/ml Naranja de Acridina en Buffer fosfato salino (PBS) libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>

- Preparación de las muestras

*Dilución de la sangre:* 50 µl de Sangre entera heparinizada + 950 µl de RPMI 1640

- Técnica Operatoria

Se mezcló 100 µl de la dilución de la sangre con 4 µl de la solución de tinción. Se incubó 10 a 30 minutos en oscuridad. Se colocó la mezcla sobre portaobjeto, se agregó cubreobjeto y se observó en microscopio de fluorescencia. Las células viables se ven color verde, las células necróticas color rojo, y las células en proceso de apoptosis poseen características particulares de vacuolización y fragmentación nuclear, con posible tinción de ambos colorantes dependiendo del estadio de apoptosis en el que se encuentren.

- Expresión de resultados

Se contaron 200 células para cada portaobjetos y la viabilidad se expresó como porcentaje de células viables.

### **2.3.3.2. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa (Singh y col, 1988)**

- Fundamento

Las células están incrustadas en una capa delgada de agarosa en un portaobjetos y luego son lisadas en una solución que contiene detergentes y sales. Así, las membranas, los componentes solubles de la célula y las histonas se retiran, dejando el ADN super-enrollado y aún conectado a la matriz nuclear. La incubación alcalina de ADN y posterior electroforesis causa el desenrollamiento de los bucles y le permite a los fragmentos avanzar hacia el ánodo, formando la "cola del cometa" que se visualiza generalmente por microscopía de fluorescencia. Las imágenes se parecen a los cometas, y el contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las roturas.

- Reactivos y soluciones

*Agarosa de punto fusión normal (APFN)* al 1 %

*Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF)* al 1%

*Solución de lisis stock:* 2,5 M NaCl +100 mM Na<sub>2</sub>EDTA +10 mM Tris Ajustar pH 10 con NaOH

*Solución de lisis final:* 40 ml de solución stock + 5 ml Dimetil sulfóxido (DMSO) + 400 µl Tritón. Preparar inmediatamente antes de su uso. Refrigerar a 4-10 °C, 30-60 min antes de usar

*Soluciones stock de electroforesis:* A) 10 N NaOH; B) 200 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 10

*Buffer de electroforesis final:* 30 ml solución A + 5 ml solución B + H<sub>2</sub>O csp 1 litro de buffer de electroforesis, pH>13.

*Buffer de neutralización:* 0,4M Tris. Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado

*Solución de Tinción:* 2 µg/ml Bromuro de etidio

- Preparación de las muestras

*Dilución de la sangre:* 50 µl de sangre entera heparinizada + 950 µl de RPMI 1640 en estufa de 37 °C por 60 minutos. Se centrifugó a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se utilizó el sedimento para realizar los preparados.

- Técnica Operatoria

La determinación de la viabilidad celular previo al EC o a cualquiera de sus modificaciones es una recomendación realizada por Singh y col. (2000).

Para realizar los preparados, se fundió la APFN en microondas (2 minutos a baja potencia). Se distribuyeron 25 µl de APFN en portaobjetos con APFN, se deshidrató en estufa 5 minutos a 40 °C para lograr una capa de mordiente. Se agregó 200 µl de APFN y se cubrió inmediatamente con cubreobjetos, se llevó a heladera durante 10 minutos para que gelifique. Se retiró el cubreobjetos y se dejó secar en estufa 20 minutos a 50 °C. Estos portas así preparados con la primer capa se pueden guardar para su posterior uso en un desecador.

Se preparó la solución de lisis final en el vaso coplin y se llevó a heladera para que se enfríe.

A dos portaobjetos con la primera capa deshidratada se le agregaron partes iguales de la mezcla: 200 µl de ABPF (37°C) y el sedimento de las células (10.000 aproximadamente), colocando cubreobjetos sobre ambos portaobjetos para ser llevados a heladera por 10 min. Así, cada muestra se realizó por duplicado.

Se deslizó el cubreobjetos en forma lateral y se agregó una tercera capa de ABPF fundida a 37 °C. Se colocó el cubreobjetos y se dejó solidificar, se quitó el cubre y se sumergió los portaobjetos en solución de lisis fría. Se dejó a 4°C por 1 hora como mínimo y 4 semanas como máximo. Todos los pasos posteriores se realizaron en ausencia de luz para evitar el daño extra que puede sufrir el ADN desnudo expuesto a la luz directa.

Se retiraron los preparados de la solución de lisis y se colocaron en una cuba horizontal en baño de hielo que contenía el Buffer de electroforesis a 4°C, por 20 min para que se lleve a cabo el desenrollamiento (*Unwinding*) del ADN. Luego se realizó la electroforesis a 0,90 V/cm. durante 20 minutos. Se retiraron cuidadosamente los portaobjetos de la cuba y se realizaron 3 lavados con buffer de neutralización a intervalos de 5 minutos. Se escurrieron los

preparados y se deshidrataron durante 5 minutos en alcohol etílico, se conservaron en lugar seco.

Los preparados se tiñeron en el momento de la lectura con 25  $\mu\text{l}$  de la solución de Bromuro de Etidio. La lectura de los preparados se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus CX 40 equipado con un filtro de excitación U-RFLT 50) a 400 x.

En todas las corridas se incluyó:

- a) Control Negativo: se mezcló 950  $\mu\text{l}$  de RPMI 1640 y 50  $\mu\text{l}$  de sangre periférica heparinizada (de donante sano y no expuesto de forma laboral a genotóxicos conocidos), se incubó a 37 °C por una hora, se centrifugó y se realizó el preparado de manera la manera descrita previamente,
- b) Control Positivo de EC (50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ): se mezcló 900  $\mu\text{l}$  de RPMI 1640, 50  $\mu\text{l}$  de de sangre periférica heparinizada (de donante sano y no expuesto de forma laboral a genotóxicos conocidos), y 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 m M, se incubó a 37 °C por una hora, se centrifugó y se realizaron los preparados de la manera descrita anteriormente.

▪ Cálculos y Calibrados

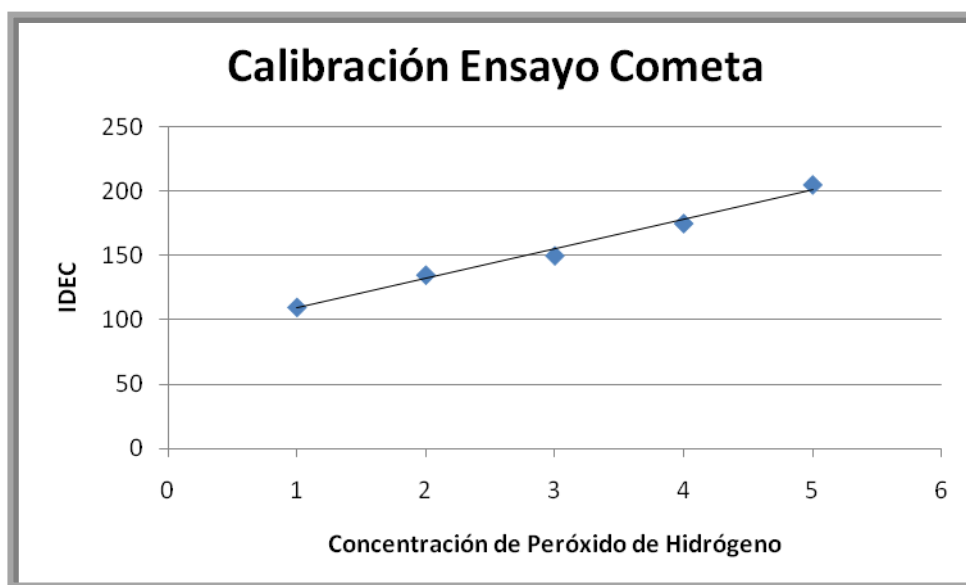
Se cuantificaron 100 células por muestra, 50 en cada réplica. Se determinaron la cantidad de células en cada nivel de daño considerando: *nivel 0*= sin daño, sin migración de fragmentos (sin cola); *nivel 1*= daño leve (cola de longitud menor al diámetro del nucleoide); *nivel 2*= daño moderado (longitud de la cola mayor al diámetro de un nucleoide pero menor al diámetro de dos); *nivel 3*= daño alto (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres) y *nivel 4*= daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides). A medida que aumenta la longitud de la cola y por ende la cantidad de ADN en la misma, el nucleoide (“cabeza del cometa”) va perdiendo intensidad y tamaño. Se calcula el Índice de daño EC:  $\text{IDEC} = n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4$ , donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño. La categoría 0 no se incluyó en el índice.

Los resultados se expresan como IDEC

Se realizó una curva de calibrado (Figura 2.6) con las condiciones fijadas para el ensayo utilizando peróxido de hidrógeno como inductor de daño al ADN *in vitro* en los linfocitos

Tubo 1: 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , Tubo 2: 20 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , Tubo 3: 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , Tubo 4: 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , Tubo 5: 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Todos los tubos se incubaron a 37 °C por una hora, de cada tubo se tomaron 100 µl para observar viabilidad, se centrifugaron y al sedimento se le agregó 200 µl de ABPF a 37 °C y distribuyó en 2 portaobjetos preparados previamente. En cada punto de la curva se determinó IDEC



**Figura 2.6. Calibración del Ensayo Cometa utilizando Peróxido de Hidrógeno**

### 2.3.3.3. Determinación del Índice de daño al ADN utilizando el Ensayo de Reparación (Bowden y col., 2003)

- Fundamento

La función del ensayo es evaluar los procesos de reparación puestos en juego para inhibir el daño generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ADN de los linfocitos *in vitro*. Luego del daño oxidativo generado al ADN se puede llegar a un estado de equilibrio dinámico por la presencia de las defensas antioxidantes, pudiendo entonces con el ensayo determinar si el daño producido se elimina.

- Reactivos y soluciones

Agarosa de punto fusión normal (APFN) al 1 %

Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 1%

Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM: Se toma 11,5 µl de sol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 volúmenes y se lleva a 1ml: sol 0,1 M, se tomar 10 µl de sol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,1 M. y se lleva a 1ml: sol 1 mM

*Solución de DMSO al 2 %*

*Medio de Reparación:* 900 µl RPMI + 100 µl SFB

*Solución de lisis stock:* 2,5 M NaCl +100 mM Na<sub>2</sub>EDTA +10 mM Tris Ajustar pH 10 con NaOH

*Solución de lisis final:* 40 ml de solución stock + 5 ml DMSO + 400 µl Tritón. Preparar inmediatamente antes de su uso. Refrigerar a 4 °C, 30-60 min antes de usar

*Soluciones stock de electroforesis:* A) 10 N NaOH; B) 200 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 10

*Buffer de electroforesis final:* 30 ml solución A + 5 ml solución B + H<sub>2</sub>O csp 1 litro de buffer de electroforesis, pH>13.

*Buffer de neutralización:* 0,4M Tris. Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado

*Solución de Tinción:* 2 µg/ml Bromuro de Etidio

- Preparación de las muestras

*Dilución de la sangre:* 50 µl de Sangre heparinizada + 940 µl de RPMI 1640. Se determina primero la viabilidad.

- Técnica Operatoria

Se agregó a cada muestra 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (concentración final por tubo 10 µM) y se incubó a 37 °C durante 10 min. Se agregó 0,5 ml de la solución de DMSO para detener el daño oxidativo, se centrifugó a 1000 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las células 2 veces con RPMI 1640 para eliminar restos de peróxido. Luego del último lavado, se agregó a las células 1 ml del medio de reparación y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos se centrifugó a 1000 g a 4 °C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos en baño de hielo para inhibir reparaciones posteriores, se armaron los preparados y se prosiguió con el ensayo tal como se describió en el punto 2.3.3.2.

- Cálculos

Se cuantificaron 100 células por muestra, 50 en cada réplica. Se calculó el Índice de daño Ensayo de Reparación:  $IDER = n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4$ , donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño. La categoría 0 no se incluyó en el índice.

Los resultados se expresaron como IDER.

#### **2.3.3.4. Ensayo Cometa modificado para la detección de bases oxidadas con el uso de endonucleasas de reparación bacterianas: Sitios FPG (Collins y col., 1997)**

- **Fundamento**

Para evaluar la presencia de lesiones oxidativas en el ADN se ha propuesto un modelo enzimático que puede ser usado en la versión alcalina del EC. Las células expuestas (*in vitro* a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o *in vivo* a agentes oxidantes) se lisan de la forma habitual, se incuban los nucleoides resultante con la enzima FPG durante 30 minutos a 37 °C, y luego se continúa con el EC estándar descrito en 2.3.3.2 con modificaciones.

- **Reactivos y soluciones**

*Agarosa de punto fusión normal (APFN)* al 1 %

*Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF)* al 1%

*Buffer de Reacción de la enzima FPG:* 40 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 0,2 mg/ml BSA, se ajusta a pH 8 con KOH.

*Solución de la Enzima para el ensayo:* 1/250 con el buffer de reacción de la enzima, conservar en alícuotas de 50 µl a -80 °C

*Solución de lisis stock:* 2,5 M NaCl +100 mM Na<sub>2</sub>EDTA +10 mM Tris Ajustar pH 10 con NaOH.

*Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM:* Se toma 11,5 µl de sol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 volúmenes y se lleva a 1ml: sol 0,1 M, se tomar 10 µl de sol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,1 M. y se lleva a 1ml: sol 1 mM

*Solución de lisis final:* 40 ml de solución stock + 5 ml DMSO + 400 µl Tritón. Preparar inmediatamente antes de su uso. Refrigerar a 4 °C, 30-60 min antes de usar

*Soluciones stock de electroforesis:* A) 10 N NaOH; B) 200 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 10

*Buffer de electroforesis final:* 30 ml solución A + 5 ml solución B + H<sub>2</sub>O csp 1 litro de buffer de electroforesis, pH>13.

*Buffer de neutralización:* 0,4M Tris. Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado

*Solución de Tinción:* 2 µg/ml Bromuro de etidio

- **Preparación de las muestras**

*Dilución de la sangre:* 50 µl de Sangre entera anticoagulada con heparina + 950 µl de RPMI 1640 se colocan en estufa de 37 °C durante 60 minutos. Se determinó primero la viabilidad de la muestra y posteriormente se centrifugó a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se utilizó el sedimento para realizar los preparados.

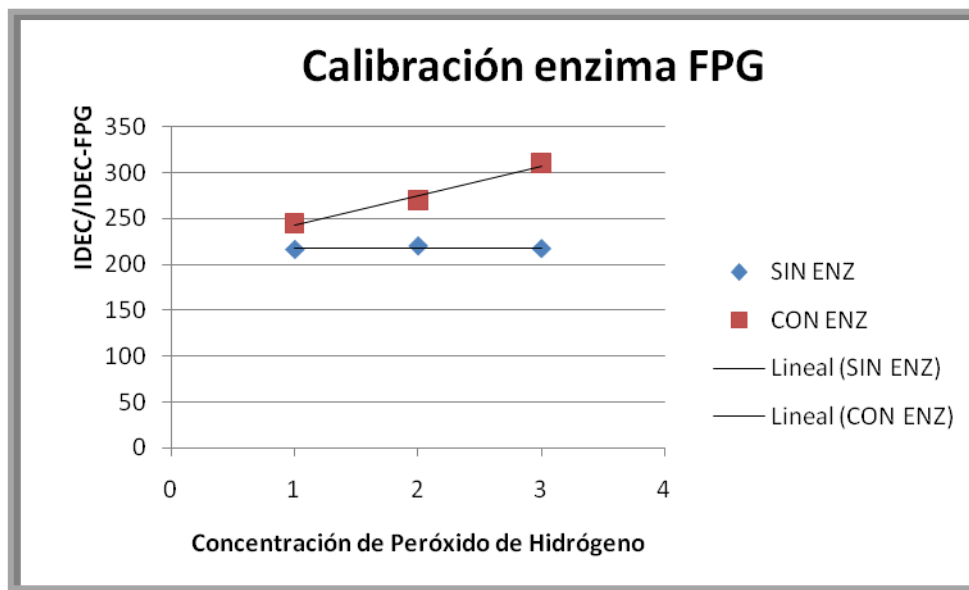
- Técnica Operatoria

Se realizaron los preparados tal como se describió en el punto 2.3.3.2. pero sin el agregado de la última capa de ABPF. Se colocaron los preparados en la solución de lisis, se retiraron luego de 120 minutos, siempre en zona de oscuridad, se lavaron los preparados 3 veces por 5 min con el buffer de reacción de la enzima a 4 °C y se secaron cuidadosamente con papel tisú. Por cada muestra se realizaron dos preparados, a uno se le agregó 50 µl de buffer de reacción y al otro 50 µl de la dilución de la enzima, se incubaron cubiertos con cubreobjeto en cámara húmeda: 30 min a 37°C y se continuó con el ensayo como fuera descrito en 2.3.3.2.

- Cálculos y Calibrados

Se determinó el IDEC o el IDEC-FPG según se tratara del preparado que solo se agregó buffer o se agregó la dilución de la enzima. Para cada muestra se calculó la diferencia entre IDEC-FPG e IDEC y el resultado se expresó como Sitios FPG.

Se realizó una curva de titulación de la enzima con concentraciones fijas de peróxido (25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y concentraciones de enzima entre 1/100 hasta 1/3000. Se seleccionó la dilución 1/250 como la más apropiada para las condiciones de trabajo. Se realizó una curva de calibrado con la dilución 1/250 y concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 2.7). Sobre los preparados con las células montadas se colocaron 50 µl de 10, 15 o 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se incubaron a 37 °C por 30 minutos en cámara húmeda, siendo posteriormente colocados en solución de lisis. Para cada concentración se determinó IDEC e IDEC- FPG.



**Figura 2.7. Calibración de la enzima FPG**



### **2.3.3.5. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal (Holland y col., 1998)**

- **Fundamento**

Los Micronúcleos se originan durante la división celular. El material genético contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera equivocada debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN. Los MN se pueden generar de manera espontánea o como respuesta a la acción de agentes aneugénicos o clastogénicos, que generan la pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, que no se incorporan correctamente al núcleo de la célula hija, y originan un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado micronúcleo. Esto puede ser visualizado como una masa de cromatina, que tiene la forma de un núcleo pequeño, y que aparece cerca del núcleo principal.

- **Reactivos y soluciones**

*Buffer celular:* 0.1M Na<sub>2</sub> EDTA, 0.01 Tris-HCl and 0.02M NaCl, pH 7

*Solución de tinción:* 100 µg/ml Naranja de Acridina

- **Preparación de las muestras**

Se raspó el interior de ambas mejillas del dador con un cepillo dental pequeño, que fue posteriormente colocado en un tubo cónico (Falcon) conteniendo 3 ml del buffer celular.

- **Técnica Operatoria**

Las células se lavaron tres veces con 3 ml del buffer celular, homogeneizando con vortex suavemente en cada paso y seguidos de centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Luego de la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 0,5 ml del buffer celular. Se homogeneizó nuevamente y se goteó con pipeta desde una altura de 20 cm. aproximadamente sobre portaobjetos precalentados en estufa (a 50°C), cubriendo todo el portaobjeto sin gotear dos veces en el mismo lugar. Se realizaron 4 portas por cada muestra, se secaron en estufa de 37 °C provista con geles deshidratantes. Una vez secos, se fijaron en metanol frío por 30 minutos y se secaron nuevamente. Antes de la observación al microscopio se colorearon con la solución de tinción. Las muestras se analizaron bajo microscopio de fluorescencia (Olympus CX 40 equipado con un filtro de excitación U-RFLT 50) a 400X.

▪ Cálculos y Calibrados

Se contaron un total de 2000 células por cada donante, aproximadamente 500 de cada porta. Sólo se analizaron células que no se encontraron superpuestas con otras o dobladas y que poseían el núcleo intacto. Aquellas células que estaban atravesando un proceso de degeneración como cariorrexis o cariolisis y/o fragmentación nuclear no se incluyeron.

La frecuencia de MNMB se expresó como las células con MN sobre 1000 células epiteliales normales.

El criterio para la identificación de los MN fue el siguiente:

- 1) debían tener un tamaño menor a  $1/3$  del núcleo principal,
- 2) estar en el mismo plano focal,
- 3) tener el mismo color y refracción que el núcleo principal,
- 4) tener forma redondeada o levemente ovalada, y
- 5) estar separados del núcleo principal o si sus bordes se tocan, que sean totalmente distinguibles.

#### **2.4. Métodos Estadísticos**

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows (2005). Se testeó la normalidad de todos los biomarcadores propuestos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene.

Según se comprobaron o no los supuestos de normalidad, se utilizaron test a) Paramétricos: Test T, Test de Dunnet o ANOVA o b) no paramétricos: Kruskal-Wallis (K-W) o Mann-Whitney (U-Test) para comparar los diferentes grupos en función de los distintos parámetros analizados (bioquímicos, enzimáticos o de genotoxicidad), los factores de confusión (sexo, edad, hábitos, tiempo de residencia) o los parámetros laborales (tarea realizada, antigüedad laboral, equipo de protección, mezclas de plaguicidas utilizadas).

Para evaluar la relación existente entre las variables cuantitativas se utilizó el análisis de correlación de Spearman. Utilizando estadística multivariada, se realizó la matriz de similaridad (Software NTSYS pc 21), lo que permitió observar la relación entre todas las variables, tanto cualitativas como cuantitativas. Las variables cuantitativas fueron

dicotomizadas (0 y 1), escogiendo como criterio de dicotomización: 0 para los valores menores de la mediana y 1 para los valores que superaban la mediana.

En estudios de casos y controles, Odds Ratio (OR) permite reconocer diferentes parámetros como factores de riesgo o de protección de una exposición, además de identificar la magnitud o fuerza de la asociación, lo que permite hacer comparaciones. Se evaluó la influencia de factores como exposición, edad, hábito de fumar o de consumir alcohol, escolaridad secundaria, tiempo de residencia y las variables laborales como el uso de EPP y la antigüedad laboral sobre cada uno de los marcadores utilizando los OR mediante el software Epi-info

3.4.3.

**CAPÍTULO 3**

**Cultivos Intensivos:**

**Trabajadores rurales y aplicadores**

**de plaguicidas**

### 3.1. Antecedentes

El uso de plaguicidas en cultivos de frutos y hortalizas es una práctica extendida en el Cinturón verde del Dpto. La Capital (Santa Fe, Argentina). La aplicación de mezclas de productos agroquímicos se realiza en forma simultánea y/o secuenciada, muchas veces en condiciones de extrema precariedad en cuanto a elementos técnicos, de protección personal, preparación y almacenamiento.

Existen antecedentes que reflejan la problemática de las condiciones de vida de los trabajadores de los cinturones hortícolas argentinos y su evolución en los últimos años. El trabajo informal, que además incluye el manejo inadecuado de fitosanitarios, muchas veces está relacionado a aspectos culturales de los grupos sociales implicados (Propersi y col., 2008; Souza-Casandinho y Bocero, 2008).

Es importante definir entonces a los posibles grupos humanos involucrados en este sistema de cultivos intensivos. En primer lugar, el trabajador de las quintas hortícolas (en adelante denominado trabajador rural), puede estar relacionado económicamente con sus “patrones” con el sistema de “pago a destajo” donde el trabajador es contratado para realizar una serie de tareas específicas, como carpir o cosechar, con pago puntual según la tarea realizada. La retribución está determinada por los surcos deshierbados o cajones cosechados y por lo general las tareas asignadas incluyen pasos repetitivos de fácil comprobación. Estos trabajadores no aplican agroquímicos, debido a la dificultad de medir todos los pasos implícitos en la tarea y así poder realizar un pago acorde al trabajo ejecutado (Souza-Casandinho, 2007).

La aplicación de fitosanitarios es una tarea destinada a los “medieros”. En la horticultura, la mediería está fuertemente asociada a la presencia de migrantes bolivianos dispuestos a ocuparse en este mercado de trabajo. Habitualmente estos medieros además del trabajo de su grupo doméstico aportan otros trabajadores, insumos e inclusive capital, otorgándole a la relación el carácter de una sociedad asimétrica. Su condición de migrantes limítrofes acentúa la asimetría de la relación que establecen con los productores, profundizándose su condición de socio menor (Benencia y Souza Casandinho, 1993).

En último término, el productor, es el propietario o arrendatario de las tierras; es quien organiza, administra y supervisa el predio donde se realizan actividades hortícolas. Posee el factor capital y como tal puede adquirir el resto de los elementos productivos. Es quien

determina las estrategias de producción en general y los criterios de manejo de los cultivos en particular. Dentro de estas pautas de manejo se encuentra el control de plagas y las estrategias de aplicación (Souza-Casadinho, 2007).

Diversas consideraciones deben hacerse para evaluar las estrategias de producción. La presión ejercida por los consignatarios para la entrega de productos “limpios” promueve que los pequeños productores apliquen “recetas caseras”, determinando una tendencia hacia la aplicación de plaguicidas, especialmente cuando los comerciantes realizan adelantos de dinero para el cumplimiento de tal objetivo. Se evidencia un énfasis en la “calidad formal” de los productos, caracterizada por un realce en sus propiedades externas –brillo, color, homogeneidad en el tamaño, ausencia manchas o picaduras–, en detrimento de su “calidad real”, la que puede definirse como la ausencia de restos de agroquímicos, contenido de vitaminas, de oligoelementos, etc. La necesidad de presentar un producto libre de manchas determina un incremento en la aplicación de plaguicidas, fundamentalmente insecticidas y funguicidas. Entre los elementos con mayor peso en estas decisiones se encuentran el precio de las hortalizas y la información brindada por los proveedores de insumos. La horticultura es una actividad compleja por sus múltiples aristas, dinámica por sus cambios continuos y por las necesidades de sus protagonistas de adaptarse a los requerimientos comerciales (Souza-Casadinho, 2007).

Las prácticas de higiene y protección utilizadas por los trabajadores rurales son, por lo general muy precarias y determinan los resultados hallados en los estudios, particularmente en aquellos realizados en los países en desarrollo. Las diferentes situaciones laborales, las mezclas usadas, los cambios en las formulaciones y las diferentes prácticas agrícolas de región en región obligan a una constante reevaluación de los resultados y su relación con los efectos sobre la salud humana.

Una vez reunida la información que permita describir las características de la población en una determinada región, es necesaria la planificación del monitoreo aplicando un conjunto de biomarcadores que contribuya a la detección temprana de los efectos de los agroquímicos sobre la salud.

### **3.2. Objetivos específicos del Capítulo**

- 1) Evaluar el daño generado por exposición a mezclas simultáneas de pesticidas en trabajadores rurales y aplicadores de plaguicidas en cultivos intensivos y confrontarla, en todos los casos, con una población no expuesta (grupo control).
- 2) Caracterizar la exposición mediante la determinación de las actividades de Butirilcolinesterasa Plasmática y Acetilcolinesterasa Eritrocitaria en ambas poblaciones.
- 3) Evaluar el efecto de los plaguicidas sobre el estado oxidativo midiendo la actividad de CAT como marcador del sistema antioxidante y los niveles de TBARS como marcador de la peroxidación de lípidos en los eritrocitos de ambos grupos.
- 4) Aplicar el Ensayo Cometa y Ensayo de Reparación en los linfocitos de sangre periférica de los trabajadores y controles para evaluar el efecto de las mezclas de plaguicidas y su acción sobre el ADN.
- 5) Integrar los resultados de acuerdo a las variables tenidas en cuenta en la anamnesis de los trabajadores y de los controles, considerando criterios de inclusión, exclusión y aquellos que actúen como factores de confusión en el estudio.

### **3.3. Materiales y Métodos**

#### **3.3.1. Biomarcadores utilizados en la población de cultivos intensivos**

Para evaluar a los trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos se utilizaron como biomarcadores:

##### **1- Medición de la actividad de enzimas Colinesterasas**

- 1.1. Acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE)
- 1.2. Butirilcolinesterasa plasmática (BChE)

##### **2- Marcadores del Estado Oxidativo**

- 2.1. Actividad Catalasa en eritrocitos
- 2.2. Medición de peroxidación de lípidos en eritrocitos (ensayo de TBARS)

### **3- Marcadores de Genotoxicidad**

- 3.1. Ensayo Cometa en sangre periférica
- 3.2. Ensayo de Reparación utilizando el Ensayo cometa

Las metodologías empleadas fueron descriptas en el Capítulo 2.

#### **3.3.2. Área productiva**

En el año 2001, la actividad económica principal del Cinturón Hortícola de Santa Fe (Distritos Ángel Gallardo, Monte Vera, Recreo y Santa Fe Norte) reunía 250 explotaciones con 3200 hectáreas. Sin embargo se ha producido (a expensas del incremento de cultivos extensivos, principalmente de soja) una disminución de la zona cultivada con hortalizas, que coincide con la disminución de las superficies destinadas a la producción hortícola planteadas por Benencia (1997) y por Propersi (2006). En la actualidad, esta actividad solo reúne 120 explotaciones (1500 hectáreas) donde residen los grupos familiares de trabajadores de huerta (Ministerio de la Producción de Santa Fe, 2007).

La evaluación se realizó en 18 explotaciones del Departamento La Capital, que incluyó las localidades: Ángel Gallardo, Recreo, Candiotti, Monte Vera y los barrios de la zona norte de la ciudad de Santa Fe: Chaco Chico y Altos del Valle.

#### **3.3.3. Población de trabajadores de cultivos intensivos**

En este Capítulo se expone la evaluación de 105 sujetos de ambos sexos que viven y trabajan en el cordón hortícola del departamento La Capital (Prov. de Santa Fe, Argentina) y del grupo control que estuvo compuesto por 112 donantes que no realizaban actividades laborales relacionadas con la exposición a pesticidas. Todas las personas incluidas pertenecían a la misma área geográfica, con condiciones socio-demográficas semejantes.

El muestreo tanto de los trabajadores como de los controles se realizó en forma simultánea en el período de mayor actividad hortícola, que incluye los meses de marzo a octubre de los años 2007 y 2008.

La educación, como otros aspectos culturales, debe ser tenida en cuenta durante la redacción de las preguntas del cuestionario, siendo fundamental considerar el lenguaje de la población encuestada para que todos comprendan las preguntas y así evitar el sesgo de información que se produce cuando los participantes interpretan o responden de manera diferente a la misma



pregunta. En consecuencia, se solicitó la colaboración del equipo de salud del Hospital Protomédico “José Rodríguez”, Monte Vera, Santa Fe (Argentina), que a través de su personal facilitó el acercamiento con la población. Las encuestas y tomas de muestras se realizaron directamente en las explotaciones en compañía de los asistentes sociales, lo que permitió tener el acceso a la población en su lugar de trabajo e incluso poder obtener información que en ocasiones los trabajadores desconocían como los nombres de los pesticidas empleados, utilizando para este fin las etiquetas de los envases.

Luego que los donantes fueran informados de los objetivos del trabajo y dieran su consentimiento para participar del estudio, se realizó la encuesta (Anexo I).

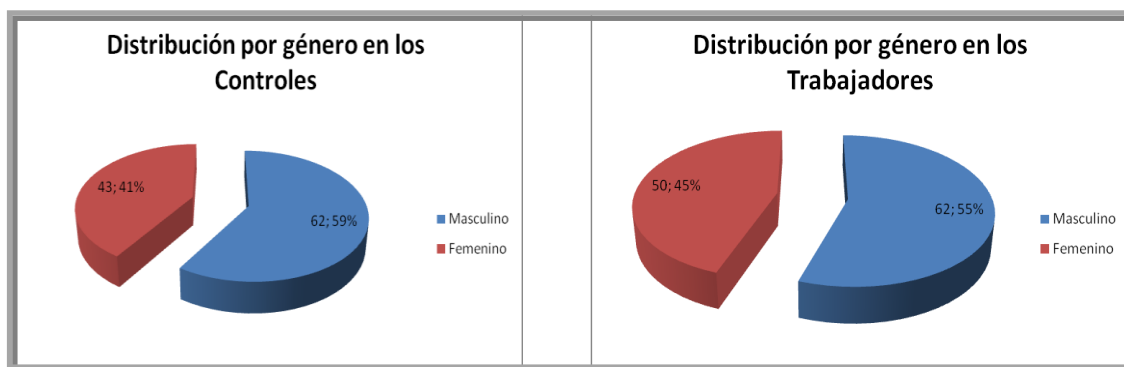
En función de los datos obtenidos, los trabajadores fueron agrupados según su actividad en expuestos directos e indirectos. Los aplicadores de pesticidas o expuestos directos, fueron aquellas personas que en los siete días previos a la toma de muestra sanguínea habían realizado actividades de fumigación. Los trabajadores rurales o expuestos indirectos, comprenden a las personas que residen en la proximidad de los cultivos (a no más de 100 metros de distancia) y realizan diferentes actividades agrícolas distintas a la fumigación: desmalezamiento, siembra, cosecha, etc.

### **3.4. Resultados del Capítulo**

#### **3.4.1. Descripción socio-demográfica y hábitos de expuestos y controles**

El promedio de edad del grupo de trabajadores es de  $35,37 \pm 15,17$  años y del grupo de controles es de  $37,70 \pm 14,07$  años, con un rango comprendido entre 18 y 65 años de edad para todos los voluntarios incluidos. Al comparar ambos grupos usando test-T no se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad ( $P=0,763$ ).

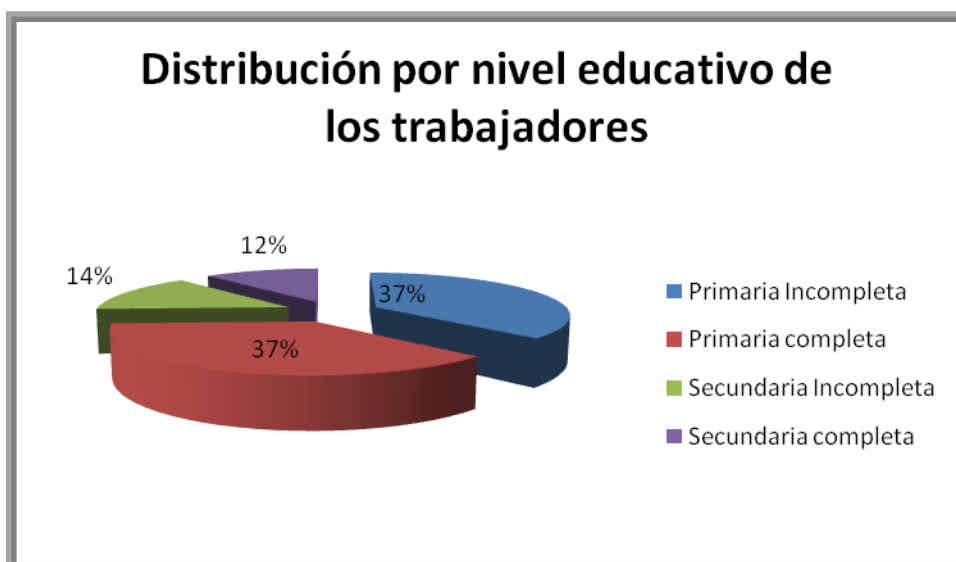
La distribución por género para los trabajadores es del 41% ( $n=43$ ) para el sexo femenino y 59% ( $n=62$ ) para el sexo masculino, para los controles es del 51% ( $n=46$ ) para el sexo femenino y 61% ( $n=54$ ) para el sexo masculino. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto al sexo entre expuestos y controles (U-test,  $P=0,997$ , Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Distribución por género: **a.** de los controles (izquierda),  
**b.** de los trabajadores de cultivos intensivos (derecha).

En el grupo de trabajadores se consultó respecto a la distancia de sus hogares a los cultivos y el tiempo de residencia. Todos los trabajadores vivían en las cercanías de los cultivos y el promedio de años de residencia fue de  $19,16 \pm 10,98$  años. Todas las viviendas estaban construidas en ladrillo aunque algunas tenían techo de paja y los servicios sanitarios eran precarios. El 97% de las viviendas carecían de agua de red y utilizaban agua de pozos artesanales.

El análisis del nivel educativo de los trabajadores se muestra en la Figura 3.2 donde se destaca que los individuos expuestos tienen una alta tasa de escolaridad primaria completa e incompleta. El 26% accede a una educación secundaria pero ningún trabajador accedió a un nivel terciario o universitario.



**Figura 3.2.** Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos por el nivel educativo.

Con referencia al acceso a cuidados de la salud, los sujetos del estudio utilizan los servicios de Salud Pública (Hospitales provinciales y SAMCos). No poseen Obra Social ni revisten bajo una ART de modo que no poseen controles ocupacionales. Solo seis trabajadores refirieron haber concurrido a estos servicios sanitarios públicos por problemas generados por la exposición a plaguicidas.

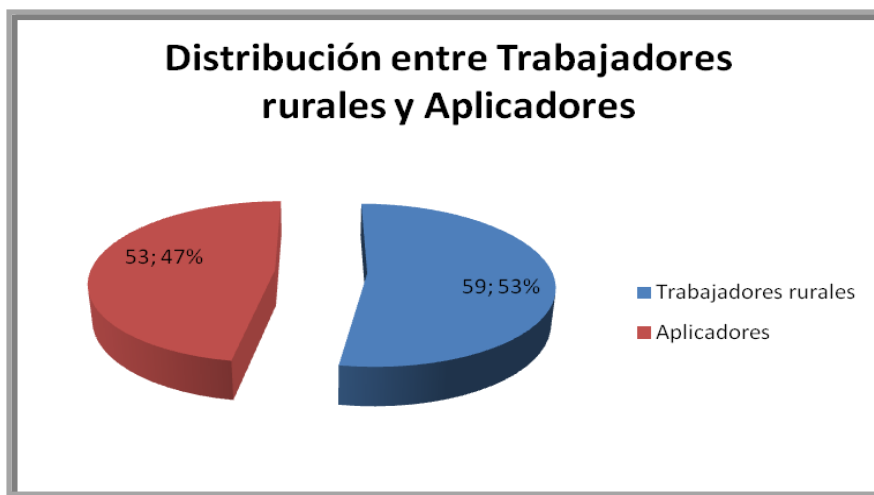
Los hábitos de los individuos de ambos grupos expuestos y del grupo control son presentados en la Tabla 3.1, donde se puede observar que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni en el hábito de fumar ni en el consumo de alcohol entre ambas poblaciones.

**Tabla 3.1.** Categorización de los trabajadores y controles en función de los hábitos de fumar y consumir alcohol (n y %) y comparación estadística entre ambas poblaciones.

<b>Parámetros</b>	<b>Controles (n=105)</b>	<b>Trabajadores (n=112)</b>	<b>Valor de P (U-Test)</b>
<b>Fuma (n) (%)</b>			
<b>Si</b>	17 (16)	15 (13)	0,875
<b>No</b>	88 (84)	97 (87)	
<b>Alcohol (n) (%)</b>			
<b>Si</b>	55 (52)	61 (54)	0,667
<b>No</b>	50 (48)	51 (56)	

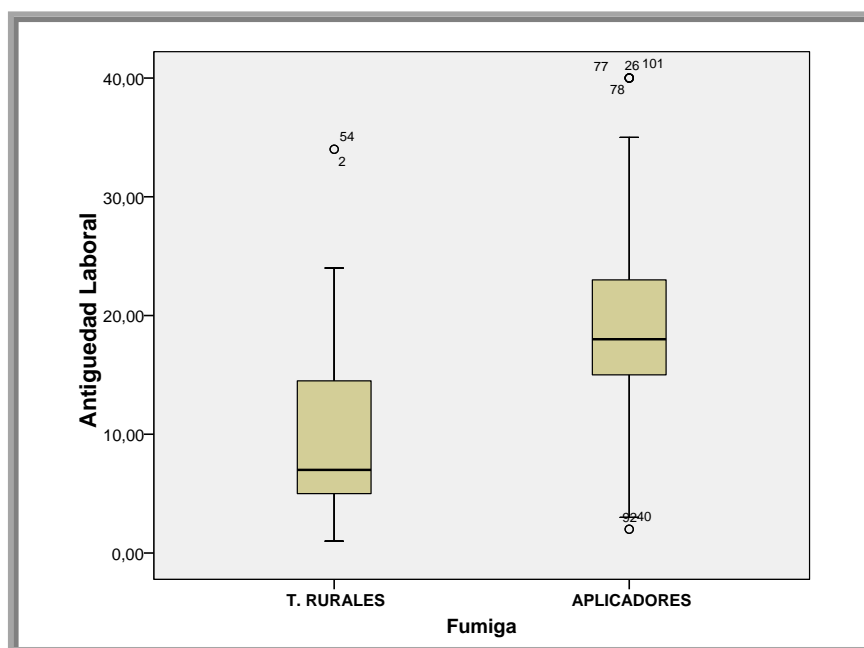
#### **3.4.2. Análisis de datos laborales de los trabajadores rurales y aplicadores**

De los 105 trabajadores incluidos en la evaluación, 53 eran aplicadores (expuestos directos) y 59 eran trabajadores rurales que realizaban otras tareas diferentes a la pulverización de plaguicidas (expuestos indirectos) (Figura 3.3)



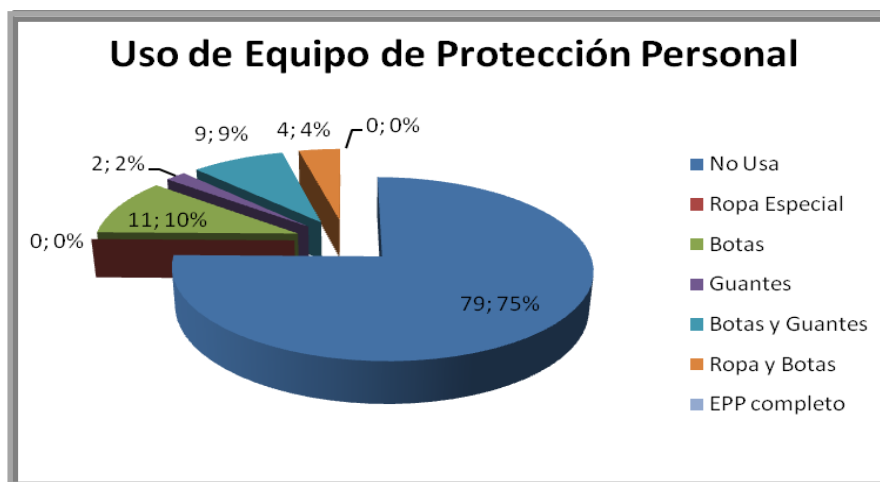
**Figura 3.3.** Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función de las tareas realizadas.

La antigüedad laboral de los expuestos indirectos fue del  $10,27 \pm 7,80$  años, y de  $19,15 \pm 10,26$  años para los expuestos directos, siendo en todos los casos la jornada laboral mínima de 8 horas (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a la antigüedad laboral.

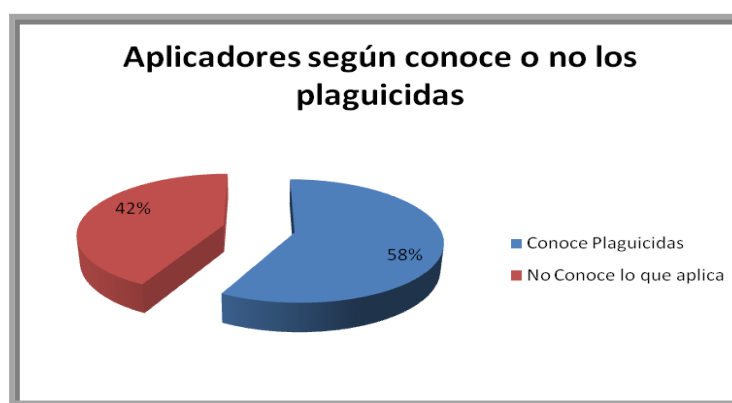
Al analizar los datos referidos al uso de equipo de protección personal, se observa que ningún trabajador o aplicador utiliza el equipo de manera adecuada. El 75% no usa ningún tipo de protección, y solo el 13% utiliza al menos 2 elementos para protegerse (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función del uso de equipo de protección personal.

Si se realiza el análisis utilizando el tipo de tarea como factor, se observa que solo utilizan protección los aplicadores mientras que el 100% de los trabajadores rurales no usa ningún EPP.

En relación al conocimiento del tipo de producto químico con el que se encuentran trabajando, cuando se consultó a los aplicadores si conocían las sustancias que utilizaban para pulverizar, el 42% respondió no conocer y no pudo dar ningún nombre de los plaguicidas empleados (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Distribución de los trabajadores de cultivos intensivos en función del conocimiento de los plaguicidas empleados.

Para conocer los plaguicidas empleados en el área de estudio, se recurrió a las encuestas y en los casos en que los trabajadores desconocían el producto que utilizaban, se les solicitó acceso al depósito donde guardaban los envases. Los pesticidas fueron clasificados de acuerdo a su

acción sobre vectores específicos. Se detalla en cada caso el número de CAS, la clase química a la que pertenecen y las evaluaciones realizadas por la IARC, U.S.EPA y la OMS para cada uno (Tabla 3.2)

**Tabla 3.2.** Muestra los plaguicidas que utilizaron los aplicadores clasificados por su acción.

Pesticidas	Compuestos	Número CAS	Clase Química	IARC	U.S. EPA	OMS	
<b>Fungicida</b>	Captan	133-06-2	Tioftalimida	3	Probable	U	
	Cobre	7440-50-8	Cobre Inorgánico	NL	D	NL	
	Tiofanato metilo	23564-05-8	Benzimidazol	NL	Probable	U	
	Mancozeb	8018 01 7	Ditiocarbamato- Zinc	NL	B2	U	
<b>Insecticida-Nematicida</b>	Clorpirifos	2921-88-2	Organofosforado	NL	E	II	
	Cipermetrina	67375-30-8	Piretroide	NL	C	II	
	Dimetoato	60-51-5	Organofosforado	NL	C	II	
	Endosulfan	115-29-7	Organoclorado	NL	No Probable	II	
	Imidacloprid	105827-78-9	Neonicotinoide	NL	E	II	
	<b>Insecticida</b>	Malation	121-75-5	Organofosforado	3	Sugerido	III
		Metamidofos	10265-92-6	Organofosforado	NL	E	Ib
		Clorfenapir	122453-73-0	Pirazol	NL	Sugerido	II
		Paration	56-38-2	Organofosforado	3	C	Ia
		Permetrina	54774-45-7 51877-74-8	Piretroide	3	Sugerido	II
<b>Herbicida</b>	Glifosato	1071-83-6	Fosfonoglicina	NL	NL	III	

**Evaluaciones de carcinogenicidad:**

**IARC (Agencia Internacional de investigación de cáncer)**

**Grupo 1:** Conocido carcinógeno; **Grupo 2a:** Probable carcinógeno; **Grupo 2b:** Posible carcinógeno; **Grupo 3:** No clasificable como carcinógeno datos incompletos o ambiguos; **Grupo 4:** Probablemente no carcinógeno **NL:** No Listado

**Clasificación de Carcinogenicidad US EPA**

Entre 1986 y 1996: **Grupo A:** Conocido carcinógeno en humanos; **Grupo B1:** Probable carcinógeno humano; **Grupo B2:** Suficiente evidencia de carcinogenicidad para animal de estudio; **Grupo C:** Posible carcinógeno humano; **Grupo D:** No clasificable como carcinógeno humano; **Grupo E:** Evidencia de no-carcinogenicidad para humanos.

Entre 1996 y 1999: Conocidos/Probables carcinógenos; No se puede determinar; No probable

Desde 1999 al presente: Carcinógeno para humanos; Probable carcinógeno; Sugerido pero no suficiente para ser carcinógeno; Datos inadecuados para ser carcinógeno; No probable.

**Clasificación de toxicidad aguda de la OMS:** **Ia:** extremadamente peligroso **Ib:** altamente peligroso; **II:** Moderadamente peligroso; **III:** levemente peligroso; **U:** Es poco probable produzca un peligro grave en el uso normal.

Con el objeto de realizar un análisis exhaustivo de las mezclas de plaguicidas empleadas, se tuvo en cuenta qué productos fueron utilizados durante los siete días previos a la toma de muestra en cada explotación visitada. En la Tabla 3.3 se presentan las posibles mezclas a las que los trabajadores en forma directa o indirecta estuvieron expuestos, para su posterior análisis y discusión.

**Tabla 3.3.** Mezclas de plaguicidas utilizadas considerando la localidad de la explotación y el número de trabajadores.

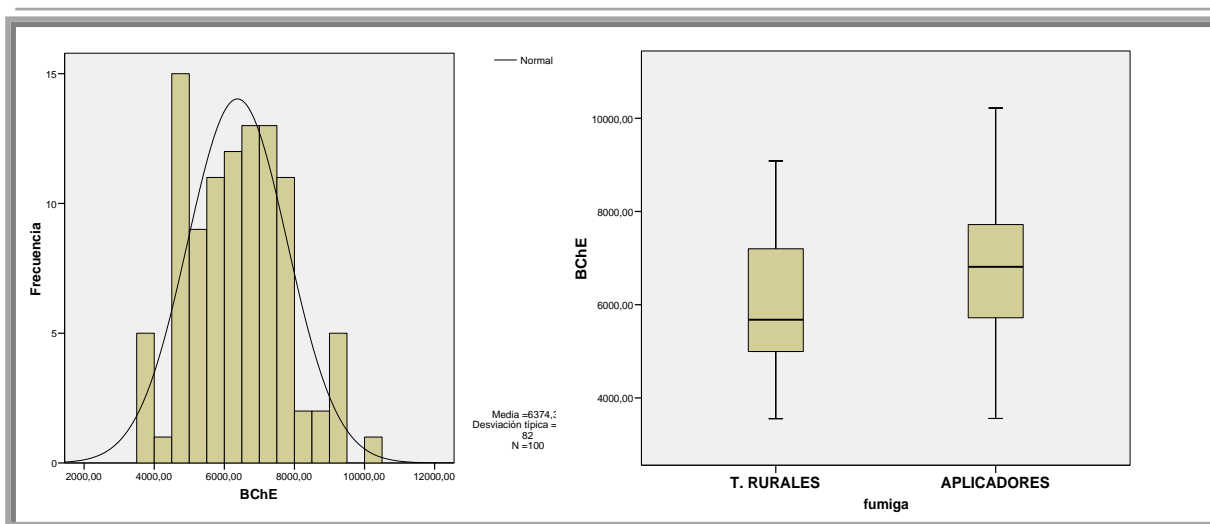
Nro. de Mezcla	Lugar	Nro. de trabajadores expuesto	Nombre comercial de los plaguicidas
0	Hospital Protomédico	10	Sin mención de los productos utilizados
1	Monte Vera	11	Metamidofos-Cipermetrina-Clorpirifos
2	Angel Gallardo	18	Cipermetrina-Clorpirifos- Sunfire (Clorfenapir)-Paration-Clorpirifos
3	Hospital Protomédico	20	Terminator (Clorpirifos)-Kalibre (Cipermetrina)-Paration-Clorpirifos
4	Chaco Chico	16	Ataque (Cipermetrina)-Paration-Punto 70 (Imidacloprid)-Cercobin (Benzimidazol)-Captan(Flusilazole+Carbendazim)-Dimetoato-Metafoz (Metamidofoz)-Manzate (Mancozeb)-Kalibre (Cipermetrina)
5	Recreo	18	Cipermetrina-Clorpirifos-Glifosato
6	Candioti	12	Dimetoato-Cipermetrina-Paration

### 3.4.3. Exploración estadística de los resultados de cada biomarcador.

#### 3.4.3.1. Estadística descriptiva de enzimas Colinesterasas

##### 3.4.3.1.1. Actividad de Butirilcolinesterasa plasmática en los trabajadores

En la Figura 3.7.a. se observa la distribución para este biomarcador cuyo valor promedio fue  $6374,39 \pm 1481 \text{ U l}^{-1}$  y su distribución se ajusta a la normal (test K-S,  $P=0,588$ ).



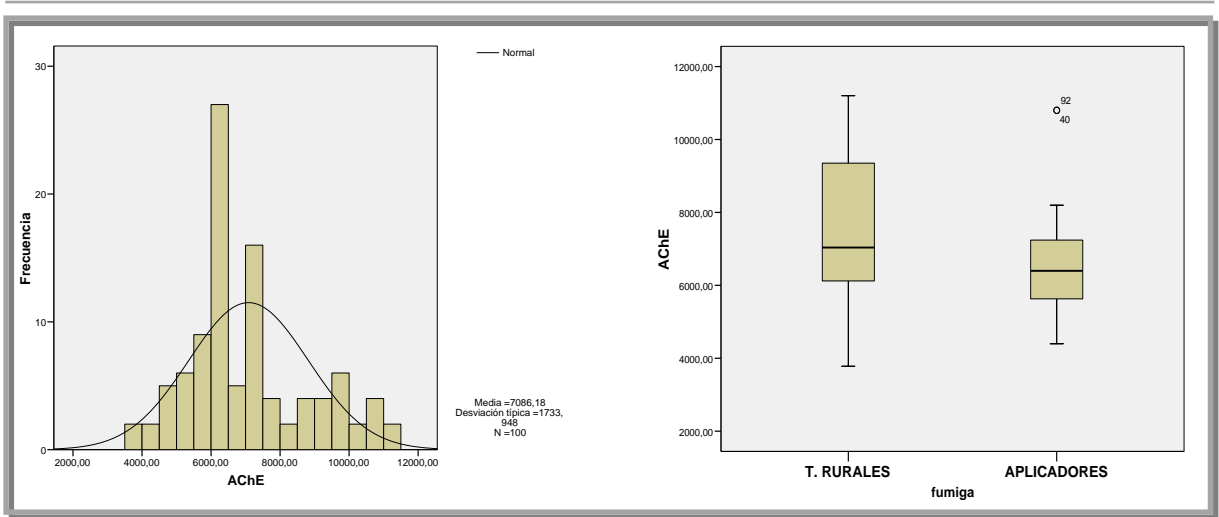
**Figura 3.7.a.** Distribución de los resultados obtenidos para BChE en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de BChE (derecha).

Al utilizar el tipo de labor realizada como factor de análisis, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (Test T,  $P=0,967$ ). Los valores encontrados fueron de  $6372,05 \pm 1338 \text{ U l}^{-1}$  para los trabajadores rurales y  $6805,93 \pm 1409 \text{ U l}^{-1}$  para los aplicadores (Figura 3.7.b).

#### 3.4.3.1.2. Actividad de Acetilcolinesterasa eritrocitaria en los trabajadores

En la Figura 3.8.a. se observa la distribución para AChE cuyo valor promedio fue  $7086,18 \pm 1733 \text{ U l}^{-1}$  de eritrocitos, y su distribución no se ajusta a la normal (test K-S,  $P=0,016$ ). Al utilizar el tipo de labor realizada como factor de análisis, se hallaron diferencias estadísticamente significativas (U-Test,  $P=0,017$ ). Los valores hallados fueron: trabajadores rurales  $7526,02 \pm 1913 \text{ U l}^{-1}$  de eritrocitos y  $6569,84 \pm 1341 \text{ U l}^{-1}$  de eritrocitos para los aplicadores (Figura 3.8.b).



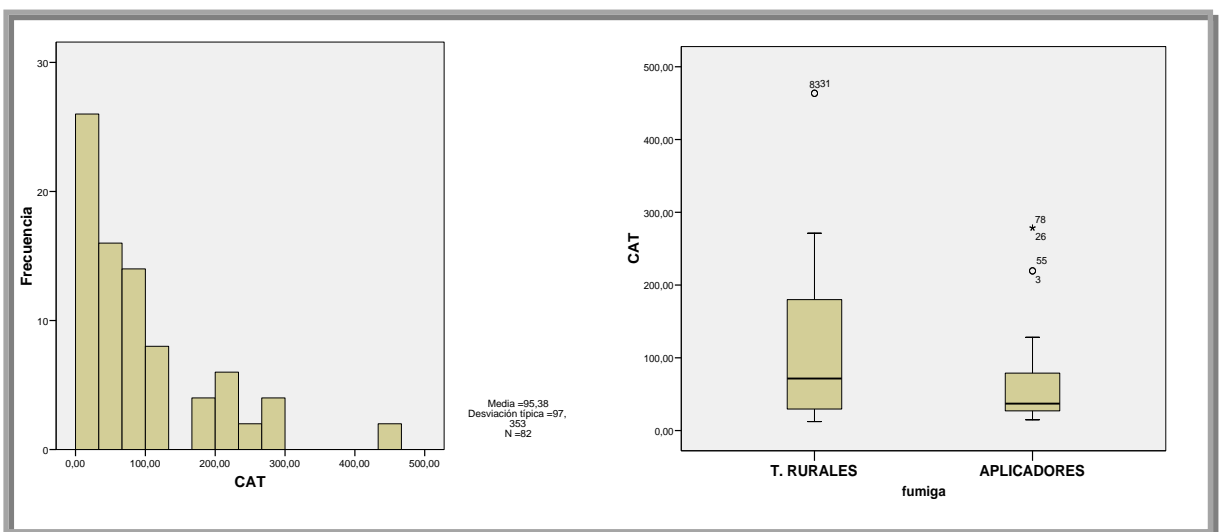


**Figura 3.8.a.** Distribución de los resultados obtenidos para AChE en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de AChE (derecha).

### 3.4.3.2. Estadística descriptiva de los marcadores del Estado oxidativo

#### 3.4.3.2.1. Actividad de Catalasa en los eritrocitos de los trabajadores

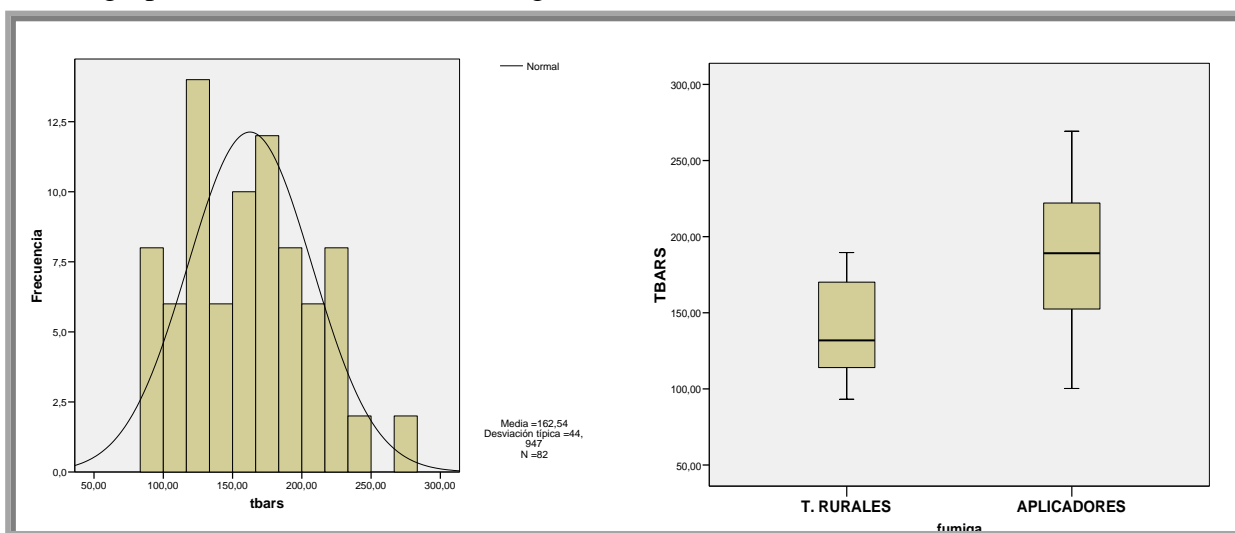
Dentro de los biomarcadores de estrés oxidativo, el valor promedio de la actividad de CAT fue  $95,37 \pm 59,37$  kU  $g^{-1}$  de Hb (Figura 3.9.a) y su comportamiento no se ajusta a una distribución normal (test K-S,  $P < 0,01$ ). La actividad de CAT en los trabajadores rurales fue de  $116,10 \pm 71,50$  kU  $g^{-1}$  de Hb, mientras que en los aplicadores fue de  $71,37 \pm 36,98$  kU  $g^{-1}$  de Hb (Figura 3.9.b), por lo tanto, como se puede observar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (U-Test,  $P = 0,127$ ).



**Figura 3.9. a.** Distribución de los resultados obtenidos para la actividad de CAT en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de CAT (derecha).

### 3.4.3.2.2. Medición de lípido peroxidación mediante TBARS en eritrocitos de trabajadores

El valor promedio de TBARS fue de  $162,54 \pm 44,94$  nmol  $g^{-1}$  Hb. (Figura 3.10.a) con un comportamiento se ajusta a una distribución normal (test K-S,  $P= 0,382$ ). Utilizando la actividad laboral como factor, los valores obtenidos fueron:  $139,70 \pm 32,03$  y  $188,98 \pm 43,49$  nmol  $g^{-1}$  Hb para indirectos y directos respectivamente (Figura 3.10.b). Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas (T-Test,  $P= 0,040$ ).

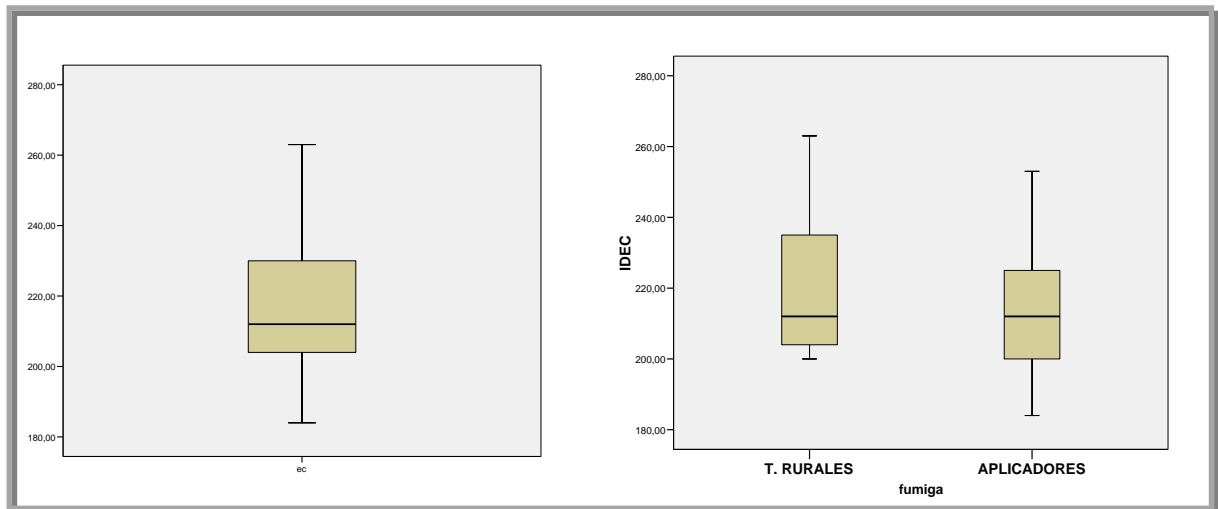


**Figura 3.10. a.** Distribución de los resultados obtenidos para la medición de TBARS en los eritrocitos de los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de TBARS (derecha).

### 3.4.3.3. Estadística descriptiva de los marcadores de Genotoxicidad

#### 3.4.3.3.1. Ensayo Cometa en linfocitos de sangre periférica de los trabajadores

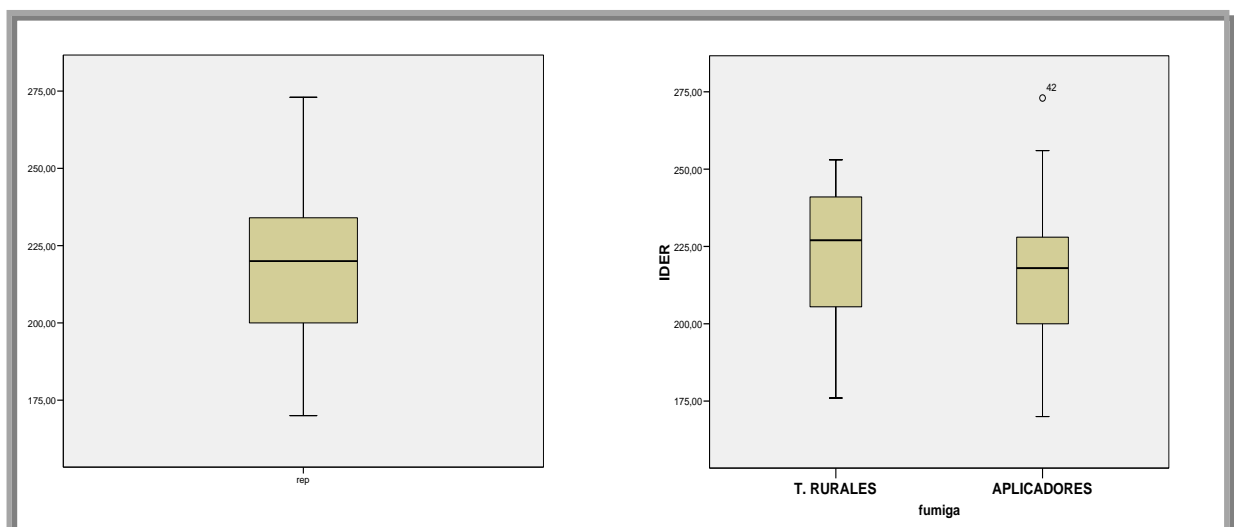
Cuando analizamos este biomarcador observamos que el valor promedio de IDEC del grupo en estudio fue:  $218,17 \pm 17,65$  (Figura 3.11 a) y la distribución no se ajustó a la normal (Test K-S,  $P= 0,009$ ). Los resultados obtenidos fueron  $220,91 \pm 19,27$  y  $214,65 \pm 14,80$ , para los expuestos indirectos y directos respectivamente (Figura 3.11.b), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (U-test;  $P=0,218$ ).



**Figura 3.11. a.** Distribución de los resultados obtenidos para IDEC en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de IDEC (derecha).

### 3.4.3.3.2. Ensayo de reparación en linfocitos de sangre periférica de los trabajadores

El análisis de los resultados obtenidos en el Ensayo de Reparación luego del daño oxidativo *in vitro* en los linfocitos de los trabajadores muestra el valor promedio de IDER:  $220,04 \pm 20,17$  (Figura 3.12 a) con una distribución que se ajustó a la normal (Test K-S,  $P=0,168$ ). Los resultados obtenidos fueron  $220,91 \pm 19,27$  y  $214,65 \pm 14,80$ , para los expuestos indirectos y directos respectivamente (Figura 3.12 b), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos (U-test;  $P=0,549$ ).



**Figura 3.12. a.** Distribución de los resultados obtenidos para IDER en los trabajadores de cultivos intensivos (izquierda). **b.** Gráfico comparativo (Box-Plots) entre trabajadores rurales y aplicadores respecto a los resultados obtenidos de IDER (derecha).

### 3.4.4. Estadística bivariada aplicada a los biomarcadores en controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos

Con el objeto de reunir los datos más relevantes obtenidos, a continuación se presentan las tablas que resumen los resultados de los biomarcadores utilizados en esta etapa tanto en la población expuesta como en la población control, considerando también el tipo de labor realizada por los trabajadores como factor (Tablas 3.4, 3.5 y 3.6).

**Tabla 3.4.** Valores promedio y desvío estándar de las actividades de Colinesterasas en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.

Actividades de Colinesterasas ( $\bar{X} \pm DE$ )	Controles (n=112)	Trabajadores Rurales (n=59)	Aplicadores (n=53)
<b>BChE</b> ( $U \Gamma^{-1}$ )	6875,60 $\pm$ 1257	6372,05 $\pm$ 1338*	6805,93 $\pm$ 1409
<b>AChE</b> ( $U \Gamma^{-1}$ de eritrocitos)	9303,98 $\pm$ 1960	7526,02 $\pm$ 1913*	6569,84 $\pm$ 1341*

BChE y AChE:  $P < 0,01$  Anova, \* $P < 0,01$  Test de Dunnet

En la Tabla 3.4. se observa que los trabajadores rurales muestran una disminución significativa de la actividad de ambas enzimas cuando se los compara con la población control ( $P < 0,01$ ; Test de Dunnet). AChE disminuyó un 20% y BChE un 7,5% aproximadamente. En cambio en los aplicadores solo disminuyó significativamente (30%) la AChE ( $P < 0,01$ ; Test de Dunnet).

**Tabla 3.5.** Valores promedio y desvío estándar de los marcadores del Estado oxidativo en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.

<b>Parámetros de Estado oxidativo (X±DE)</b>	<b>Controles (n=112)</b>	<b>Trabajadores Rurales (n=59)</b>	<b>Aplicadores (n=53)</b>
<b>CAT (kU g<sup>-1</sup>de Hb)</b>	138,95±34,37	116,10 ± 71,50*	71,37 ± 36,98*
<b>TBARS (nmol g<sup>-1</sup>de Hb)</b>	141,58±34,46	139,70 ± 32,03	188,98 ± 43,49**

CAT: P<0,01; Test de Kruskal-Wallis. \*P<0,01 Test de Mann-Whitney.

TBARS: P<0,01; Anova. \*\*P<0,01 Test de Dunnet.

Al analizar los biomarcadores de estado oxidativo en la Tabla 3.5 se observa un aumento estadísticamente significativo para los niveles de TBARS (33%) en los aplicadores de plaguicidas (Test de M-W, P<0,01), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de trabajadores rurales (P > 0,05).

Al mismo tiempo, la reducción de CAT fue del 48% en los aplicadores (Test de M-W, P<0,01) y un 15% en los trabajadores rurales (Test de M-W, P >0,05) respecto a la población control.

**Tabla 3.6.** Valores promedio y desvío estándar de los marcadores de Genotoxicidad en los controles, trabajadores rurales y aplicadores de cultivos intensivos.

<b>Parámetros de Genotoxicidad (X±DE)</b>	<b>Controles (n=112)</b>	<b>Trabajadores Rurales (n=59)</b>	<b>Aplicadores (n=53)</b>
<b>Ensayo Cometa (IDEC)</b>	138,95±34,37	220,91±19,27*	214,65±14,80*
<b>Ensayo de Reparación (IDER)</b>	141,58±34,46	223,35±19,64*	216,51±20,35*

IDEC e IDER: P<0,01 Test de Kruskal-Wallis, P<0,01 Anova, \*P<0,01 Test de Dunnet

En la Tabla 3.6 se analizan los biomarcadores de genotoxicidad. Previo a la realización del EC se evaluó la viabilidad y se expresó en función del porcentaje de células viables, dando como resultado que todas las muestras mostraron una viabilidad celular superior al 95 %. El análisis de los valores obtenidos para los marcadores de Genotoxicidad: Ensayo Cometa y Ensayo de Reparación (Tabla 3.6), mostró un aumento estadísticamente significativo de IDEC e IDER

(Test de Dunnet,  $P < 0,01$ ) en ambos grupos expuestos (trabajadores rurales y aplicadores) cuando se los comparó con el grupo control.

### 3.4.5. Análisis de la influencia de los factores de confusión sobre los biomarcadores

**Tabla 3.7.** BChE, AChE, CAT, TBARS, IDEC e IDER, en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión.

Parámetros	n	BChE (X±DE)	AChE (X±DE)	CAT (X±DE)	TBARS (X±DE)	IDEC (X±DE)	IDER (X±DE)
<b>Edad (años)</b>							
<35	34	6927,29±1383	6825,66±1909	86,96±68,64	183,10±59,14	209,40±14,83	213,58±24,85
≥35	19	6462,50±1484	6479,55±1098	65,01±70,31	191,37±36,41	216,58±14,46	217,52±18,50
<b>Género</b>							
Femenino	11	6425,75±2601	6539,25±293	68,57±63,75	199,08±34,04	224,75±14,15	219,00±9,00
Masculino	42	6842,14±1291	6572,76±1402	60,91±61,65	193,00±43,40	213,76±14,60	216,26±21,00
<b>Fuma</b>							
Si	9	6686,55±1894	6167,44±967	71,65±74,81	199,40±22,58	216,10±12,34	217,16±19,06
No	44	6834,97±1296	6667,72±1410	69,86±34,26	187,02±46,39	209,00±22,16	213,77±25,16
<b>Alcohol</b>							
Si	33	6762,20±1417	6609,14±1535	54,90±53,46	182,75±46,54	215,05±15,38	218,82±22,49
No	20	6929,83±1438	6458,50±519	133,14±90,94**	212,28±15,54	213,75±13,32	209,91±8,71
<b>Antigüedad laboral (años)</b>							
≤ 10	44	7096,12±1404	6762,00±1859	69,44±53,86	178,34±46,48	203,00±11,68	205,92±21,77
> 10	15	6069,30±1168*	6494,15±1100	72,26±76,80	193,89±42,07	219,33±13,29**	220,66±18,30*
<b>EPP</b>							
Si	26	6733,88±1305	7014,60±1565	65,74±59,95	161,82±40,37	210,38±14,64	221,00±22,04
No	27	6899,60±1562	6227,73±1046	81,01±65,85	204,82±37,56*	220,35±13,16*	213,03±18,20*

BChE ( $U L^{-1}$ ); AChE ( $U L^{-1}$  eritrocitos); CAT ( $kU g^{-1} Hb$ ); TBARS Assay ( $nmol g^{-1} Hb$ ); Ensayo Cometa (IDEC); Ensayo de Reparación (IDER). \*P:  $< 0,05$ ; \*\*P:  $< 0,01$  (Mann-Whitney Test)

El análisis de la Tabla 3.7 muestra que no se observan diferencias estadísticamente significativas en relación con los factores de confusión como edad, género y tabaquismo en los distintos biomarcadores para el grupo de aplicadores. El consumo de alcohol presenta diferencias estadísticamente significativas para la enzima CAT ( $P=0,001$ ). Cuando se evalúa como factor la antigüedad laboral, las diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas para BChE ( $P=0,024$ ), IDEC ( $P=0,001$ ) e IDER ( $P=0,032$ ).

Debido a que ningún trabajador utiliza adecuadamente el EPP y un 75% de los trabajadores no utilizan ninguna protección (guantes, máscaras de respiración, gafas, ropa protectora, botas, etc.), se ha considerado que han utilizado alguna medida protectora cuando al menos un elemento de protección estuvo presente. Cuando se utiliza como factor de comparación el uso de EPP se observan diferencias estadísticamente significativas para IDEC ( $P=0,022$ ), IDER ( $P=0,023$ ) y TBARS ( $P=0,007$ ) utilizando el U-Test.

**Tabla 3.8.** BChE, AChE, CAT, TBARS, IDEC e IDER, en trabajadores rurales estratificados por factores de confusión.

Parámetros	n	BChE (X±DE)	AChE (X±DE)	CAT (X±DE)	TBARS (X±DE)	IDEC (X±DE)	IDER (X±DE)
<b>Edad</b>							
<35	17	6664,47±1337	7164,42±1846	143,00±90,23	139,78±33,08	216,45±17,72	218,38±20,09
≥35	42	5506,64±1295	8244,94±1621	69,03±82,23*	139,56±30,45	231,76±19,30*	226,29±13,95
<b>Género</b>							
Femenino	39	5834,10±1416	7111,41±1580	109,89±91,41	149,51±31,72	214,94±14,21	216,94±18,50
Masculino	20	5852,25±1403	8186,25±2124	126,92±99,59	122,54±25,21	232,40±22,91	227,90±17,52
<b>Fuma</b>							
Si	6	5749,07±1421	7374,52±1834	116,01±107,08	140,21±32,08	218,72±16,97	219,94±18,58
No	53	6645,66±926	8370,00±1771	116,79±89,69	136,44±34,51	239,66±29,45	227,00±21,07
<b>Alcohol</b>							
Si	28	5726,35±1667	7371,16±1397	117,80±93,26	130,11±27,44	217,50±16,90	219,83±16,45
No	31	5966,35±1043	7591,57±2249	114,93±106,40	146,34±33,77	224,53±21,42	221,57±21,31
<b>Antigüedad laboral (años)</b>							
≤ 10	44	5648,13±1380	7124,84±183	112,70±98,84	146,57±32,60	215,43±16,14	217,97±18,90
> 10	15	6403,80±1344	8505,19±1447*	124,22±101,02	123,30±24,62	236,80±19,56**	228,53±16,50

BChE (U L<sup>-1</sup>); AChE (U L<sup>-1</sup> eritrocitos); CAT (kU g<sup>-1</sup> Hb); TBARS Assay (nmol g<sup>-1</sup> Hb); Ensayo Cometa (IDEC); Ensayo de Reparación (IDER). \*P: <0,05 \*\*P: <0,01 (Mann-Whitney Test)

Al analizar los datos relacionados con los trabajadores rurales (expuestos indirectos), no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) respecto a género, hábito de fumar y consumo de alcohol, encontrando este tipo de diferencias respecto a la edad para IDEC (P=0,013) y CAT (P=0,025), para AChE (P=0,014) e IDEC (P=0,001) respecto a la antigüedad laboral (Tabla 3.8).



### 3.4.6. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre los biomarcadores

Los resultados obtenidos para cada uno de los biomarcadores fueron analizados en función de las mezclas que utilizaron los trabajadores durante la última semana previa a la toma de muestra (Tabla 3.9), ya sea en forma de mezcla compleja o de aplicación consecutiva. Las diferencias entre los distintos agrupamientos fueron analizados mediante el Test de K-W.

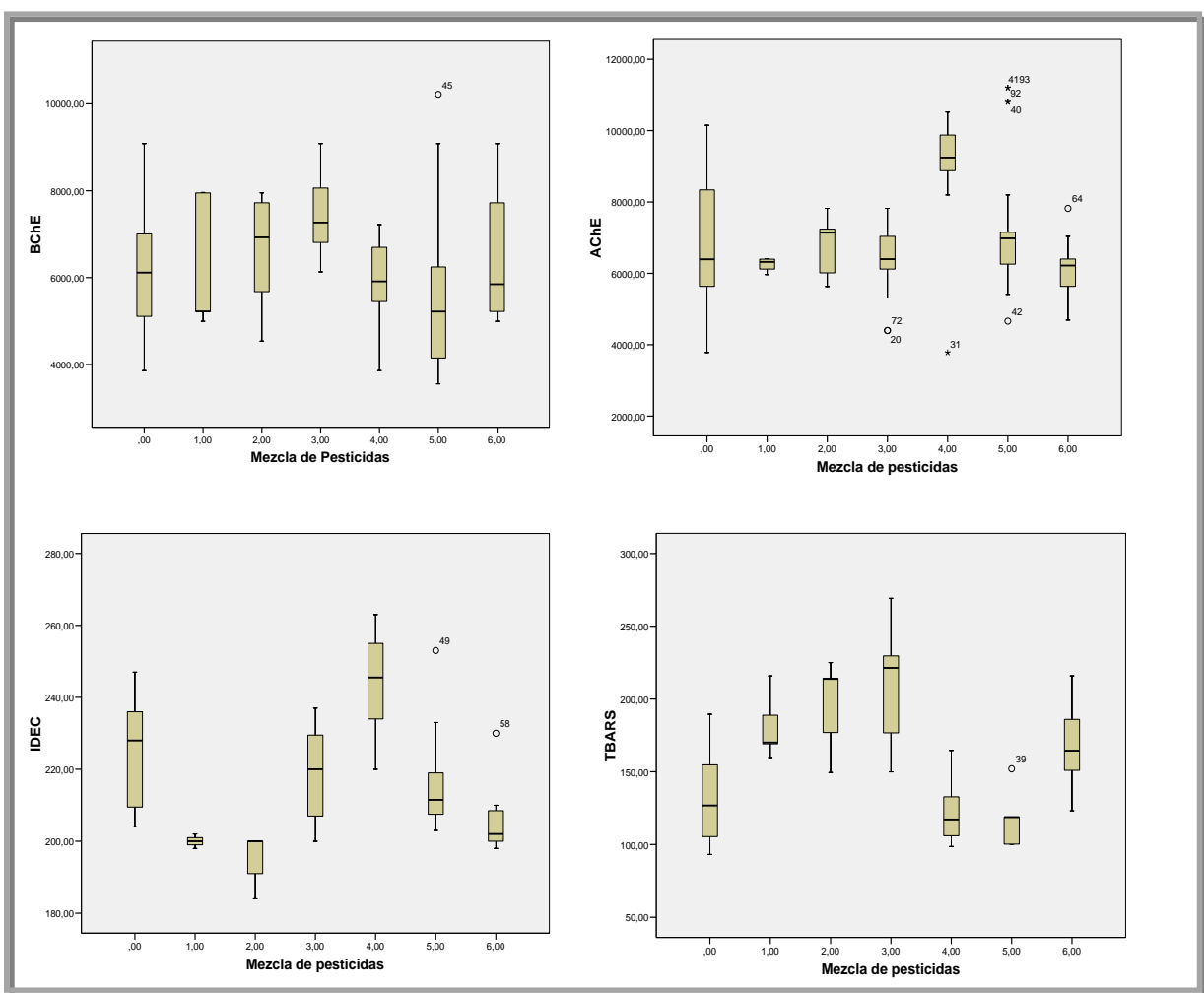
**Tabla 3.9.** Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre BChE, AChE, CAT, TBARS, IDEC e IDER.

	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	P*
<b>BChE</b>	6269,6± 1540	6642,5±1373	7346,3±955	5928,3±941	5548,1±1727	6368,9±1418	0,003
<b>AChE</b>	6241,6±193	6779,6±806	6429,6±978	9062,9±1546	7173,5±1748	6092,9±888	<0,001
<b>CAT</b>	33,53±20,15	83,83±27,32	56,33±58,68	110,95±101,0	88,76±38,31	108,07±101,08	0,159
<b>TBARS</b>	180,76±22,28	198,09±26,72	207,42±35,63	123,76±21,93	118,03±21,13	165,76±26,21	<0,001
<b>IDEC</b>	200,00±2,68	185,75±7,28	218,15±12,46	244,56±12,70	214,50±10,67	205,58±8,81	<0,001
<b>IDER</b>	199,60±18,46	198,75±3,53	218,50±17,92	236,12±8,58	223,17±18,06	202,91±17,03	<0,001

\*P: Test de Kruskal-Wallis

En el análisis de la Tabla 3.9 podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas para los distintos marcadores excepto para CAT.

Las siguientes gráficas de box-plots nos muestran el grado de dispersión de los datos, la mediana y el rango intercuartil debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los siguientes marcadores: AChE, BChE, IDEC y TBARS.



**Figura 3.13.** Box-plots debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los siguientes marcadores: BChE, AChE, IDEC y TBARS.

### 3.4.7. Evaluación de correlaciones entre las variables cuantitativas

Para evaluar la relación existente entre las variables cuantitativas se utilizó el análisis de correlación de Spearman.

En la Tabla 3.10 se resumen las correlaciones (Rho de Spearman) entre todos los biomarcadores aplicados. Las correlaciones entre IDEC e IDER fueron altamente significativas (0,924) y ambas además correlacionaron con AChE (-0,355 y -0,370), con BChE (-0,184 y -0,199) y con CAT (0,560 y 0,582). AChE correlacionó con todas las variables (con IDEC -0,355, con IDER -0,370, con BChE 0,192, con CAT 0,236 y con TBARS -0,255). Además, las variables de estado oxidativo correlacionaron entre sí (-0,364).

**Tabla 3.10.** Análisis de correlaciones de Spearman de los diferentes biomarcadores en el grupo de trabajadores y controles (n=217).

			Correlaciones					
			IDEC	IDER	AChE	BChE	CAT	TBARS
Rho de Spearman	IDEC	Coeficiente de correlación	1,000	,924**	-,355**	-,184**	-,560**	,024
		Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,007	,000	,741
		N	217	217	217	217	217	217
	IDER	Coeficiente de correlación	,924**	1,000	-,370**	-,199**	-,582**	,031
		Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,003	,000	,665
		N	217	217	217	217	217	217
	AChE	Coeficiente de correlación	-,355**	-,370**	1,000	,192**	,236**	-,255**
		Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,004	,001	,000
		N	217	217	217	217	217	217
	BChE	Coeficiente de correlación	-,184**	-,199**	,192**	1,000	,038	,002
		Sig. (bilateral)	,007	,003	,004	.	,599	,975
		N	217	217	217	217	217	217
	CAT	Coeficiente de correlación	-,560**	-,582**	,236**	,038	1,000	-,364**
		Sig. (bilateral)	,000	,000	,001	,599	.	,000
		N	217	217	217	217	217	217
	TBARS	Coeficiente de correlación	,024	,031	-,255**	,002	-,364**	1,000
		Sig. (bilateral)	,741	,665	,000	,975	,000	.
		N	217	217	217	217	217	217

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

### 3.4.8. Estadística Multivariada aplicada a las variables cualitativas y cuantitativas

Las variables cuantitativas fueron dicotomizadas (0 y 1). Se escogió como criterio de dicotomización: 0 para los valores menores de la mediana y 1 para los valores que superaban la mediana.

Con las variables, tanto cualitativas como cuantitativas dicotomizadas se realizó la matriz de similaridad para observar la relación entre todas las variables. Finalmente se construyó un gráfico que permite visualizar la vecindad de las variables en el espacio, a través de un plano que el Software selecciona como representativo.

Las abreviaturas consideradas para construir la matriz de similaridad fueron: Dir: expuestos directos, Ind: expuestos indirectos, M: masculino, F: femenino, Rl: residencia cercana a los cultivos, Rh: residencia más alejada de los cultivos, Al: menor edad, Ah: mayor edad, Pco: primaria completa, Pin: primaria incompleta, Hco: secundaria completa, Hin: secundaria incompleta, DUL: menor antigüedad laboral, Duh: mayor antigüedad laboral, PRE: prepara el caldo, PPE: equipo de protección personal, Tih: mayor tiempo en la jornada laboral, Til: menor tiempo de jornada laboral, noSM: no fuma, SM: fuma, ALC: consume alcohol

frecuentemente, noAL: no consume alcohol frecuentemente, ACh: valores elevados de AChE, ACl: valores bajos de AChE, CAI: valores bajos de EC, CAh: valores elevados de EC, EOh: valores alterados en los parámetros de estrés oxidativo, EOI: valores no alterados en los parámetros de estrés oxidativo.

**Tabla 3.11.** Matriz de similaridad considerando las variables cualitativas y las cuantitativas dicotomizadas.

	Dir	Ind	M	F	RI	Rh	Al	Ah	Pco	Pin	Hco	Hin	DUI	DUH	PRE	PPE	Tih	Til	noSM	SM	ALC	noAL	ACh	ACI	CAI	CAh	EOh	EOI
Dir	1.00																											
Ind	0.02	1.00																										
M	0.55	0.44	1.00																									
F	0.42	0.59	0.03	1.00																								
RI	0.50	0.52	0.52	0.48	1.00																							
Rh	0.50	0.48	0.48	0.52	0.00	1.00																						
Al	0.63	0.39	0.45	0.55	0.66	0.34	1.00																					
Ah	0.38	0.61	0.55	0.45	0.34	0.66	0.00	1.00																				
Pco	0.41	0.58	0.48	0.48	0.50	0.50	0.34	0.66	1.00																			
Pin	0.59	0.42	0.52	0.52	0.50	0.50	0.66	0.34	0.00	1.00																		
Hco	0.55	0.44	0.53	0.47	0.33	0.67	0.61	0.39	0.48	0.52	1.00																	
Hin	0.55	0.47	0.53	0.47	0.27	0.73	0.52	0.48	0.52	0.48	0.72	1.00																
DUI	0.53	0.48	0.48	0.52	0.53	0.47	0.59	0.41	0.50	0.50	0.73	0.55	1.00															
DUH	0.47	0.52	0.52	0.48	0.47	0.53	0.41	0.59	0.50	0.50	0.27	0.45	0.00	1.00														
PRE	0.86	0.16	0.56	0.44	0.52	0.48	0.64	0.36	0.36	0.64	0.50	0.53	0.42	0.58	1.00													
PPE	0.81	0.20	0.55	0.45	0.41	0.59	0.66	0.34	0.41	0.59	0.70	0.73	0.53	0.47	0.80	1.00												
Tih	0.80	0.22	0.56	0.44	0.36	0.64	0.55	0.45	0.45	0.55	0.66	0.69	0.55	0.45	0.78	0.86	1.00											
Til	0.69	0.33	0.52	0.48	0.38	0.63	0.69	0.31	0.31	0.69	0.83	0.80	0.63	0.38	0.67	0.84	0.73	1.00										
noSM	0.69	0.33	0.55	0.45	0.44	0.56	0.66	0.34	0.38	0.63	0.73	0.73	0.63	0.38	0.64	0.72	0.70	0.88	1.00									
SM	0.31	0.67	0.45	0.55	0.56	0.44	0.34	0.66	0.63	0.38	0.27	0.27	0.38	0.63	0.36	0.28	0.30	0.13	0.00	1.00								
ALC	0.61	0.41	0.59	0.44	0.70	0.30	0.52	0.48	0.61	0.39	0.38	0.50	0.55	0.45	0.63	0.58	0.63	0.48	0.58	0.42	1.00							
noAL	0.39	0.59	0.41	0.56	0.30	0.70	0.48	0.52	0.39	0.61	0.63	0.50	0.45	0.55	0.38	0.42	0.38	0.52	0.42	0.58	0.00	1.00						
ACh	0.66	0.36	0.55	0.45	0.38	0.63	0.66	0.34	0.38	0.63	0.80	0.80	0.63	0.38	0.64	0.81	0.77	0.91	0.81	0.19	0.55	0.45	1.00					
ACI	0.34	0.64	0.45	0.55	0.63	0.38	0.34	0.66	0.63	0.38	0.20	0.20	0.38	0.63	0.36	0.19	0.23	0.09	0.19	0.81	0.45	0.55	0.00	1.00				
CAI	0.69	0.33	0.55	0.45	0.38	0.63	0.66	0.34	0.34	0.66	0.77	0.70	0.69	0.31	0.64	0.78	0.77	0.84	0.78	0.22	0.48	0.52	0.78	0.22	1.00			
CAh	0.31	0.67	0.45	0.55	0.63	0.38	0.34	0.66	0.66	0.34	0.23	0.30	0.31	0.69	0.36	0.22	0.23	0.16	0.22	0.78	0.52	0.48	0.22	0.78	0.00	1.00		
EOh	0.42	0.56	0.47	0.53	0.67	0.33	0.36	0.64	0.64	0.36	0.19	0.22	0.33	0.67	0.44	0.23	0.31	0.11	0.23	0.77	0.59	0.41	0.14	0.86	0.17	0.83	1.00	
EOI	0.58	0.44	0.53	0.47	0.33	0.67	0.64	0.36	0.36	0.64	0.81	0.78	0.67	0.33	0.56	0.77	0.69	0.89	0.77	0.23	0.41	0.59	0.86	0.14	0.83	0.17	0.00	1.00

Dir: Direct exposed, Ind: Indirect exposed, M: male, F: female, RI: distance from their residence (low), Rh: distance from their residence (high), Al: age (low), Ah: age (high), Pco: primary school complete, Pin: primary school incomplete, Hco: High school complete, Hin: High school incomplete, DUI: duration of work (low), DUH: duration of work (high), PRE: pesticide mixture maker, PPE: protection personal equipment Tih: time or hours worked (high), Til: time or hours worked (low), noSM: no smoker, SM: smoker, ALC: alcohol consumer, noAL: no alcohol consumer, ACh: AChE activity (high), ACI: AChE activity (low), CAI: Comet assay (low), CAh: Comet Assay (high), EOh: Oxidative Stress (high), EOI: Oxidative Stress (low). NTSYSpc 2.1 statically software.

Analizando la Tabla 3.11, es posible encontrar similitudes entre los aplicadores (Dir) con otras variables: los que preparan el caldo (Pre=0,86), los que usan EPP (0,81), aquellos que trabajan más horas por día (Tih=0,80), quienes son más jóvenes (Al=0,63), los que se relacionan más con una escolaridad primaria incompleta (Pin=0,59) con no fumar (noSM=0,69), y con el consumo de alcohol (ALC=0,61).

Los trabajadores rurales (Ind) se correlacionan más fuertemente con una mayor edad (Ah=0,61), con el género femenino (F=0,59), con el hábito de fumar (SM=0,67) y de no consumir alcohol (noAL=0,59). EPP (en la tabla PPE) se correlaciona con la escolaridad secundaria (Hco=0,70 y Hin=0,73) y además los trabajadores que lo usan son los que preparan las mezclas (PRE=0,80).

Cuando analizamos los resultados de los biomarcadores, AChE baja (ACI) se correlaciona con el hábito de fumar (SM=0,81), con una edad mayor (Ah=0,66), mayor tiempo de residencia

(Rh=0,63), y con la población de trabajadores rurales (Ind=0,64). Si observamos EC con valores más altos (CAh), tiene relación con el hábito de fumar (SM=0,78), con mayor jornada laboral (Tih=0,77), con la antigüedad laboral (DUh=0,69) y en mayor grado con los expuestos indirectos (Ind=0,67).

Los resultados para el Estado oxidativo, considerando los casos con ambos biomarcadores (CAT y TBARS) alterados (EOh), se correlacionan con valores elevados de EC (CAh=0,83) y bajos de Colinesterasa (ACI=0,86), con el hábito de fumar (SM=0,77), con la antigüedad laboral (Duh=0,67), la edad (Ah=0,64) y la corta distancia entre el hogar y los cultivos (RI=0,67).

La Figura 3.14 muestra la dispersión de los puntos que representan a todas las variables evaluadas. El plano donde se representan las variables son las dos coordenadas o ejes que más contribuyen estadísticamente en esta evaluación. La dispersión de las variables en este plano muestra las distancias entre los puntos que representan las similitudes entre las variables tanto cualitativas como cuantitativas.

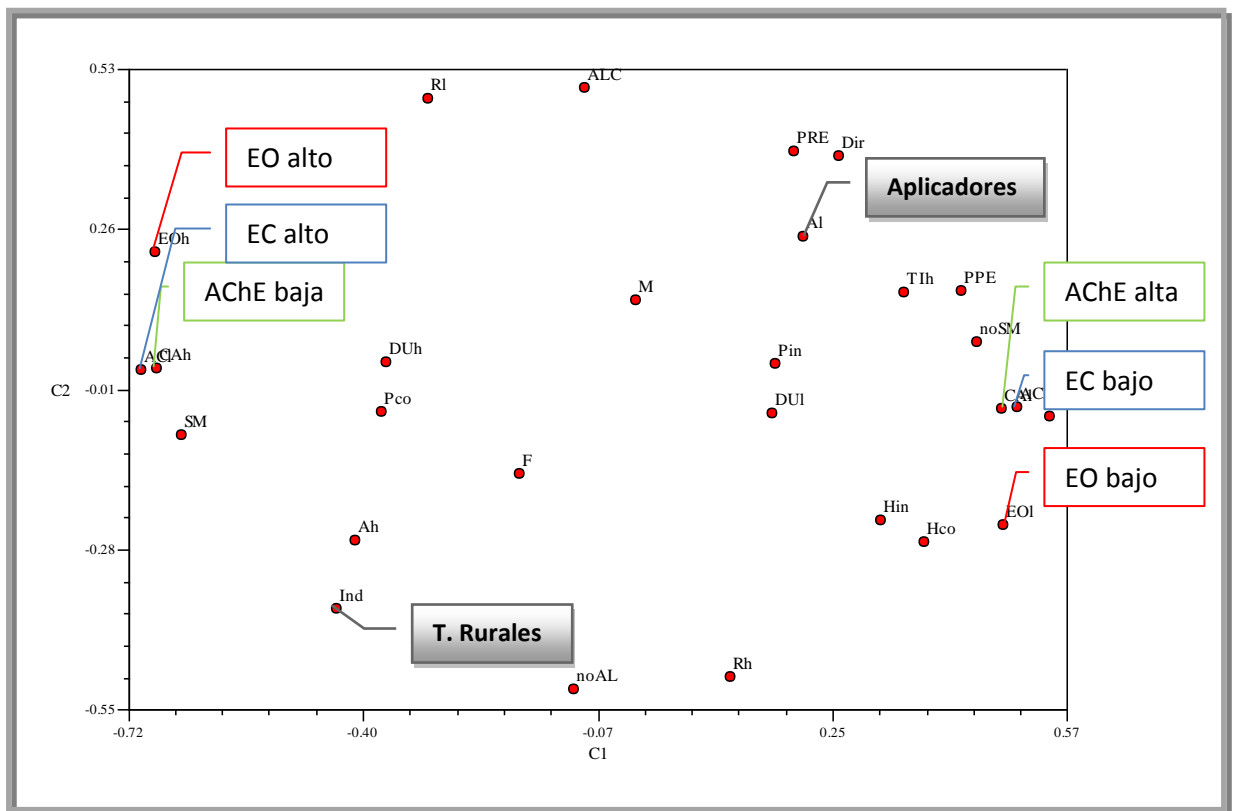


Figura 3.14. Matriz de dispersión de las variables cualitativas y cuantitativas dicotomizadas

### 3.4.9. Odds Ratio para los biomarcadores considerando los distintos factores de riesgo

En estudios de casos y controles, Odds Ratio (OR) o también en ocasiones traducido como razón de los productos cruzados, permite reconocer diferentes parámetros como factores de riesgo o de protección de una exposición, además de identificar la magnitud o fuerza de la asociación, lo que permite hacer comparaciones. En este trabajo de Tesis se procuró evaluar la influencia de los factores como exposición, género, edad, hábito de fumar o de consumir alcohol, escolaridad, tiempo de residencia y las tareas realizadas por los trabajadores como fumigar, el uso de EPP y la antigüedad laboral, sobre la inhibición de actividad de las enzimas colinesterasas, IDEC como marcador de genotoxicidad y TBARS como marcador de estado oxidativo, utilizando los OR.

**Tabla 3.12.** Análisis de las tablas de contingencia simples (2x2) para obtener el Odds Ratio (OR) con un Intervalo de Confianza (IC) del 95%.

Parámetros	BChE (RR, IC)	AChE (RR, IC)	IDEC (RR, IC)	TBARS (RR, IC)
<b>Exposición</b>	1,70 (1,03-3,02)	10,81 (4,69-25,61)	60,50 (13,67-373,69)	1,70 (1,02-3,16)
<b>Género</b>	2,69 (0,98-6,58)	0,41 (0,95-2,24)	0,67 (0,28-1,58)	1,14 (0,42-3,10)
<b>Edad</b>	0,32 (0,13-0,77)	0,71 (0,31-1,64)	2,67 (1,13-6,37)	1,80 (0,68-4,75)
<b>Fuma</b>	0,73 (0,22-2,47)	0,88 (0,26-2,95)	0,56 (0,16-1,91)	2,00 (0,48-8,79)
<b>Alcohol</b>	0,99 (0,42-2,32)	1,44 (0,61-3,39)	1,49 (0,63-3,51)	1,35 (0,48-3,80)
<b>Escolaridad</b>	0,56 (0,22-1,42)	1,10 (0,44-2,76)	0,32 (0,12-0,83)	0,88 (0,90-2,94)
<b>Tiempo Residencia</b>	0,35 (0,15-0,83)	1,04 (0,45-2,40)	2,88 (1,21-6,90)	1,22 (0,47-3,17)
<b>Fumiga</b>	0,42 (0,18-0,99)	2,67 (1,12-6,41)	1,15 (0,49-2,68)	3,79 (1,38-10,62)
<b>Uso de EPP</b>	1,19 (0,43-3,32)	0,51 (0,18-1,42)	3,00 (1,03-8,93)	0,24(0,07-0,75)
<b>Antigüedad Laboral</b>	0,42 (0,18-0,98)	0,56 (0,24-1,30)	4,98 (2,00-12,62)	0,83 (0,32-2,15)

En la tabla 3.12 se evaluaron en el factor exposición todas las personas que participaron del estudio y se las categorizó según fueran trabajadores o controles. Los siguientes factores analizados se realizaron sólo sobre los trabajadores considerando aquellos que podían generar un aumento en el riesgo. Se marcaron los intervalos mayores a uno y que muestran un incremento de OR del biomarcador, al considerar distintas predisponentes de exposición.

### 3.5. Discusión de los resultados del Capítulo

En este trabajo de Tesis, se seleccionaron dos poblaciones, una expuesta laboralmente a plaguicidas ( $n=105$ ) y una población control ( $n=112$ ), que no estaba expuesta de forma laboral a plaguicidas pero que pertenecían al mismo lugar geográfico, con condiciones socioculturales similares. Al analizar las poblaciones de trabajadores y de controles es posible observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en el perfil de la muestra al comparar por género ( $P=0.997$ ), edad ( $P=0,763$ ), los hábitos de fumar ( $P=0,875$ ) y de consumir alcohol ( $P=0,667$ ). Al evaluar aspectos sociales de los trabajadores como la escolaridad, los trabajadores presentaron escolaridad primaria completa o incompleta y solo el 26% tuvo acceso a educación secundaria. Ningún trabajador alcanzó el nivel terciario o universitario. Se podría inferir que los trabajadores podrían tener un limitado acceso a la información y a los adelantos tecnológicos. Todos los trabajadores incluidos vivían cerca de los campos donde se aplicaban los pesticidas, con inadecuadas instalaciones sanitarias y sin agua potable lo que podría relacionarse con un mayor tiempo de exposición.

Aunque varios estudios han informado que los aplicadores de plaguicidas (exposición directa) representan el grupo más expuesto de los trabajadores agrícolas (Bolognesi, 2003), en nuestro estudio, los no-aplicadores o trabajadores rurales (exposición indirecta) fueron incluidos en el grupo expuesto, porque estuvieron presentes durante todas las actividades de trabajo, inclusive las aplicaciones de plaguicidas. Algunos informes consideran la exposición para-ocupacional, que podría estar presente en este grupo evaluado, ya que los agroquímicos se mueven desde el lugar de trabajo hacia los entornos residenciales a través de las actividades de los trabajadores agrícolas (Curl y col., 2002). De este modo, los plaguicidas pueden ser transportados en los cuerpos de los trabajadores, la ropa, el calzado, para acumularse luego en el hogar o vivienda. Al evaluar las características laborales de ambos grupos de trabajadores, se observó una mayor antigüedad laboral en los expuestos directos o aplicadores respecto a los expuestos indirectos. Esto puede estar relacionado con las características de trabajadores temporales de unos y de medieros de otros ya comentados en la introducción de este capítulo.

De las encuestas surge además, que ningún aplicador utiliza el equipo de protección completo y un 75 % no usa ningún tipo de protección. En la encuesta realizada por Souza-Casandinho y Bocero (2008) con los aplicadores hortícolas de la provincia de Buenos Aires, se enumeran las posibles causas de la falta de EPP que se relacionan con el costo del equipo, la incomodidad

que produce su uso y la sensación de “experiencia” acumulada de cómo manejar el riesgo. La falta de protección y el desconocimiento de los agroquímicos aplicados (42 %) son determinantes en la exposición. Esto puede ser debido a que los aplicadores no son los encargados de evaluar las prácticas de protección de los cultivos contra las plagas, sino que es una tarea destinada al productor (Souza-Casandinho, 2007). Es común que los propios involucrados desconozcan el peligro al que están expuestos a través de los plaguicidas y no lo asocien con factores negativos sobre su salud (Souza-Casandinho, 2003), existiendo además una tendencia a la sobreutilización de dichos productos (Ringuelet y Laguens, 2000).

Ante la dificultad de acceder a asesores públicos o privados con quienes determinar de manera objetiva las necesidades de aplicar un tóxico, el productor debe confiar, a partir de vínculos preexistentes, en los proveedores de insumos. Rodríguez y Lenardón (2007) hacen referencia que en el cordón hortícola santafesino, el 98 % de los productores adquiere los productos en proveedores de la zona que, por lo general, también aconsejan sobre productos comerciales, dosis y modalidades de aplicación.

El 77 % de los pesticidas aplicados en el área son clasificados por la OMS como extremada, alta y moderadamente peligrosos (Tabla 3.2). Este tipo de información provista en el marbete del envase puede ser difícil de comprender, por lo que las personas encargadas de manejar los plaguicidas transforman y adaptan la información que reciben a sus condiciones, en base a su propia cultura y a sus experiencias pasadas. El problema puede agravarse cuando la etiqueta no se halla presente, ya sea por la compra de plaguicidas fraccionados o por el deterioro debido al almacenamiento bajo condiciones inadecuadas.

Por lo tanto, entre los determinantes de exposición es posible considerar en este estudio las vías probables de entrada (inhalación y absorción por la piel), generadas por la ausencia de EPP adecuado, el tiempo de exposición que se prolonga cotidianamente por la falta de instalaciones sanitarias adecuadas y la duración acumulada de la exposición expresada en años de actividad laboral.

Como ya hemos mencionado, la medición de la actividad de BChE es un marcador común de exposición en pulverizadores de pesticidas, metodológicamente simple de ensayar y ampliamente disponibles en laboratorios clínicos. En la Tabla 3.4 se observa que solo en los trabajadores rurales está disminuida significativamente la actividad de BChE respecto a la población control ( $P < 0,01$ ). Es posible que el grupo de trabajadores rurales, en particular de



los cultivos hortícolas, incrementa su exposición debido a la labor manual que implican estos cultivos sin respetar el tiempo de reingreso al área fumigada (Rastogui y col., 2008; Kachaiyaphum y col., 2010). BChE presenta fluctuaciones inter e intra individuales que se reflejan en amplios márgenes de normalidad habitualmente aceptados (Repetto, 1995); pudiendo volver a la normalidad a las pocas semanas debido a que es rápidamente reemplazada por nueva enzima sintetizada *de novo* en el hígado (Ellenhorn y col., 1997). Además, después de una exposición laboral moderada a veces hay un fenómeno de rebote que resulta en niveles elevados (OEHHA, 2002).

Como consecuencia es importante determinar el valor basal de la actividad de las enzimas colinesterasas o valor de referencia, ya que es el nivel contra el cual se deben cotejar todas las determinaciones posteriores. Dado que el valor de referencia se determina antes de que el empleado esté expuesto (pre-ocupacional) y el seguimiento periódico de las pruebas se producen después de la exposición, se supone que toda la inhibición subsiguiente de la actividad de la enzima se debería solo a la exposición a pesticidas. Todas las determinaciones posteriores, deben interpretarse como un porcentaje de esta línea de base individual (OEHHA, 2002). La determinación basal de la actividad de las colinesterasas (recomendadas en Higiene y en Toxicología Ocupacional con el fin de analizar los porcentajes de inhibición) son logísticamente difíciles de concretar (Hofmann y col., 2010). En primer lugar, por la inexistencia de los monitoreos pre-ocupacionales. En segundo término, sumado a la dificultad de acceso a la población, para las determinaciones basales es necesario que el trabajador no haya estado expuesto a inhibidores de colinesterasas por lo menos por 30 días (OEHHA, 2002) requisito difícil de cumplir debido a las características de rotación de los cultivos hortícolas.

Además de que ambos grupos estuvieron expuestos de manera diferente a las mezclas de plaguicidas, en la interpretación de los resultados de BChE es importante considerar que pueden observarse diferentes perfiles de inhibición de las colinesterasas en función de cada pesticida en particular y por lo tanto de cada mezcla. Por ejemplo, malatión y clorpirifos son inhibidores preferenciales de BChE mientras que dimetoato es un inhibidor preferencial de AChE (Carballo y col., 2011a).

La inhibición de AChE se ha utilizado en poblaciones expuestas a OP y MC como marcador de efecto. Diferentes investigaciones han reconocido el papel inestimable de la vigilancia de AChE en los trabajadores rurales en alto riesgo de exposición a estos pesticidas (Ranjbar y col., 2002; Shadnia y col., 2005; Mc Cauley y col., 2006; Rastogi y col., 2009). En nuestro

trabajo, de acuerdo con diferentes informes (Panemangalore y col., 1999; Ranjbar y col., 2002; Singh y col., 2007), la AChE mostró una disminución significativa en los trabajadores expuestos directa e indirectamente a pesticidas ( $P < 0,01$  en ambos, Tabla 3.4). A diferencia de BChE, AChE es una enzima que presenta menor variabilidad intraindividual, no exhibe diferencias entre los dos sexos, se mantiene estable durante el embarazo y hasta la fecha no se conoce que posea polimorfismo genético interindividual, por lo que una actividad baja corresponde siempre a una inhibición, no a una forma atípica (Repetto, 1995). AChE o "la colinesterasa verdadera", es bioquímicamente igual que la enzima acetilcolinesterasa situada en la sinapsis de la célula neuro-efectora. Se considera una medida más precisa del nivel de AChE real en los sitios de neuro-efectores ya que a menudo se deprime más lentamente que BChE por la exposición a estas sustancias. La regeneración de AChE es lenta y se produce sólo en las células eritropoyéticas de la médula ósea, con su posterior entrada en la sangre circulante (Abdollahi y col., 1996; Gordon y Rowsey, 1998).

Es bien sabido que los radicales libres juegan un papel importante en la toxicidad de los plaguicidas y que éstos, pueden inducir estrés oxidativo que conduce a la generación de radicales libres y alteraciones de las enzimas antioxidantes (Banerjee y col., 1999). El estrés oxidativo se refiere a la situación de desequilibrio entre la producción de radicales libres y de las defensas antioxidantes y en humanos puede ser el resultado de una disminución de los antioxidantes o de un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno conduciendo a la peroxidación lipídica, principalmente (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La enzima CAT presente de forma ubicua en una amplia gama de células aeróbicas, se encuentra en el hígado, riñón y glóbulos rojos y tiene mayor actividad en mamíferos (Deisseroth y Dounce, 1970). Esta proteína soluble está localizada en los eritrocitos, ya que debe proteger a la hemoglobina de la peroxidación. Algunos estudios han indicado que los radicales superóxido pueden inhibir la actividad de CAT (Kono y Fridovich, 1982) y el aumento de  $H_2O_2$  originado por la inhibición de CAT podría inhibir la actividad de SOD, convirtiendo ambos parámetros en un indicativo de la velocidad de formación de radicales libres (Yu, 1994), y por lo tanto en un biomarcador de efecto en la exposición de humanos a pesticidas.

Los resultados del presente trabajo de Tesis indican que la actividad CAT disminuyó significativamente en los aplicadores de plaguicidas y en los trabajadores rurales ( $P < 0,01$  en ambos, Tabla 3.5). En eritrocitos de rata a las que se había administrado Clorpirifos por el

término de 28 días, se observó también una disminución significativa en la actividad CAT (Mansour y Mossa, 2009). Los datos disponibles en animales de experimentación, en investigaciones *in vitro* (Gultekin y col., 2000.; Prashanti y col., 2005.; Seth y col., 2001.) y en estudios *in vivo* (Ranjbar y col., 2002; López y col., 2007) indican que las enzimas asociadas con los mecanismos de defensa antioxidante cambian bajo la influencia de los plaguicidas.

Estas enzimas antioxidantes son las encargadas de eliminar eficientemente los radicales libres y son en parte responsables de la protección contra la peroxidación lipídica que puede estar presente en la exposición a plaguicidas (Banerjee y col., 1999).

Por lo tanto, el aumento del nivel de TBARS observado en este trabajo de Tesis en los aplicadores de pesticidas ( $P < 0,01$ ; Tabla 3.5) podría ser debido a un aumento de la peroxidación de las membranas y/o a la actividad antioxidante disminuida, causado por la exposición a mezclas de plaguicidas. Diferentes OPs, tales como fosalone, clorpirifos y diazinón, se han reportado para inducir estrés oxidativo como lo demuestra el incremento de la producción de MDA (Gultekin y col., 2000; Prakasam y col., 2001; Altuntas y col., 2003; Catalgol y col., 2007). Algunos piretroides pueden afectar el flujo de membrana de los eritrocitos debido a la peroxidación lipídica aumentada (Kale y col., 1999, Gabbianelli y col., 2002; Nasuti y col., 2003). Es probable que la producción de  $O_2^-$  o la acción directa de los piretroides en la producción de GPx sea la causa del daño oxidativo (Prashanti y col., 2005; El Demerdash, 2007). En particular un estudio conducido en Estados Unidos con trabajadores expuestos a mezclas, que incluyó aplicadores, trabajadores rurales y controles (Kisby y col., 2009), al igual que en nuestro estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de MDA en los aplicadores (valores 24 veces más altos) y en los trabajadores rurales (valores 4,9 veces más altos).

Existe una amplia gama de métodos que se utilizan para la detección de efectos biológicos tempranos causados por agentes que dañan el ADN en el ambiente laboral. La evaluación de biomarcadores de daño genotóxico en humanos ocupacionalmente expuestos a pesticidas es una de las maneras de establecer una relación entre el riesgo de cáncer y los plaguicidas (Albertini y col., 2000; Faust y col., 2004).

Los resultados, a veces contradictorios, de los estudios citogenéticos reflejan la heterogeneidad de las poblaciones respecto al modo de uso de los pesticidas y las condiciones de exposición. Algunos estudios demuestran un aumento en la frecuencia de AC (Dulout y col., 1985; Kourakis y col., 1992; Carbonell y col., 1995; Lander y col., 2000; Paz-y-Miño y col., 2002;

Sailaja y col., 2006) y de MN en linfocitos de sangre periférica (Titenko-Holland y col., 1997; Gómez-Arroyo y col., 2000; Bolognesi y col., 1993 y 2002; Costa y col., 2006) en personas expuestas a mezclas complejas de plaguicidas en comparación con poblaciones control, en tanto otras investigaciones se encuentran resultados negativos al realizar el mismo tipo de comparaciones (Carbonell y col., 1990; Gómez-Arroyo y col., 1992; Hoyos y col., 1996; Scarpato y col., 1996; Lucero y col., 2000; Pastor y col., 2001, a, b).

El Ensayo Cometa ha ganado aceptación como una técnica estándar de laboratorio para evaluar el daño del ADN y / o reparación, y recientemente se ha convertido en un tema de debate por su posible aplicación dentro del actual marco regulador en las pruebas de genotoxicidad (Burlinson y col., 2007). La aceptación como segunda prueba de caracterización del daño genotóxico en el caso del EC *in vivo* por las agencias reguladoras de varios países, está creciendo (COM, 2000, la FDA, 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis muestran un aumento estadísticamente significativo en el índice de daño en el ADN en trabajadores rurales y en aplicadores de plaguicidas en comparación con los controles ( $P < 0,01$  en ambos casos, Tabla 3.6). Ha sido reportado un aumento similar estadísticamente significativo en el EC en trabajadores de la producción de plaguicidas (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2000; Grover y col., 2003.) y en aplicadores de plaguicidas (Lebailly y col., 1998, a,b). Por el contrario, fueron reportados resultados negativos por Piperakis y col. (2003, 2006), en cultivadores de flores y hortalizas expuestos laboralmente a pesticidas. Los datos anteriores sugieren que factores intrínsecos y extrínsecos podrían estar involucrados en el efecto de los plaguicidas sobre el material genético y apoyar así la pertinencia de monitoreo de poblaciones específicas para determinar el potencial daño genotóxico producido por estos productos químicos (Castillo-Cadena y col., 2006).

Por otra parte, el IDER de ambos grupos expuestos mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles ( $P < 0,001$  en ambos casos, Tabla 3.6). Cabe recordar que la función del ensayo es evaluar los procesos de reparación puestos en juego para inhibir el daño generado por el  $H_2O_2$  en el ADN *in vitro* (Klein y col., 1981). Así, el daño oxidativo generado al ADN se mantiene en un estado de equilibrio dinámico por la presencia de las defensas antioxidantes, que controlan el ingreso de daño y la posterior reparación del ADN celular en un medio adecuado, lo que elimina el daño producido. En el presente trabajo, los grupos expuestos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el daño del ADN

antes y después del proceso de reparación, IDEC vs. IDER, ocurriendo el mismo fenómeno para los controles (Tabla 3.6).

Palus y col. (1999) informaron una reducción significativa en el número de células con daño al ADN después de un proceso de 1 h de reparación en los trabajadores de una fábrica de muebles de madera y Piperakis y col. (2003, 2006) observaron que la eficacia de la reparación fue similar en los trabajadores expuestos a plaguicidas y los controles, concordando con nuestros hallazgos.

En las Tablas 3.7 y 3.8 se resume la influencia de los factores de confusión sobre BChE, AChE, CAT, TBARS IDEC e IDER en trabajadores rurales y aplicadores de plaguicidas. Realizaremos la interpretación de los resultados considerando cada factor.

Edad: En los aplicadores de pesticidas no se observan diferencias estadísticamente significativas al estratificar los datos en función de la edad en ninguno de los biomarcadores analizados. En los trabajadores rurales si se observan diferencias estadísticamente significativas en IDEC y CAT utilizando edad como factor de confusión. En general, la edad del individuo parece tener poco efecto en el promedio del nivel basal de daño en el ADN. Una observación interesante realizada por Singh y col. (1990) sugiere que las células de las personas mayores tienen menos resistencia al daño del ADN por la exposición a rayos-X en un modelo *ex vivo*. Esto explica que el muestreo y el procesamiento de las muestras de sangre pueden producir daño oxidativo y que este es un factor determinante para el nivel de daño en el ADN, siendo más importante en las personas mayores que en individuos más jóvenes. Además los efectos nocivos producidos por los radicales libres de manera azarosa durante el metabolismo aeróbico pueden causar daños en el ADN, los lípidos y proteínas y estos efectos se acumulan con el tiempo (Valko y col., 2007).

Género: La gran mayoría de los estudios de biomonitorio publicados consisten en individuos de ambos sexos. Rutinariamente se lleva a cabo el análisis estadístico para evaluar cualquier diferencia entre los sexos en las poblaciones estudiadas. En general, el efecto de género ha sido considerado como un asunto de controversias (Moller y col., 2000). En este trabajo de Tesis, no se observan diferencias estadísticamente significativas al estratificar los datos en función del género en ninguno de los biomarcadores analizados en ambos grupos expuestos.

Hábito de fumar: es posible especular que el insuficiente número de personas con el hábito de fumar en esta población (13 %) puede ser un factor subyacente que puede explicar los

resultados negativos del consumo de tabaco en todos los biomarcadores analizados. Los resultados negativos utilizando el hábito de fumar como factor de confusión, pueden ser debido a una serie de consideraciones tales como, el tiempo de exposición, el número de cigarrillos fumados por día, el tipo de tabaco utilizado para fumar, y la presencia del hábito de fumar como un factor de confusión o como exposición principal (Valverde y Rojas, 2009).

Hábito de consumir alcohol: El consumo de vino o bebidas alcohólicas en adultos es un comportamiento frecuente en todo el mundo y el consumo excesivo de alcohol se ha asociado con diferentes patologías. La oxidación del etanol genera radicales libres que se manifiestan como microsomas en el hígado, y que a su vez pueden inducir un daño en el ADN detectable por el EC (Albano y col., 1991, 1996), TBARS y CAT (Valko y col., 2007).

En este trabajo de Tesis, el consumo de alcohol como factor de análisis solo generó diferencias estadísticamente significativas en la actividad de CAT en los aplicadores, resultados que coinciden con otro estudio en el que analizan el desbalance oxidativo con el consumo de alcohol y pesticidas (Sivapiriya y col., 2006).

Antigüedad Laboral: En los estudios de biomonitorio ocupacional, la antigüedad laboral se relaciona claramente con el tiempo de exposición, y con una fuerte tendencia a detectar mayores niveles de daño en los trabajadores expuestos (Dusinska y col., 2004). En el presente trabajo, al analizar la antigüedad laboral como factor se puede observar su influencia sobre los resultados de BChE, IDEC e IDER en los aplicadores y de AChE e IDEC en los trabajadores rurales. Se ha determinado que la duración de la exposición en una exposición crónica, puede conducir a cambios post-traduccionales irreversibles y a la degradación de proteínas, eventos que podrían causar daño a las biomoléculas, muerte celular y alteraciones de la homeostasis celular. Secuencias de sucesos similares también están asociadas con la etiología y la patología temprana de muchas enfermedades crónicas (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009).

EPP: Solo los aplicadores de pesticidas utilizaban EPP de manera inadecuada o incompleta y en un 25 % de los casos, obteniéndose cambios significativos en los parámetros IDEC e IDER. Los efectos genotóxicos potenciales observados en los trabajadores expuestos en este estudio puede deberse a la falta de medidas de protección adecuadas.

En otros trabajos realizados en la Argentina, el 35% de los trabajadores entrevistados admitió no usar EPP (Paunero y col., 2009.), datos que coinciden con las observaciones de Souza-Casadinho y Bocero (2008) con respecto a la falta de cuidados en relación con el peligro del

uso de agroquímicos. En este relevamiento de aplicadores hortícolas de la provincia de Buenos Aires, sólo el 2,4 % adoptan el equipo completo y el 41,2% no utiliza ningún tipo de protección. De acuerdo con esto, al preguntar acerca de los aspectos que consideran que deberían ser mejorados, sólo el 5% de los trabajadores entrevistados mencionan aspectos de higiene y seguridad en el trabajo. Un aumento de MN se observó en personas expuestas de plaguicidas que no usaban guantes de protección (Bolognesi y col., 2002). Al mismo tiempo se han encontrado aumentos en las frecuencias de AC y MN en algunos estudios en los que la población expuesta a plaguicidas no llevaba protección durante la jornada de trabajo (Costa y col., 2006) o poco o nada de protección (Dulout y col., 1985). Por otra parte, varios estudios donde se reportó que la mayoría de los trabajadores utilizaba las medidas de protección adecuadas (> 60%), mostraron resultados negativos (Pastor y col., 2001, a,b y 2002; Bolognesi y col., 2004; Piperakis y col., 2003 y 2006), poniendo en relevancia la importancia de EPP para prevenir la exposición.

Uso de mezclas: En un marco global, los plaguicidas se han convertido en la única herramienta utilizada por los productores para contrarrestar el ataque de insectos y enfermedades. En la actividad hortícola, dentro del conjunto de la producción agraria, se produce un uso más intensivo de agroquímicos por unidad de superficie. Al respecto, desde el punto de vista toxicológico, Yang (1994) sugirió que "el 95% de los recursos en toxicología se dedica a los estudios de un solo producto químico". La toxicidad de los plaguicidas, se expresa en función de la dosis letal 50 (DL50), la cual solo se estudia y enuncia para productos en forma aislada, nunca en mezclas. En las mezclas los principios activos al combinarse pueden incrementar su capacidad de producir daño. En los estudios toxicológicos que tratan las interacciones químicas, el mayor foco se ha hecho en la exposición secuencial de dos sustancias químicas diferentes o en la exposición a las mezclas binarias (Hertzberg y Teuschler 2002; Yang 1994). Es evidente que el interés y la investigación sobre las mezclas químicas se han intensificado en las últimas décadas, como lo demuestran los artículos de revisión (Seed y col., 1995; Carpenter y col., 2002; Feron y col., 2002).

En el presente trabajo de Tesis, se consideraron las mezclas que los aplicadores utilizaron en la última semana. En la Tabla 3.3 también se muestra el lugar de la explotación y el número de trabajadores expuestos a cada mezcla. Aunque el número de personas expuestas a cada mezcla es pequeño, su evaluación puede contribuir a comprender su influencia sobre los resultados.

De esta forma en la Tabla 3.9 se consideran los datos obtenidos para todos los biomarcadores planteados utilizando la mezcla a la que estuvieron expuestos como factor de análisis.

BChE: se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0,003$ ; Test de K-W) siendo la mezcla 5 (cipermetina, clorpirifos, glifosato), la que presenta la mayor inhibición enzimática

AChE: se encontraron diferencias significativas ( $P<0,001$ ; Test de K. Wallis), y la mayor inhibición fue en la Mezcla 6 (dimetoato, cipermetrina, paration).

Estos datos pueden estar relacionados con los perfiles diferenciales de la inhibición de las enzimas colinesterasas que se pueden observar en función de cada compuesto OP en particular, como ya fue descrito, clorpirifos y malatión son inhibidores preferenciales de BChE mientras que dimetoato es un inhibidor preferencial de la AChE y también se demostró que malation y propoxur inhibían significativamente a AChE (Banerjee y col., 1999), como también cipermetrina, dentro de los piretroides (Kale y col., 1999). En la interpretación de los resultados del monitoreo de las colinesterasas, es importante considerar la presencia de los otros compuestos que formaron parte de las mezclas y sus desconocidas interacciones tóxicas.

Cuando se analizan los otros biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas con las mezclas como factor tales como IDEC, IDER y TBARS ( $P<0,001$  para cada caso; Test de K. Wallis), todos coinciden en mostrar los valores más elevados para la mezcla 4 (cipermetrina, paration, imidacloprid, benzimidazol, flusilazole, carbendazim, dimetoato, metamidofoz, mancozeb). En esta mezcla se encuentran presentes distintos principios activos, distintos blancos biológicos y en proporciones desconocidas.

En las mezclas de plaguicidas es importante tener en cuenta que cada ingrediente activo tiene un modo de acción específico para el control de una plaga, y tiene sus propios efectos secundarios posibles sobre la vida silvestre y los seres humanos expuestos a ella. Así, la exposición ocupacional a pesticidas puede aumentar el riesgo de resultados reproductivos adversos o desórdenes del sistema nervioso, provocar inmunodepresión e incluso puede provocar cáncer en la edad adulta como también podría inducir cambios heredables (Carballo y col., 2011a). El enfoque en las interacciones químicas, sobre todo en concentraciones ambientalmente relevantes, es un paso importante para avanzar en nuestra comprensión del impacto de las mezclas sobre la salud humana y el ambiente.

En el camino de comprender este impacto, los biomarcadores han constituido un valioso complemento a la epidemiología convencional y si son cuidadosamente elegidos, pueden



proporcionar información útil sobre los mecanismos moleculares implicados en la exposición ambiental y ocupacional. La selección de biomarcadores apropiados es de vital importancia debido a la oportunidad de una mayor precisión en la evaluación del riesgo en individuos o subgrupos de población, con los consecuentes alcances para la protección de la salud.

Para investigar la asociación entre la exposición y los marcadores seleccionados, se utilizó el test de correlación de Spearman (Tabla 3.10), donde se pone en evidencia la robustez analítica de los métodos empleado, ya que los marcadores seleccionados por cada grupo: enzimas colinesterasas, daño oxidativo y daño genotóxico, correlacionaron entre sí.

El análisis de las correlaciones reveló que el daño observado en los linfocitos utilizando el EC se asoció positivamente con la presencia de modificaciones de la enzima antioxidante CAT, lo que sugiere la influencia de un posible mecanismo oxidativo en este nivel de daño. Además, también fue significativa la asociación inversa con las enzimas colinesterasas

Por su parte, AChE presentó una asociación negativa con TBARS y CAT. La correlación entre TBARS y CAT con la actividad de AChE en el presente estudio puede estar relacionada con lo observado en estudios anteriores donde se postula que la inhibición de la AChE inicia la acumulación de radicales libres que conducen a la peroxidación lipídica, que puede ser el indicador de daño celular (Yang y col., 1996; Akhgari, 2003).

De manera de concluir con la descripción de esta población a través de las variables seleccionadas, se realizó una matriz de similaridad considerando las variables cualitativas y las cuantitativas dicotomizadas. A partir del análisis de las similaridades es posible describir a los aplicadores como los encargados de preparar la mezcla de plaguicidas, los que en cierta medida usan el equipo de protección, trabajan más horas por día, son más jóvenes, tuvieron una educación primaria incompleta, fuman poco y tienen hábitos de consumir alcohol y por otra parte a los trabajadores rurales como el grupo con mayor edad, en su mayoría son mujeres, tienen el hábito de fumar y no consumen alcohol.

En el caso de las similaridades de EPP se observa que las personas que lo utilizan son los que generalmente preparan los plaguicidas para ser aplicados y han tenido acceso a una educación secundaria. Por otra parte, los marcadores alterados (Colinesterasas inhibidas, IDEC elevado y Parámetros de Estado oxidativo alterados) se correlacionan entre sí y con factores como la antigüedad laboral, la duración del empleo, la edad y el hábito de fumar, que han sido planteados como predisponentes de riesgo.

Aunque los avances en las metodologías de laboratorio, en el análisis de los datos y en la evaluación y medición de la exposición son importantes y positivos, pueden también contribuir al enfoque reduccionista, más centrado en los individuos que en las poblaciones. Es importante disponer de datos sobre otros factores que puedan influir en la exposición de interés, de manera que cualquier efecto de las exposiciones profesionales que se demuestre en el estudio pueda atribuirse a la exposición profesional *per se*, en lugar de a otras causas probables.

En el análisis de la Tabla 3.12 es posible interpretar que el ser trabajador o control (analizado como exposición) contribuye a generar mayor probabilidad de tener inhibición de actividad de las enzimas colinesterasas (BChE y AChE), elevado índice de daño en el ADN de los linfocitos (IDEC) y aumentos en la peroxidación lipídica (TBARS).

En las evaluaciones siguientes, solo se consideraron los trabajadores y cómo y en qué medida podría existir la probabilidad de presentar los biomarcadores alterados considerando los otros factores de riesgo. Así los trabajadores con más tiempo de residencia en el área rural, tienen aproximadamente 3 veces más probabilidad de presentar daño en el ADN que los que tienen menos tiempo de residencia en esa zona. Del mismo modo, los trabajadores con una mayor antigüedad laboral tienen aproximadamente 5 veces más probabilidad de tener aumentado IDEC, lo que sugiere la acumulación con el tiempo de los efectos genotóxicos. Como ya se ha discutido utilizando otros estadísticos, el no usar el EPP puede generar un riesgo 3 veces mayor de incrementos en el índice de daño al ADN. Cuando se considera el tipo de labor realizada, esto es ser aplicador de plaguicida o ser solo trabajador rural, es posible observar que ser aplicador puede generar un riesgo 3 veces mayor de tener AChE inhibida y de casi 4 veces de tener valores alterado de peroxidación lipídica

### *Conclusiones parciales*

Consideramos que este capítulo del trabajo de Tesis Doctoral contribuye a la evaluación subclínica en relación con el potencial daño generado por la exposición a los agroquímicos en los trabajadores hortícolas del Cinturón verde del Departamento La Capital, Santa Fe, Argentina.

Este estudio muestra que los trabajadores expuestos directa e indirectamente a las mezclas de pesticidas tienen cambios enzimáticos, modificaciones en el equilibrio oxidativo y daño genotóxico en comparación con los controles.

Es esencial aumentar el tamaño de la muestra y realizar un seguimiento sistemático de las poblaciones expuestas a las mezclas de plaguicidas en nuestro país, utilizando biomarcadores de efecto y exposición.

# **CAPÍTULO 4**

## **Cultivos Extensivos:**

### **Aplicadores de plaguicidas**

#### **4.1. Antecedentes**

Los cultivos extensivos son la base productiva de la provincia de Santa Fe y representan el mayor porcentual de área sembrada. El cultivo de oleaginosas es el prioritario, especialmente por la superficie ocupada por la soja.

En el siglo pasado Argentina se caracterizó por la producción de una gran variedad de cereales y oleaginosas, con un marcado predominio del trigo y el maíz. La evolución ocurrida especialmente en la década del 90 hacia un “país sojero”, hizo que este grano alcance casi el 50% del total cosechado, cifra que va en aumento llevando a nuestro país hacia el monocultivo. El crecimiento del cultivo de soja y sus derivados en Argentina en los últimos años, se ha constituido en un fenómeno que merece ser estudiado en profundidad por su trascendencia e impacto tanto económico como ecológico y social. La expansión del cultivo se ha visto favorecida por la combinación de los factores climáticos, la coyuntura de los buenos precios internacionales y el tipo de cambio así como un mercado exportador que por el momento se visualiza como muy firme y sin vistas de saturación a corto plazo. El paquete tecnológico específico, está cimentado sobre la siembra directa, el uso de semillas transgénicas y la utilización masiva de herbicidas, insecticidas y en general agroquímicos específicos destinados a aumentar la rentabilidad en la producción.

En esta segunda etapa de expansión agrícola del país, los agroquímicos (herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc.) constituyeron el sector más dinámico dentro del campo de la tecnología agrícola, tanto por la cantidad de innovaciones observadas, como por la gran expansión de su uso, aunque amortiguada por una inadecuada relación de precios. La rápida sucesión de innovaciones en los agroquímicos, el peligro que entraña su manipuleo debido a su alta toxicidad, la necesidad de emplear medios mecánicos específicos para su aplicación (entre ellos el avión), la economía que puede lograrse con la compra masiva de los distintos productos, entre otros factores, hicieron que su manejo en forma directa por el productor resultara difícil y costoso en muchos casos, especialmente en el de los insecticidas dando lugar al surgimiento de empresas dedicadas a la aplicación de plaguicidas.

Con la difusión de la soja, que normalmente requiere dos tratamientos contra insectos, el aplicador de plaguicidas tuvo un campo de acción mucho más amplio y, en pocos años, se

formaron empresas de cierta magnitud (Lódola, 2008), donde la prestación del servicio de aplicación de agroquímicos y fertilizantes explica en gran parte el crecimiento de los contratistas en las últimas décadas. La evolución de los prestadores de servicios se puede medir comparando los datos de los dos últimos censos agropecuarios que arrojan un crecimiento del 81%, destacándose el servicio de mantenimiento de cultivos (aplicación de agroquímicos y fertilizantes, etc.), cuya superficie se triplica. (Carrero, 2007).

En el marco de definir las condiciones socio-culturales del grupo evaluado, es posible establecer dos tipos de actores sociales involucrados en los cultivos extensivos. Por un lado, los productores tradicionales, para quienes la totalidad de su ingreso proviene de la producción agropecuaria, aunque pueden ser o no propietarios de tierras y por otro, los prestadores de servicios agropecuarios, para quienes la totalidad de sus ingresos provienen de la prestación de servicios. En este último grupo, están incluidas las pequeñas o medianas empresas dedicadas a la pulverización de plaguicidas.

#### **4.2. Objetivos Específicos del Capítulo**

- 1) Evaluar el daño generado por exposición a mezclas simultáneas de pesticidas en aplicadores de cultivos extensivos y confrontarla, en todos los casos, con una población no expuesta (grupo control).
- 2) Caracterizar la exposición mediante la determinación de las actividades de Butirilcolinesterasa Plasmática y Acetilcolinesterasa Eritrocitaria en ambas poblaciones de trabajadores y controles.
- 3) Evaluar el efecto de los plaguicidas sobre el estado oxidativo midiendo la actividad de CAT como marcador del sistema antioxidante, la relación GSH/GSSG como marcador del balance redox y los niveles de TBARS como marcador de la peroxidación de lípidos en los eritrocitos de ambos grupos.
- 4) Aplicar el Ensayo Cometa, el Ensayo de Reparación y sitios FPG en los linfocitos de sangre periférica y determinar la frecuencia de Micronucleos en células exfoliativas del

epitelio bucal para determinar el efecto de las mezclas de plaguicidas sobre el ADN de los trabajadores y controles.

5) Integrar los resultados de acuerdo a las variables tenidas en cuenta en la anamnesis de los trabajadores y de los controles, considerando criterios de inclusión, exclusión y aquellos que actúen como factores de confusión en el estudio.

### **4.3. Materiales y Métodos**

#### **4.3.1. Biomarcadores utilizados en la población de cultivos extensivos**

Para evaluar a los aplicadores de cultivos extensivos se utilizaron como biomarcadores:

##### **1- Medición de enzimas Colinesterasas**

- 1.3. Acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE)
- 1.4. Butirilcolinesterasa plasmática (BChE)

##### **2- Marcadores del Estado Oxidativo**

- 2.3. Actividad Catalasa en eritrocitos
- 2.4. Relación GSH/GSSG
- 2.5. Medición de peroxidación de lípidos en eritrocitos (ensayo de TBARS)

##### **3- Marcadores de Genotoxicidad**

- 3.3. Ensayo Cometa en sangre periférica
- 3.4. Ensayo de Reparación utilizando el Ensayo cometa
- 3.5. Sitios FPG
- 3.6. Micronucleos en células de mucosa bucal

Las metodologías empleadas fueron descriptas en el Capítulo 2.

### **4.3.2. Área productiva**

En los últimos 35 años la superficie sembrada de oleaginosas ha aumentado en un 462%, siendo la soja el cultivo predominante. En la provincia de Santa Fe, las rotaciones más frecuentes son: soja - trigo y, en algunos casos girasol - maíz - soja en esa secuencia. Sin embargo, los cereales que compiten con las oleaginosas en el uso del suelo han disminuido más del 50% (Carrero, 2007). Sin dudas, en la “pampa húmeda”, se ha adoptado un modelo de “especialización” en la producción de esta oleaginosa que se expande rápidamente hacia regiones extrapampeanas o áreas consideradas como tierras marginales para este tipo de agricultura.

Las tierras del norte de la provincia de Santa Fe han sido incorporadas a la agricultura de “tipo pampeana” desde la segunda mitad de la década del ‘90 reemplazando este modelo a otras actividades agropecuarias. Así, en el departamento General Obligado la soja ha reemplazado a otros cultivos tradicionales como el algodón, mientras que en el departamento 9 de julio el avance de la soja se ha hecho sobre todo a expensas de la tala indiscriminada de los bosques nativos y en el departamento Vera, el incremento se produjo fundamentalmente por el reemplazo de tierras dedicadas a la ganadería o a la explotación mixta y a la canalización parcial de los humedales de los “bajos submeridionales” del norte santafesino.

### **4.3.3. Población de aplicadores de cultivos extensivos**

Este capítulo incluyó la evaluación de 48 personas que viven y trabajan en los departamentos San Cristóbal, Las Colonias, San Javier y Garay (Prov. de Santa Fe, Argentina). El grupo control estuvo compuesto por 50 donantes con condiciones socio-demográficas semejantes pero que no realizaban actividades laborales relacionadas con la exposición a pesticidas. Todas las personas incluidas pertenecían a la misma área geográfica.

El muestreo tanto de los trabajadores como de los controles se llevó a cabo en el período de mayor actividad entre los meses de noviembre a abril de los años 2008, 2009 y 2010.

Los trabajadores expuestos (aplicadores de pesticidas), fueron aquellas personas que en los siete días previos a la toma de muestra sanguínea habían realizado actividades de pulverización de agroquímicos en la zona de cultivos extensivos.

El acercamiento a la población se logró a través de los SAMCOs de las distintas comunidades rurales, que brindaron la conexión con pobladores del lugar, con el fin de explicarles los alcances del estudio y en una segunda instancia poder realizar la encuesta, recibir el



consentimiento informado y realizar las extracciones de las muestras tanto sanguínea como de células de descamación de la cavidad bucal.

#### 4.4. Resultados del Capítulo

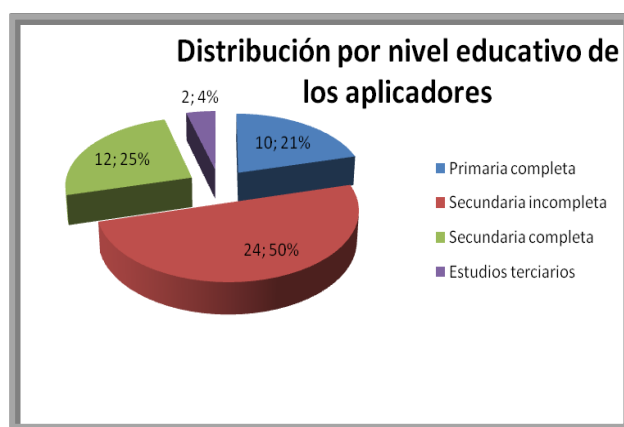
##### 4.4.1. Descripción socio-demográfica y hábitos de expuestos y controles

El promedio de edad del grupo de trabajadores es de  $32,09 \pm 12,18$  años y del grupo de controles es de  $33,24 \pm 13,05$  años, con un rango comprendido entre 18 y 65 años de edad para todos los sujetos. Al comparar ambos grupos usando test-T no se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad ( $P=0,653$ ).

En los cultivos de grandes extensiones de los departamentos santafesinos incluidos en el estudio, todos los aplicadores fueron varones ya que la tarea de pulverizar generalmente es realizada por empresas (pequeñas o medianas) que incluyen solo hombres para esta labor, cumpliendo los controles con la misma característica.

Los trabajadores generalmente pulverizaban en extensiones agrícolas cercanas a sus localidades de origen, pero ningún aplicador vivía en el campo. Las localidades donde residían los aplicadores eran de 1800 a 10000 habitantes. El promedio de años de residencia fue de  $19,53 \pm 11,94$  años. Todas las viviendas estaban construidas en ladrillo, con techo de chapa o teja, con servicio de agua de red e instalaciones sanitarias completas.

El análisis del nivel educativo de los trabajadores se muestra en la Figura 4.1 donde se destaca que los individuos expuestos tienen una alta tasa de escolaridad secundaria completa e incompleta (75%).



**Figura 4.1.** Distribución de los trabajadores de cultivos extensivos en función del nivel educativo.

Con referencia al acceso a cuidados de la salud, los sujetos del estudio tienen la posibilidad de utilizar los servicios de Salud, a través de Hospitales públicos provinciales o SAMCos y además el 56,25 % posee cobertura de obras sociales. Solo cuatro trabajadores realizaron consultas médicas por problemas generados por la exposición a plaguicidas.

En la tabla 4.1 se presentan los datos correspondientes a los hábitos de los individuos expuestos y los del grupo control, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en el hábito de fumar y el consumo de alcohol entre ambas poblaciones.

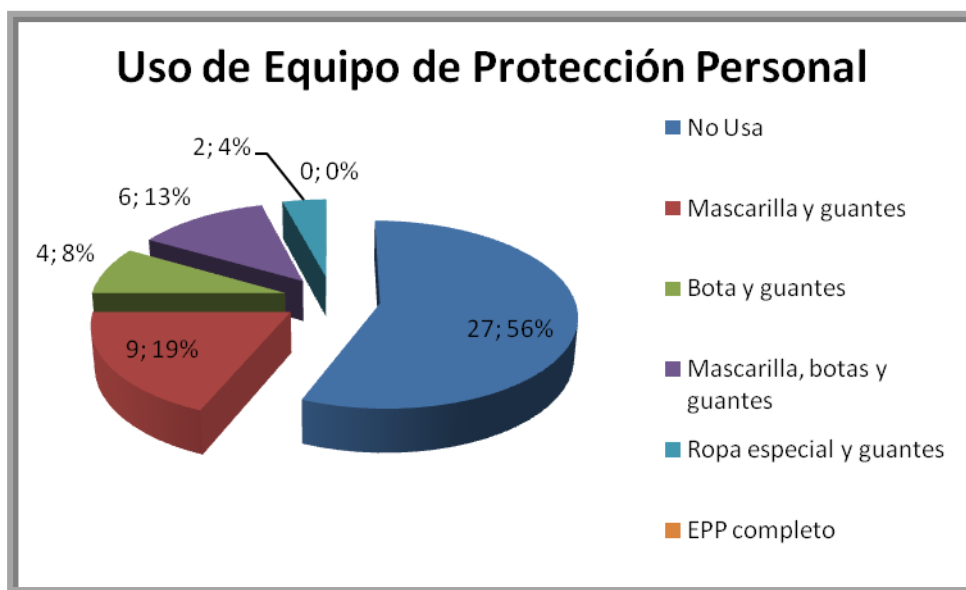
**Tabla 4.1.** Categorización de los controles y de los aplicadores de cultivos extensivos en función de los hábitos de fumar y consumir alcohol (n y %) y comparación estadística entre ambas poblaciones.

Parámetros	Controles (n=50)	Trabajadores (n=48)	Valor de P (U-Test)
<b>Fuma (n)(%)</b>			
<b>Si</b>	17 (34)	11 (29)	0,667
<b>No</b>	33 (66)	37 (71)	
<b>Alcohol (n)(%)</b>			
<b>Si</b>	27 (54)	24 (50)	0,875
<b>No</b>	23 (46)	24 (50)	

#### 4.4.2. Análisis de datos laborales de los aplicadores de cultivos extensivos

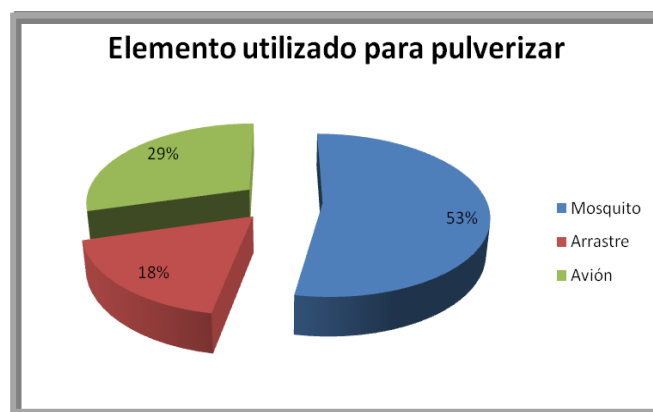
La antigüedad laboral fue  $11,33 \pm 9,78$  años, siendo en todos los casos la jornada laboral mayor a 8 horas en los meses de intensa aplicación de agroquímicos.

Al analizar los datos referidos al uso de equipo de protección personal, se observa que ningún trabajador utiliza el equipo de manera adecuada. El 56 % no usa ningún tipo de protección, y el 46% utiliza al menos 2 elementos para protegerse. La Figura 4.2 muestra la frecuencia de uso de los distintos equipos utilizados para pulverizar pesticidas en cultivos extensivos en el grupo en estudio.



**Figura 4.2.** Distribución de los trabajadores de cultivos extensivos en función del uso de equipo de protección personal.

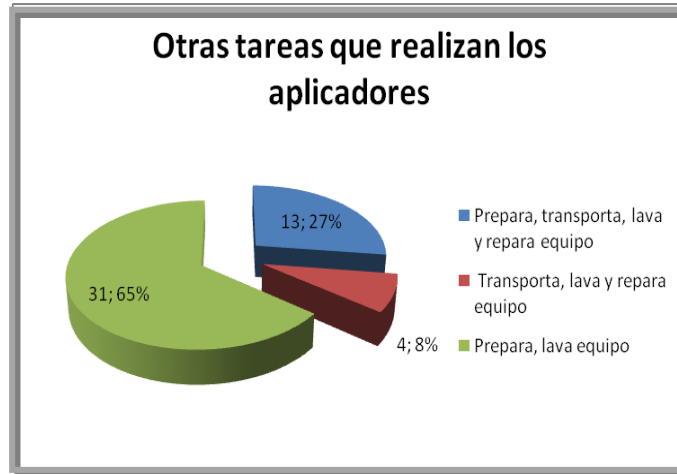
Cuando se evaluaron los datos referidos al almacenamiento de los pesticidas, el 100 % de los casos tenía un depósito especial para los plaguicidas, fuera del hogar. En el 73,21 % de los casos, no tenían ningún tipo de equipo en el depósito para manejar derrames o accidentes. Con referencia al tipo de elemento utilizado para pulverizar, el 71 % de los casos utiliza mosquito o arrastre y el 29 % utiliza avión (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Elementos de pulverización utilizados por los trabajadores de cultivos extensivos

Todos los sujetos incluidos en el estudio, además de aplicar los plaguicidas realizaban otras tareas: preparar el caldo, transportar los pesticidas desde el depósito hasta el lugar de su aplicación, lavar el equipo luego de utilizado y reparar el equipo. El equipo de protección utilizado al realizar estas tareas fueron los guantes en el momento de la preparación en el 37,5

% de los casos. El 91,66 % de los aplicadores conocían los productos utilizado. En la Figura 4.4 se observan otras tareas que realizan los aplicadores que involucran exposición a pesticidas.



**Figura 4.4.** Otras tareas realizadas por los aplicadores que involucran exposición a pesticidas.

Los plaguicidas que utilizaron los aplicadores según la información obtenida de las encuestas laborales, se presenta en la Tabla 4.2. Los mismos fueron clasificados por su acción contra vectores específicos, detallando en cada caso el número de CAS, la clase química a la que pertenecen y las evaluaciones realizadas por la IARC, U.S.EPA y OMS para cada uno de los compuestos.

**Tabla 4.2.** Plaguicidas utilizados por los aplicadores clasificados por su mecanismo de acción.

Pesticidas	Compuestos	Número CAS	Clase Química	IARC	US EPA	OMS
<b>Fungicida</b>	Mancozeb	8018-01-7	Ditiocarbamato- Zinc	NL	B2	U
<b>Insecticida-Nematicida</b>	Clorpirifos	2921-88-2	Organofosforado	NL	E	II
	Cipermetrina	67375-30-8	Piretroide	NL	NL	II
	Dimetoato	60-51-5	Organofosforado	NL	C	II
	Endosulfan	115-29-7	Organoclorado	NL	NL	II
<b>Insecticida</b>	Pirimicarb	23103-98-2	Metil Carbamato	NL	Probable	II
	Alfacipermetrina	67375-30-8	Piretroide	NL	II	II
	Metamidofos	10265-92-6	Organofosforado	NL	E	Ib
	Monocrotofos	6923-22-4	Organofosforado	NL	NL	Ib
<b>Herbicida</b>	Glifosato	1071-83-6	Fosfonoglicina	NL	E	III
	Glifosato Trimesium	81591-81-3	Fosfonoglicina	NL	E	III
	Flumetsulam	98967-40-9	Triazolo Pirimidina	NL	E	U
	2,4 D	94-75-7	Acido Clorfenoxido	2 B	D	II
	Paraquat	1910-42-5	Bipiridilium	NL	E	II
	Picloram	1918-02-1	Acido Piridincarboxilico	3	E	III

**Evaluaciones de carcinogenicidad:**

**IARC (Agencia Internacional de investigación de cáncer)**

**Grupo 1:** Conocido carcinógeno; **Grupo 2a:** Probable carcinógeno; **Grupo 2b:** Posible carcinógeno; **Grupo 3:** No clasificable como carcinógeno datos incompletos o ambiguos; **Grupo 4:** Probablemente no carcinógeno **NL:** No Listado

**Clasificación de Carcinogenicidad US EPA**

Entre 1986 y 1996: **Grupo A:** Conocido carcinógeno en humanos; **Grupo B1:** Probable carcinógeno humano; **Grupo B2:** Suficiente evidencia de carcinogenicidad para animal de estudio; **Grupo C:** Posible carcinógeno humano; **Grupo D:** No clasificable como carcinógeno humano; **Grupo E:** Evidencia de no-carcinogenicidad para humanos.

Entre 1996 y 1999: Conocidos/Probables carcinógenos; No se puede determinar; No probable.

Desde 1999 al presente: Carcinógenos para humanos; Probable carcinógeno; Sugerido pero no suficiente para ser carcinógeno; Datos inadecuados para ser carcinógeno; No probable.

**Clasificación de toxicidad aguda de la OMS:**

**Ia:** extremadamente peligroso **Ib:** altamente peligroso; **II:** Moderadamente peligroso; **III:** levemente peligroso; **U:** Es poco probable produzca un peligro grave en el uso normal.

En la Tabla 4.3 se presenta la información relacionada con las mezclas a las que los trabajadores estuvieron expuestos durante la última semana, con el objeto de realizar su posterior análisis y discusión. Se consideró el área geográfica de la que provenían y los nombres comerciales que fueron utilizados en el relevamiento de datos.

**Tabla 4.3.** Mezclas de plaguicidas utilizadas considerando la localidad más cercana y el número de aplicadores.

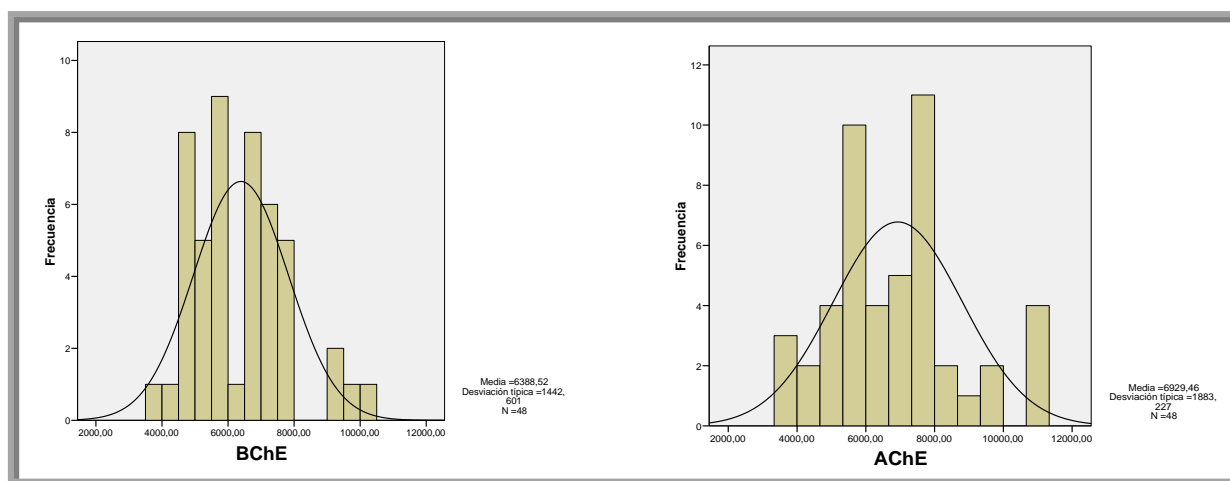
Nro. de Mezcla	Localidad	Nro. de trabajadores expuesto	Nombre comercial de los plaguicidas
1	Monte Vera	7	Cipermetrina-Dimetoato-Glifosato
2	Progreso	3	Glifosato-Dimetoato-Preside (Flumetsulam)-2,4D
3	Santo Domingo	4	Metamidofos-2,4D-Glifosato
4	Santo Domingo	6	Cipermetrina-Endosulfan- Glifosato
5	Ceres	7	Metamidofos-Clorpirifos-Dimetoato-Cipermetrina-Glifosato-Gramoxone (Paraquat)-2,4D-Tordon (Picloran)-Paton 50 (Pirimicard)-Sulfosato (Glifosato Trimesium)-Monocrotofos
6	San Joaquín	4	Glifosato
7	Cayastá	6	Fastac (Alfamecina)
8	Helvecia	11	Dimetoato-Manzate (Mancozeb)-Monocrotofos

#### 4.4.3. Exploración estadística de los resultados de cada biomarcador.

##### 4.4.3.1. Estadística descriptiva de enzimas Colinesterasas

##### 4.4.3.1.1. Actividad de Butirilcolinesterasa plasmática en los aplicadores

En la Figura 4.5.a. se observa la distribución para este biomarcador cuyo valor promedio fue  $6388,52 \pm 1442 \text{ U l}^{-1}$ , la cual se ajusta a la distribución normal (test K-S,  $P=0,380$ ).



**Figura 4.5.a.** Distribución de los resultados obtenidos para BChE en los aplicadores de cultivos extensivos (izquierda). **b.** Distribución de los resultados obtenidos para AChE en los aplicadores de cultivos extensivos (derecha).

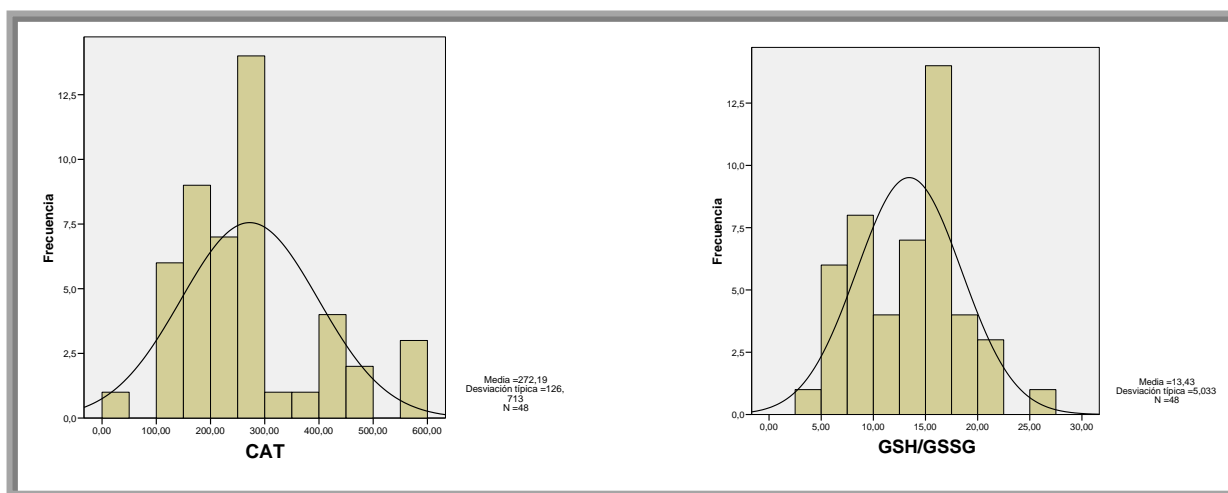
#### 4.4.3.1.2. Actividad de Acetilcolinesterasa eritrocitaria en los aplicadores

En la Figura 4.5.b. se observa la distribución para este biomarcador cuyo valor promedio fue  $6929,45 \pm 1883 \text{ U l}^{-1}$ , ajustándose a la normal (test K-S,  $P=0,598$ ).

#### 4.4.3.2. Estadística descriptiva de los marcadores del Estado oxidativo

##### 4.4.3.2.1. Actividad de Catalasa en los eritrocitos de los aplicadores

En el caso de la actividad de CAT como biomarcador de estrés oxidativo, se obtuvo un valor promedio de  $272,19 \pm 56,71 \text{ kU g}^{-1}$  de Hb, con un comportamiento que no se ajusta a una distribución normal (test K-S,  $P=0,045$ ; Figura 4.6.a).



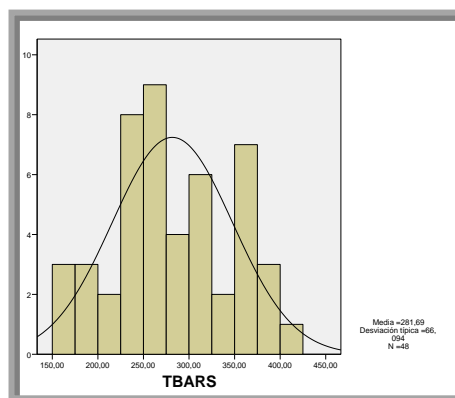
**Figura 4.6.a.** Distribución de los resultados obtenidos para CAT en los aplicadores de cultivos extensivos (izquierda). **b.** Distribución de los resultados obtenidos para la relación GSH/GSSG en los aplicadores de cultivos extensivos (derecha).

##### 4.4.3.2.2. Relación GSH/GSSG en eritrocitos de los aplicadores

El biomarcador de estrés oxidativo, GSH/GSSG, arrojó un valor promedio de actividad de  $13,43 \pm 5,03$ , con un comportamiento que se ajusta a una distribución normal (test K-S,  $P=0,716$ ; Figura 4.6.b).

#### 4.4.3.2.3. Medición de lípido peroxidación mediante TBARS en eritrocitos de aplicadores

El tercer biomarcador de estrés oxidativo, TBARS, presentó valores de  $281,69 \pm 66,09$  nmol  $g^{-1}$  de Hb, el cual se ajusta a una distribución normal (test K-S,  $P=0,567$ , Figura 4.7).

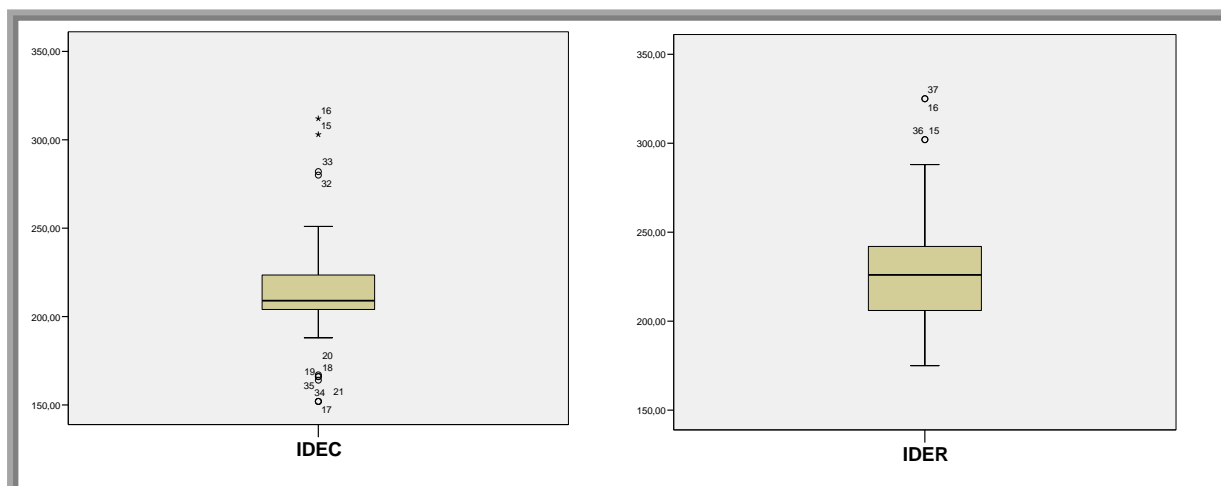


**Figura 4.7.** Distribución de los resultados obtenidos para TBARS en los aplicadores de cultivos extensivos

#### 4.4.3.3. Estadística descriptiva de los marcadores de Genotoxicidad

##### 4.4.3.3.1. Ensayo Cometa en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores

Cuando analizamos este biomarcador observamos que el valor promedio de IDEC del grupo en estudio fue:  $212,33 \pm 33,70$ , con una distribución que no se ajusta a la normal (Test K-S,  $P=0,021$ ; Figura 4.8.a.).



**Figura 4.8.a.** Distribución de los resultados obtenidos para IDEC en los aplicadores de cultivos extensivos (izquierda). **b.** Distribución de los resultados obtenidos para IDER en los aplicadores de cultivos extensivos (derecha).

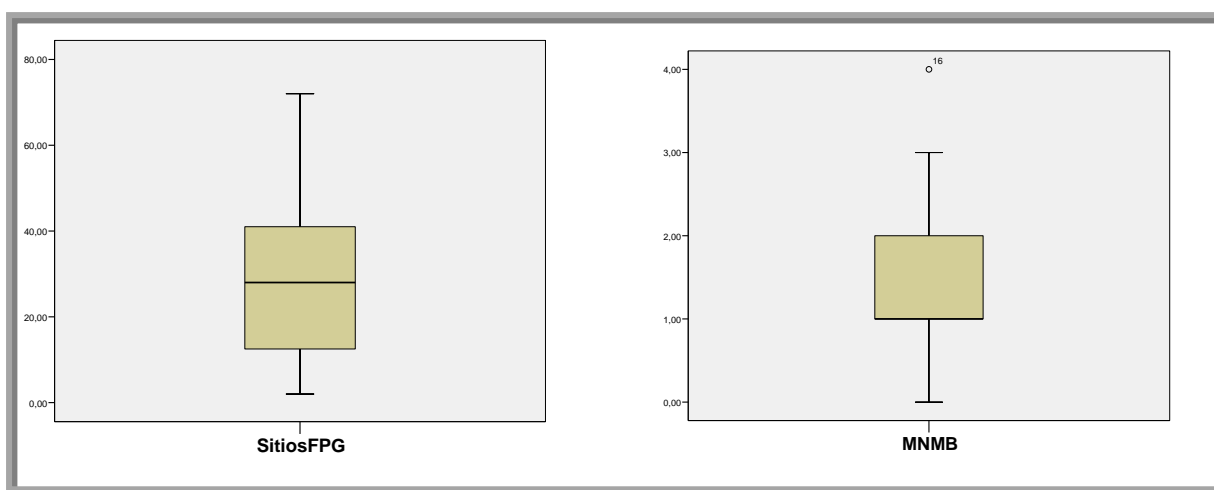


#### 4.4.3.3.2. Ensayo de reparación en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores

El análisis de este biomarcador indicó un valor promedio de IDER del grupo en estudio fue:  $229,66 \pm 36,25$  con una distribución que no se ajusta a la normal (Test K-S,  $P=0,084$ ; Figura 4.8.b).

#### 4.4.3.3.3. Sitios FPG en linfocitos de sangre periférica de los aplicadores

En el análisis de este biomarcador observamos que el valor promedio de Sitios FPG del grupo en estudio fue:  $28,91 \pm 19,35$  y su distribución se ajusta a la normal (Test K-S,  $P=0,513$ ; Figura 4.9.a).



**Figura 4.9.a.** Distribución de los resultados obtenidos para Sitios FPG en los aplicadores de cultivos extensivos (izquierda). **b.** Distribución de los resultados obtenidos para MNMB en los aplicadores de cultivos extensivos (derecha).

#### 4.4.3.3.4. Micronúcleos en mucosa bucal de los aplicadores

El análisis de la frecuencia de MNMB mostró un valor promedio de  $1,35 \pm 0,59$ , cuya distribución no se ajusta a la normal (Test K-S,  $P= 0,030$ ; Figura 4.9.b).

#### 4.4.4. Estadística bivariada aplicada a los biomarcadores en controles y aplicadores de cultivos extensivos

Con el objeto de sintetizar los datos obtenidos más relevantes, a continuación se presentan las tablas que resumen los resultados de los biomarcadores utilizados en esta etapa tanto en la población expuesta como en la población control.

**Tabla 4.4.** Valores promedio y desvío estándar de las actividades de Colinesterasas en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.

<b>Actividades de Colinesterasas (X±DE)</b>	<b>Controles (n=50)</b>	<b>Aplicadores (n=48)</b>
<b>BChE (U l<sup>-1</sup>)</b>	6733,90 ± 1012	6388,52 ± 1442*
<b>AChE (U l<sup>-1</sup> de eritrocitos)</b>	8870,62 ± 1376	6929,45 ± 1883*

\*P<0,05; Test de T.

En la Tabla 4.4 se observa que los aplicadores de plaguicidas muestran una disminución estadísticamente significativa de ambas enzimas colinesterasas. BChE disminuyó un 5,12 % (P=0,015; Test T) y AChE un 21,8 % (P=0,045; Test T) cuando se los compara con el grupo control.

**Tabla 4.5.** Valores promedio y desvío estándar de los marcadores de Estado Oxidativo en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.

<b>Parámetros de Estado Oxidativo (X±DE)</b>	<b>Controles (n=50)</b>	<b>Aplicadores (n=48)</b>
<b>CAT (kU g<sup>-1</sup> de Hb)</b>	169,09 ± 86,32	272,19 ± 126,71*
<b>GSH/GSSG</b>	25,66 ± 7,99	17,43 ± 8,03*
<b>TBARS (nmol g<sup>-1</sup> de Hb)</b>	191,33 ± 32,99	281,69 ± 66,09*

\*P<0,01; CAT: Test de Mann-Whitney; TBARS y GSH/GSSG: Test T.

Cuando se realiza el análisis de los biomarcadores de estado oxidativo se observa un aumento significativo en los niveles de TBARS (47%) en los aplicadores de plaguicidas (Test T, P <0,01; Tabla 4.5). Por otra parte, CAT presentó un incremento del 61% en los expuestos (Test de M-W, P <0,01) y al mismo tiempo se observa una disminución estadísticamente significativa del 80% en la relación GSH/GSSG (Test T, P <0,01), siempre en relación con la población control.

**Tabla 4. 6.** Valores promedio y desvío estándar de las actividades de los marcadores de Genotoxicidad en los controles y aplicadores de cultivos extensivos.

<b>Parámetros de Genotoxicidad (X±DE)</b>	<b>Controles (n=50)</b>	<b>Aplicadores (n=48)</b>
<b>Ensayo Cometa (IDEC)</b>	148,92 ± 35,84	212,33 ± 33,70*
<b>Ensayo de Reparación (IDER)</b>	152,64 ± 35,55	229,66 ± 36,25*
<b>Sitios FPG</b>	13,26 ± 5,53	29,18 ± 17,95*
<b>MNMB</b>	0,54 ± 0,34	1,35 ± 0,69*

IDEC, IDER y MNMB : P<0,01 Test de Mann Whitney; Sitios FPG: P<0,01 Test T.

En la Tabla 4.6 se presenta los resultados del análisis de los biomarcadores de genotoxicidad. Previo a la realización del EC se evaluó la viabilidad y se expresó en función del porcentaje de células viables, obteniendo en todos los casos resultados superiores al 95 %. El análisis de los valores obtenidos en el Ensayo Cometa y el Ensayo de Reparación indican un aumento significativo tanto de IDEC (43%) como de IDER (51%) en el grupo expuesto cuando se lo compara con respecto al grupo control (Test de M-W, P<0,01). En este mismo análisis observamos que los sitios FPG muestran un incremento significativo (124%; Test T, P <0,01) respecto a los controles, así como los MNMB (150%; Test de Mann Whitney, P<0,01).

#### **4.4.5. Análisis de la influencia de los factores de confusión sobre los biomarcadores**

En las siguientes tablas se analizarán los biomarcadores: AChE, BChE, CAT, TBARS, GSH/GSSG, IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB, en aplicadores de plaguicidas, los cuales se presentan estratificados por los factores de confusión relacionados con características demográficas, hábitos y parámetros laborales.

**Tabla 4.7.** BChE, AChE, CAT, GSH/GSSG y TBARS en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión.

<b>Parámetros</b>	<b>n</b>	<b>BChE</b> <b>(X±DE)</b>	<b>AChE</b> <b>(X±DE)</b>	<b>CAT</b> <b>(X±DE)</b>	<b>GSH/GSSG</b> <b>(X±DE)</b>	<b>TBARS</b> <b>(X±DE)</b>
<b>Edad (años)</b>						
<b>&lt;30</b>	25	6100,00±658	7931,60±1669	152,86±85,36	10,65±8,65	345,40±48,37
<b>≥30</b>	23	6317,23±948	7562,00±1393	274,66±80,83*	8,34±2,68	368,13±47,06
<b>Fuma</b>						
<b>Si</b>	26	5957,20±809	7180,40±957	205,46±103,19	7,47±3,70	376,19±22,77
<b>No</b>	22	6460,00±741	8313,20±1759	211,54±67,46	11,37±8,01	338,69±40,89
<b>Consume alcohol</b>						
<b>Si</b>	30	6148,00±737	8020,28±1684	210,98±104,73	7,62±3,66	376,69±20,48
<b>No</b>	18	6350,00±1025	7108,66±498	203,41±89,27	13,05±9,33	343,76±40,34
<b>Antigüedad</b>						
<b>Laboral (años)</b>						
<b>≤ 10</b>	24	6221,20±1009	8675,20±1479	186,97±103,75	10,89±8,60	338,98±40,85
<b>&gt;10</b>	24	6196,00±586	6818,40±686*	233,74±104,78	8,04±4,34	375,84±23,56
<b>EPP</b>						
<b>Si</b>	22	5994,00±1081	8540,00±1344	220,25±102,25	10,46±8,90	358,25±25,17
<b>No</b>	26	6351,66±572	6557,23±513**	193,79±75,18	8,87±4,32	352,72±52,49

BChE (U L<sup>-1</sup>); AChE (U L<sup>-1</sup> eritrocitos); CAT (kU g<sup>-1</sup> Hb); TBARS Assay (nmol g<sup>-1</sup> Hb). \*P: <0,05; \*\*P:<0,01 (Mann-Whitney Test)

El análisis de la Tabla 4.7 muestra que no se observan diferencias estadísticamente significativas en relación con los factores de confusión como tabaquismo y alcohol para los distintos biomarcadores. La edad como factor de evaluación solo presenta diferencias estadísticamente significativas para la enzima CAT (Test, P<0,05). Debido a que ningún

trabajador utiliza adecuadamente el EPP y un 56% de los trabajadores no utilizan ninguna protección (guantes, máscaras de respiración, gafas, ropa protectora, botas, etc.), hemos considerado que han utilizado medidas protectoras cuando al menos 2 elementos de protección están presentes, por lo tanto cuando se utiliza como factor de comparación el uso de EPP solamente se observan diferencias estadísticamente significativas para AChE (U-Test,  $P < 0,05$ ). Cuando se analiza la antigüedad laboral, nuevamente AChE presenta diferencias estadísticamente significativas (U-Test,  $P < 0,01$ ).

**Tabla 4.8.** IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB en aplicadores de plaguicidas estratificados por factores de confusión.

Parámetros	n	IDEC (X±DE)	IDER (X±DE)	Sitios FPG (X±DE)	MNMB (X±DE)
<b>Edad (años)</b>					
<30	25	220.18±31.5	244,00±47,56	29.90±13.10	1.09±0.51
≥30	23	231.16±33.5	252,16±40,39	28.17±16.02	1.33±0.52
<b>Fuma</b>					
		226.60±38.4	256,00±37,23	34.60 ±12.14	2.00±0.61
Si	26	223.00±28.0	242,16±47,58	27.08±12.56	0.83±0.33*
No	22				
<b>Consume Alcohol</b>					
Si	30	226.70±38.8	254,14±42,74	35.37±15.45	1.75±0.46
No	18	221.55±31.1	238,50±43,98	23.88±14.31	0.66±0.35*
<b>Antigüedad laboral(años)</b>					
≤10	22	209.55±17.7	230,20±41,90	20.44±17.5	0.78±0.47
>10	26	240.37±39.5	263,66±38,23**	39.25±17.9*	1.62±0.52
<b>EPP</b>					
Si	24	228,20±42,85	219,83±20,34	54,16±12,92	0,60±0,54
No	24	230,83±45,15	282,80±33,56	18,40±10,08**	2,33±1,21**

\*P: <0,05; \*\*P: <0,01 (Mann-Whitney Test)

Al analizar la Tabla 4.8 que resume la influencia de los factores de confusión sobre los marcadores de genotoxicidad, puede observarse que la edad no influye sobre ninguno de ellos, mientras que la frecuencia de MNMB está influida tanto por el hábitos de fumar como de consumir alcohol en esta población (U-Test,  $P < 0,05$ ). La antigüedad laboral influye sobre los resultados de IDER (U-Test,  $P < 0,01$ ) y de Sitios FPG (U-Test,  $P < 0,05$ ), al mismo tiempo que el uso del equipo de protección modifica los resultados de Sitios FPG y de MNMB (U-Test,  $P < 0,01$  en ambos casos).

#### **4.4.6. Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre los biomarcadores**

Los resultados obtenidos para cada uno de los biomarcadores fueron analizados en función de las mezclas que utilizaron los trabajadores durante la última semana previa a la toma de muestra, ya sea en forma de mezcla compleja o productos simples aplicados en forma consecutiva (Tabla 4.9). Las diferencias entre los distintos agrupamientos se analizaron mediante el Test de K-W.

**Tabla 4.9.** Evaluación de las mezclas de plaguicidas empleadas y su influencia sobre BChE, AChE, CAT, GSH/GSSG, TBARS, IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB,.

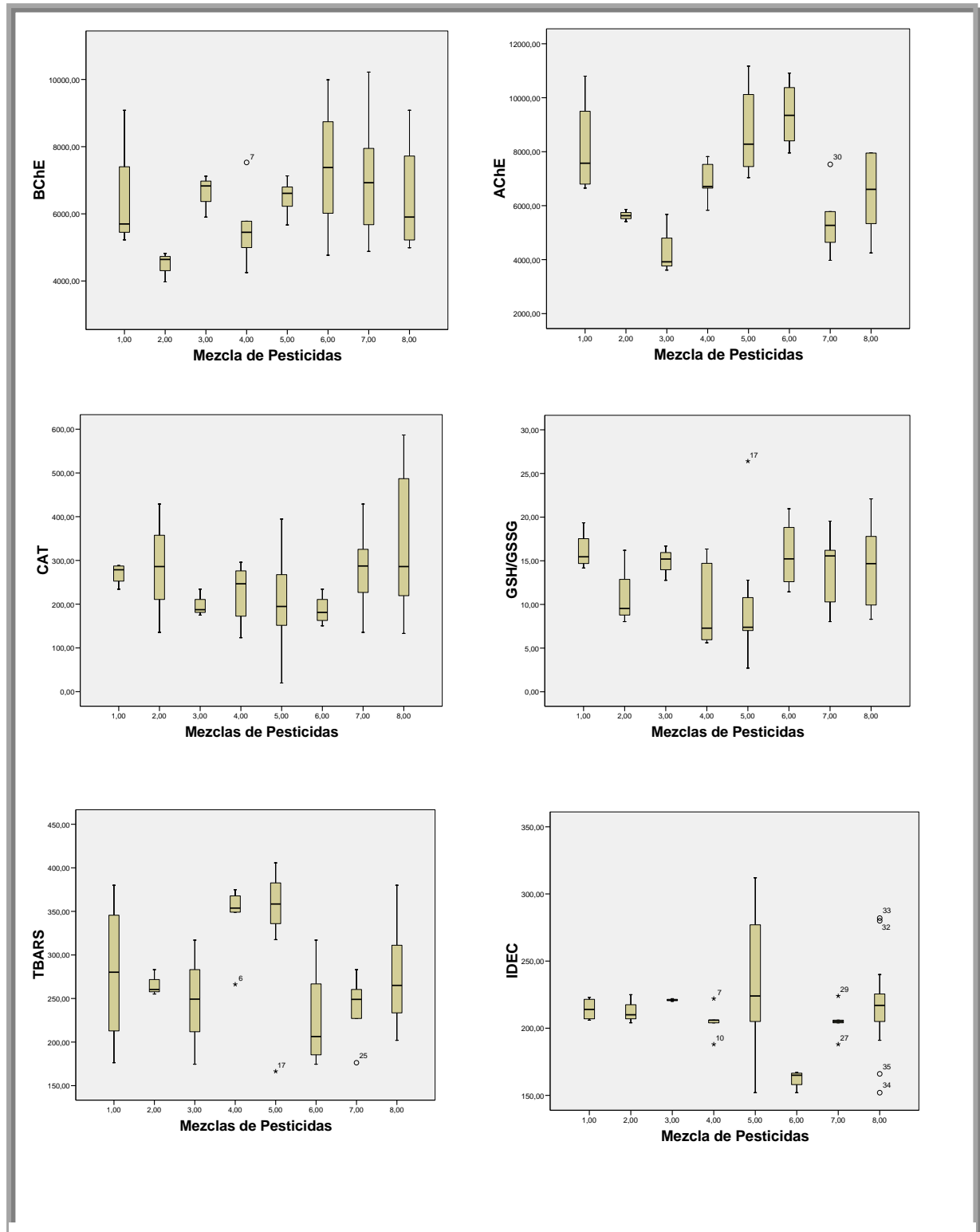
	Mezcla1	Mezcla2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7	Mezcla 8	P*
<b>BChE</b>	6426,00	4478,66	6618,33	5601,20	6494,28	7379,75	7097,00	6380,43	0,141
	±1786	±446	±634	±1221	±540	±2133	±1880	±1335	
<b>AChE</b>	8149,25	5633,33	4402,33	6908,40	8803,71	9389,25	5411,00	6482,43	<0,001
	±1889	±225	±1114	±788	±1693	±1274	±1243	±1293	
<b>CAT</b>	269,98	283,54	198,89	222,88	206,75	186,76	281,76	346,10	0,167
	±25,02	±146,71	±31,22	±72,75	±118,83	±35,17	±98,01	±157,96	
<b>GSH /</b>	16,11	11,25	14,80	9,98	10,29	15,71	14,19	14,49	0,179
<b>GSSG</b>	±2,25	±4,34	±1,97	±5,13	±7,69	±4,10	±4,23	±4,54	
<b>TBARS</b>	279,19	266,20	246,94	342,33	348,26	226,07	240,81	277,26	0,028
	±86,93	±14,89	±71,25	±43,79	±81,05	±62,99	±36,69	±50,62	
<b>IDEC</b>	214,25	213,00	221,00	205,20	236,00	162,25	205,33	217,12	0,066
	±8,68	±10,81	±11,00	±12,04	±57,17	±6,94	±11,43	±33,51	
<b>IDER</b>	269,75	229,66	228,66	221,20	257,42	192,25	220,66	223,06	0,111
	±51,44	±4,04	±5,50	±23,34	±52,16	±12,55	±12,11	±31,68	
<b>Sitios FPG</b>	20,25	31,00	33,50	21,40	48,28	18,75	14,50	13,50	0,050
	±11,05	±7,21	±17,67	±16,47	±16,46	±15,64	±3,45	±1,71	
<b>MNMB</b>	1,75	1,10	1,66	0,88	2,28	0,95	1,50	1,12	0,227
	±0,95	±0,98	±1,50	±0,80	±1,25	±0,75	±0,54	±0,80	

\*P: Test de Kruskal-Wallis

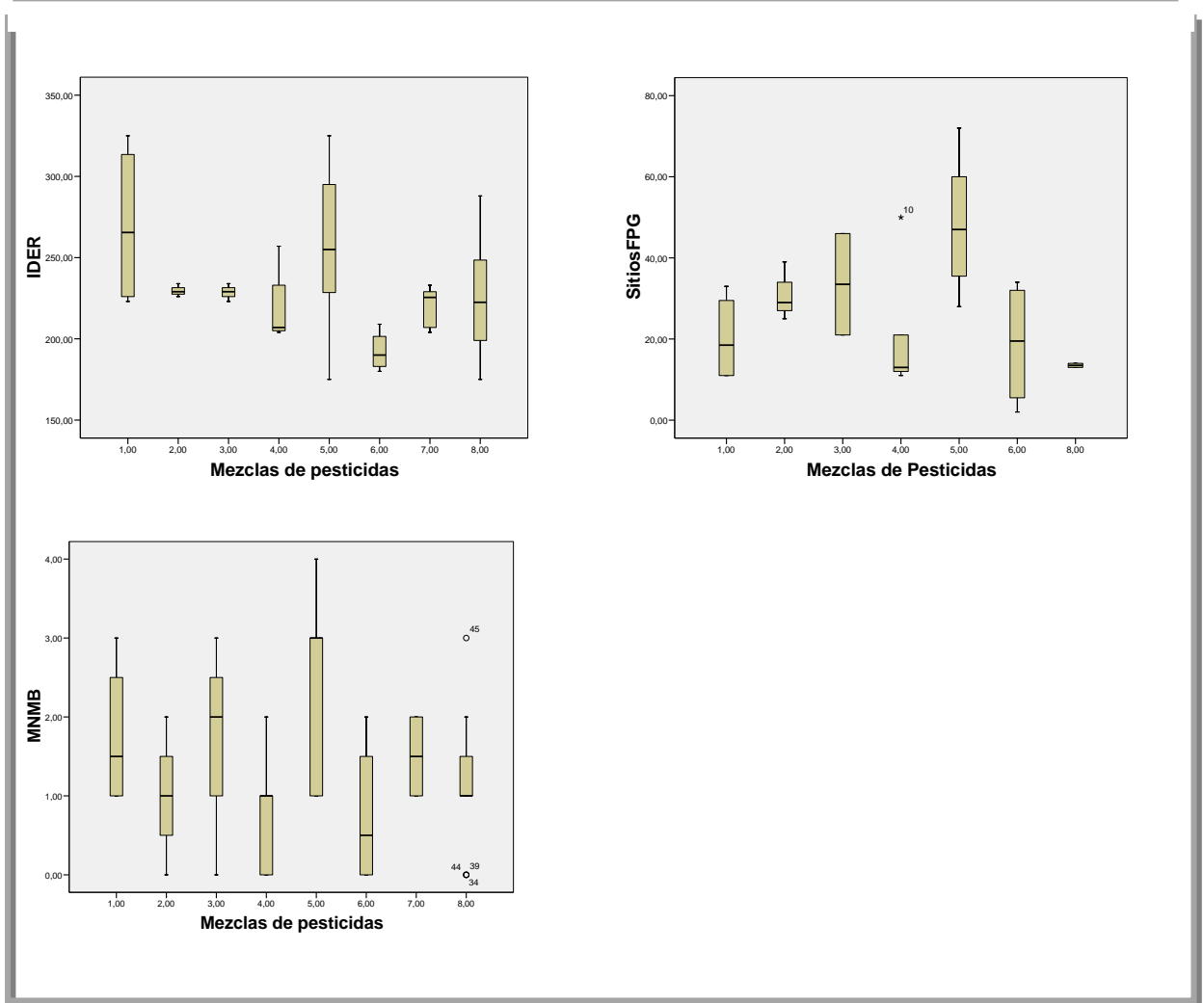
Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para AChE ( $P < 0,001$ ), y TBARS ( $P < 0,05$ ), mientras que es marginalmente significativa para Sitios FPG ( $P = 0,05$ ).

Con el objeto de mostrar el grado de dispersión de los datos, la mediana y el rango intercuartil debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los siguientes marcadores: AChE, BChE, CAT, TBARS, GSH/GSSG, IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB, se presenta en la Figura 4.10, las gráficas de box-plots.

**Figura 4.10.** Box-plots debido al efecto de las mezclas de pesticidas sobre los siguientes marcadores: AChE, BChE, IDEC, IDER, Sitios FPG, MNMB, CAT, TBARS y la relación GSH/GSSG.







#### 4.4.7. Evaluación de correlaciones entre las variables cuantitativas

Para evaluar la relación existente entre las variables cuantitativas se utilizó el análisis de correlación de Spearman.

En la Tabla 4. 10 se resumen las correlaciones (Rho de Spearman) entre todas las variables de laboratorio. Las correlaciones entre BChE y AChE, y entre BChE y TBARS fueron estadísticamente significativas (0,273 y 0,265 respectivamente).

AChE correlacionó con IDEC, IDER, CAT, TBARS y GSH/GSSG de manera estadísticamente significativa.

IDEC por su parte correlacionó significativamente con IDER (0,844), con sitios FPG (0,387) y con todos los parámetros de estrés oxidativo (CAT: 0,206; GSH/GSSG: 0,570; TBARS: 0,522).

**Tabla 4.10.** Análisis de correlaciones de Spearman de los diferentes biomarcadores en el grupo de aplicadores y controles.

			Correlaciones								
Rho de Spearman	BChE		BChE	AChE	IDEC	IDER	SitiosFPG	MNMB	CAT	TBARS	GSH/GSSG
		Coefficiente de correlación	1,000	,273**	-,196	-,141	-,082	-,006	-,101	-,265**	,169
		Sig. (bilateral)	.	,006	,053	,167	,481	,953	,322	,008	,096
		N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	AChE	Coefficiente de correlación	,273**	1,000	-,409**	-,383**	-,016	-,164	-,231*	-,419**	,359**
	AChE	Sig. (bilateral)	,006	.	,000	,000	,893	,107	,022	,000	,000
	AChE	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	IDEC	Coefficiente de correlación	-,196	-,409**	1,000	,844**	,387**	,427**	,206*	,522**	-,570**
	IDEC	Sig. (bilateral)	,053	,000	.	,000	,001	,000	,042	,000	,000
	IDEC	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	IDER	Coefficiente de correlación	-,141	-,383**	,844**	1,000	,435**	,426**	,148	,537**	-,566**
	IDER	Sig. (bilateral)	,167	,000	,000	.	,000	,000	,147	,000	,000
	IDER	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	SitiosFPG	Coefficiente de correlación	-,082	-,016	,387**	,435**	1,000	,418**	,154	,151	-,414**
	SitiosFPG	Sig. (bilateral)	,481	,893	,001	,000	.	,000	,181	,189	,000
	SitiosFPG	N	77	98	98	98	98	98	98	98	98
	MNMB	Coefficiente de correlación	-,006	-,164	,427**	,426**	,418**	1,000	,291**	,292**	-,267**
	MNMB	Sig. (bilateral)	,953	,107	,000	,000	,000	.	,004	,003	,008
	MNMB	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	CAT	Coefficiente de correlación	-,101	-,231*	,206*	,148	,154	,291**	1,000	,378**	-,285**
	CAT	Sig. (bilateral)	,322	,022	,042	,147	,181	,004	.	,000	,004
	CAT	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	TBARS	Coefficiente de correlación	-,265**	-,419**	,522**	,537**	,151	,292**	,378**	1,000	-,537**
	TBARS	Sig. (bilateral)	,008	,000	,000	,000	,189	,003	,000	.	,000
	TBARS	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98
	GSH/GSSG	Coefficiente de correlación	,169	,359**	-,570**	-,566**	-,414**	-,267**	-,285**	-,537**	1,000
	GSH/GSSG	Sig. (bilateral)	,096	,000	,000	,000	,000	,008	,004	,000	.
	GSH/GSSG	N	98	98	98	98	98	98	98	98	98

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Sitios FPG además de correlacionar con IDEC e IDER, correlacionó significativamente con GSH/GSSG (0,414).

MNMB correlacionó con IDEC, IDER y sitios FPG (0,427, 0,426 y 0,418) y en menor medida con los parámetros de estrés oxidativo (CAT: 0,291; TBARS: 0,292; GSH/GSSG: 0,267).

Los parámetros de estrés oxidativo correlacionaron entre sí (CAT y TBARS: 0,378; CAT y GSH/GSSG: 0,285; TBARS y GSH/GSSG: 0,537).

#### 4.4.8. Estadística Multivariada aplicada a las variables cualitativas y cuantitativas

Las variables cuantitativas fueron dicotomizadas (0 y 1), escogiéndose como criterio de dicotomización: 0 para los valores menores de la mediana y 1 para los valores que superaban la mediana. Con las variables, tanto cualitativas como cuantitativas dicotomizadas se realizó la matriz de similaridad, lo que permite observar la relación entre todas las variables. Finalmente

se construyó un gráfico que permite visualizar la cercanía de las variables en el espacio, a través de un plano que el programa selecciona como representativo.

Las abreviaturas consideradas para construir la matriz de similaridad fueron: Ah: mayor edad, Al: menor edad, Ri: tiempo de residencia corto, Rh: tiempo de residencia largo, Hco: secundaria completa, Hin: secundaria incompleta, SM: fuma, noSM: no fuma, ALC: consume alcohol frecuentemente, noAL: no consume alcohol frecuentemente, DUh: mayor antigüedad laboral, DUl: menor antigüedad laboral, EPP: equipo de protección personal, noEPP: no usa equipo de protección personal, Mosq: usa mosquito o arrastre para pulverizar, Avi: usa avión para pulverizar, MNI: MNMB bajo, MNh: MNMB alto, ACh: valores elevados de AChE, AChl: valores bajos de AChE, ECh: valores elevados de EC, ECl: valores bajos de EC, SITl: valores bajos de sitios FPG, SITh: valores bajos de sitios FPG, EOl: valores no alterados en los parámetros de estrés oxidativo, EOh valores alterados en los parámetros de estrés oxidativo.

**Tabla 4.11** Matriz de similaridad considerando las variables cualitativas y las cuantitativas dicotomizadas.

	Ah	Al	Ri	Rh	Hco	Hin	SM	noSM	ALC	noAL	DUh	DUl	EPP	noEPP	Mosq	Avi	MNI	MNh	ACh	ACl	ECh	ECl	SITl	SITh	EOl	EOh	
Ah	1.00																										
Al	-1.00	1.00																									
Ri	-0.04	0.04	1.00																								
Rh	0.04	-0.04	-1.00	1.00																							
Hco	-0.12	0.12	0.35	-0.35	1.00																						
Hin	0.12	-0.12	-0.35	0.35	-1.00	1.00																					
SM	-0.35	0.35	0.11	-0.11	0.39	-0.39	1.00																				
noSM	0.35	-0.35	-0.11	0.11	-0.39	0.39	-1.00	1.00																			
ALC	0.12	-0.12	-0.53	0.53	-0.28	0.28	0.13	-0.13	1.00																		
noAL	-0.12	0.12	0.53	-0.53	0.28	-0.28	-0.13	0.13	-1.00	1.00																	
DUh	0.10	-0.10	-0.41	0.41	-0.16	0.16	-0.09	0.09	0.16	-0.16	1.00																
DUl	-0.10	0.10	0.41	-0.41	0.16	-0.16	0.09	-0.09	-0.16	0.16	-1.00	1.00															
EPP	-0.17	0.17	0.01	-0.01	-0.06	0.06	-0.13	0.13	-0.10	0.10	-0.12	0.12	1.00														
noEPP	0.17	-0.17	-0.01	0.01	0.06	-0.06	0.13	-0.13	0.10	-0.10	0.12	-0.12	-1.00	1.00													
Mosq	-0.02	0.02	0.18	-0.18	-0.12	0.12	-0.09	0.09	0.12	-0.12	-0.23	0.23	-0.04	0.04	1.00												
Avi	0.14	-0.14	-0.08	0.08	0.10	-0.10	0.06	-0.06	-0.31	0.31	0.19	-0.19	-0.02	0.02	-0.59	1.00											
MNI	-0.09	0.09	0.60	-0.60	0.28	-0.28	-0.01	0.01	-0.28	0.28	-0.21	0.21	0.18	-0.18	0.10	-0.18	1.00										
MNh	0.09	-0.09	-0.60	0.60	-0.28	0.28	0.01	-0.01	0.28	-0.28	0.21	-0.21	-0.18	0.18	-0.10	0.18	-1.00	1.00									
ACh	0.22	-0.22	-0.30	0.30	-0.01	0.01	-0.08	0.08	0.18	-0.18	0.30	-0.30	-0.36	0.36	-0.37	0.42	-0.29	0.29	1.00								
ACl	-0.22	0.22	0.30	-0.30	0.01	-0.01	0.08	-0.08	-0.18	0.18	-0.30	0.30	0.36	-0.36	0.37	-0.42	0.29	-0.29	-1.00	1.00							
ECh	0.17	-0.17	-0.01	0.01	-0.27	0.27	-0.20	0.20	-0.23	0.23	0.12	-0.12	0.10	-0.10	-0.25	0.02	-0.18	0.18	0.04	-0.04	1.00						
ECl	-0.17	0.17	0.01	-0.01	0.27	-0.27	0.20	-0.20	0.23	-0.23	-0.12	0.12	-0.10	0.10	0.25	-0.02	0.18	-0.18	-0.04	0.04	-1.00	1.00					
SITl	-0.12	0.12	0.35	-0.35	0.10	-0.10	0.22	-0.22	-0.10	0.10	-0.33	0.33	0.10	-0.10	0.19	-0.33	0.28	-0.28	-0.18	0.18	0.23	-0.23	1.00				
SITh	0.02	-0.02	-0.29	0.29	-0.04	0.04	-0.15	0.15	0.04	-0.04	0.42	-0.42	-0.03	0.03	-0.21	0.36	-0.24	0.24	-0.24	-0.13	0.13	-0.92	1.00				
EOl	0.14	-0.14	-0.08	0.08	-0.13	0.13	-0.36	0.36	0.31	-0.31	-0.09	0.09	0.03	-0.03	0.21	-0.36	0.24	-0.24	-0.08	0.08	-0.20	0.20	0.22	-0.32	1.00		
EOh	-0.14	0.14	0.08	-0.08	0.13	-0.13	0.36	-0.36	-0.31	0.31	0.09	-0.09	-0.03	0.03	-0.21	0.36	-0.24	0.24	0.08	-0.08	0.20	-0.20	0.22	-0.32	-1.00	1.00	

En la Tabla 4.11 es posible evaluar las similitudes entre las variables cualitativas y cuantitativas en forma conjunta.

Si se evalúan los valores elevados de MNMB (en la tabla presentado como MNh) es posible observar su similitud con el mayor tiempo de residencia ( $R_h=0,60$ ), con la escolaridad secundaria incompleta ( $H_{in}=0,28$ ) y con el hábito de consumir alcohol ( $ALC=0,28$ ).

Los valores bajos de Colinesterasa (ACI) están relacionados inversamente con mayor tiempo de residencia ( $R_h=0,30$ ), mayor antigüedad laboral ( $DU_h=0,28$ ), el uso de EPP ( $PPE=0,36$ ), la pulverización aérea ( $Av_i=0,42$ ) y valores elevados de MNMB ( $MN_h=0,29$ ).

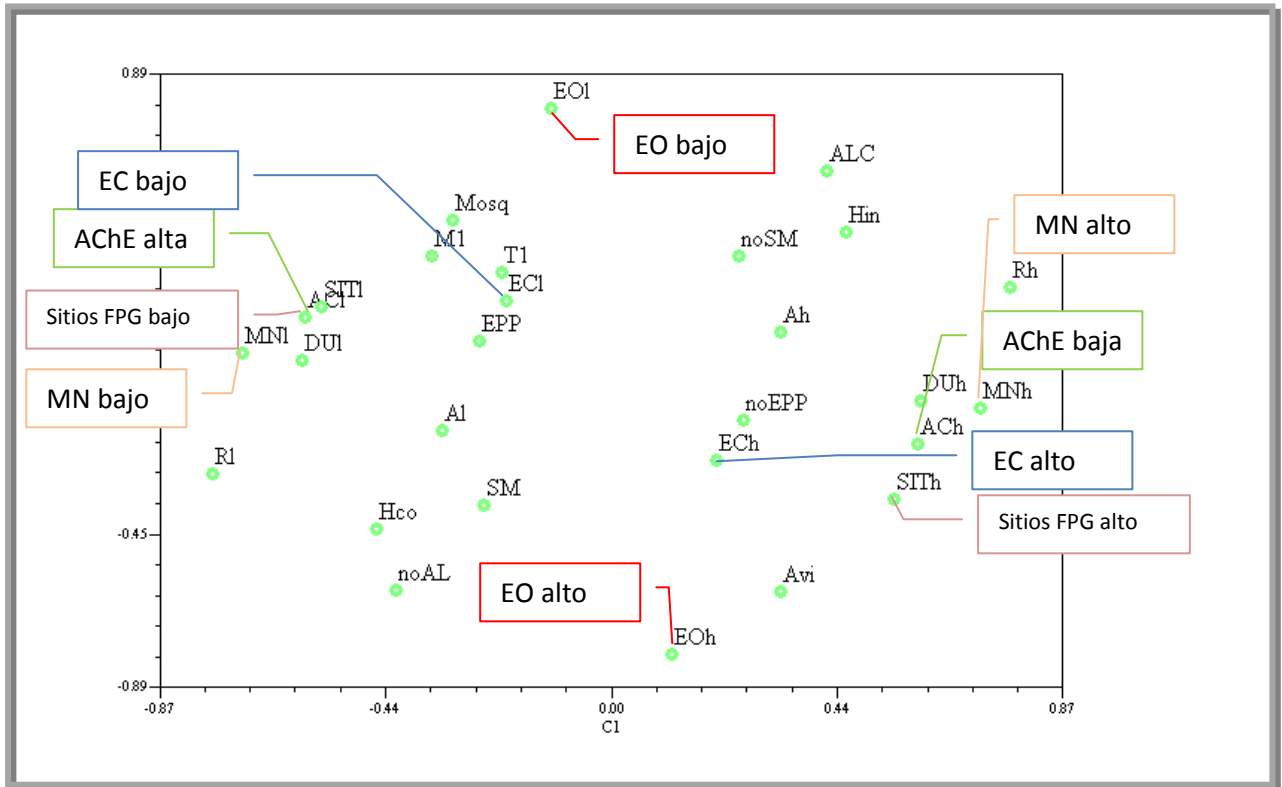
Los valores de IDEC elevados ( $ECh$ ) se relacionan con la escolaridad secundaria incompleta ( $H_{in}=0,27$ ) y con el hábito de fumar ( $SM=0,27$ ), e inversamente con la utilización de mosquito como elemento para pulverizar.

Sitios FPG elevados ( $SIT_h$ ) se relacionan con un mayor tiempo de residencia ( $R_h=0,29$ ), con una mayor antigüedad laboral ( $DU_h=0,42$ ), con la pulverización aérea ( $Av_i=0,36$ ), con frecuencia de MNMB elevada ( $MN_h=0,24$ ) e inversamente con valores bajos de AChE ( $ACI=0,24$ ), y con los Sitios FPG elevados ( $SIT_h=0,92$ ).

Los parámetros de Estado oxidativo alterados se correlacionaron con el hábito de fumar ( $SM=0,36$ ), con la pulverización aérea ( $Av_i=0,36$ ) y con Sitios FPG elevados ( $SIT_h=0,32$ ).

La Figura 4.11 muestra la dispersión de los puntos que representan a todas las variables evaluadas. El plano donde se representan las variables son las dos coordenadas o ejes que más contribuyen estadísticamente en esta evaluación. La dispersión de las variables en este plano muestra las distancias entre los puntos que representan las similitudes entre las variables tanto cualitativas como cuantitativas.

**Figura 4.11.** Matriz de dispersión de las variables cualitativas y cuantitativas dicotomizadas



**4.4.9. Odds Ratio para los biomarcadores considerando los distintos factores de riesgo**

En las evaluaciones de OR de este trabajo, se intenta evaluar la influencia de factores como exposición, edad, hábito de fumar o de consumir alcohol, escolaridad secundaria, tiempo de residencia y las variables laborales como el uso de EPP y la antigüedad laboral, sobre cada uno de los marcadores.

En la Tabla 4.12 se marcaron los intervalos que no contienen al uno y que muestran un incremento del Odds ratio del biomarcador al considerar distintas predisponentes de exposición. Cuando se utilizó la exposición como factor todos los biomarcadores mostraron aumentos significativos.

En los aplicadores se observó OR cercano a 3, con un intervalo que incluye aumentos hasta de 15 veces en los Sitios FPG cuando se utilizó el uso de EPP como factor y desde una hasta 130 veces para los MNMB. Los mismos marcadores presentaron OR cercanos a 5 cuando se consideró antigüedad como factor.

**Tabla 4.12.** Análisis de las tablas de contingencia simples (2x2) para obtener los Odds Ratio (OR) con un Intervalo de Confianza (IC) del 95%.

Parámetros	BChE (OR, IC)	AChE (OR, IC)	IDEC (OR, IC)	Sitios FPG (OR, IC)	MNMB (OR, IC)	TBARS (OR, IC)	GSH /GSSG (OR, IC)
<b>Exposición</b>	3,03 (1,03-9,09)	4,39 (1,36-14,61)	14,32 (2,68-101,39)	16,6 (3,01-113,67)	5,60 (1,73-18,76)	11,33 (2,77-50,52)	6,64 (1,77-23,36)
<b>Edad</b>	1,14 (0,24-5,41)	0,71 (0,15-3,29)	1,77 (0,38-8,49)	0,89 (0,19-4,11)	1,33 (0,20-9,51)	2,29 (0,48-11,33)	0,56 (0,12-2,61)
<b>Fuma</b>	0,86 (0,16-4,53)	1,20 (0,23-6,33)	0,57 (0,10-3,06)	0,83 (0,16-4,34)	0,53 (0,07-3,95)	3,15 (0,54-20,03)	2,45 (0,46-13,88)
<b>Alcohol</b>	0,38 (0,06-2,17)	0,27 (0,04-1,56)	0,34 (0,06-1,86)	1,20 (0,23-6,33)	1,88 (0,25-13,79)	0,57 (0,10-3,06)	0,41 (0,07-2,19)
<b>Escolaridad</b>	0,45 (0,07-2,69)	1,54 (0,71-3,32)	4,81 (0,84-30,73)	1,92 (0,39-9,85)	2,81 (0,40-21,05)	0,38 (0,06-2,23)	0,43 (0,08-2,16)
<b>Tiempo</b>	0,58 (0,12-2,76)	0,90 (0,19-4,19)	0,33 (0,06-1,63)	0,70 (0,15-3,26)	0,63 (0,06-5,59)	1,16 (0,25-5,45)	1,11 (0,24-5,19)
<b>Residencia</b>							
<b>Uso de EPP</b>	0,62 (0,12-2,98)	0,56 (0,11-2,70)	1,33 (0,28-6,46)	2,92 (1,05-15,33)	5,20 (1,08-130,45)	1,21 (0,25-5,89)	1,10 (0,23-5,27)
<b>Antigüedad Laboral</b>	2,75 (0,53-15,06)	0,56 (0,11-2,70)	2,17 (0,45-10,89)	5,00 (1,06-29,11)	5,40 (1,01-121,30)	1,21 (0,25-5,89)	0,25 (0,04-1,29)

#### 4.5. Discusión de los resultados del Capítulo

Los métodos empleados en epidemiología molecular son similares a los empleados por otras áreas de la epidemiología en general. Por ende, el grupo control debe ser similar al grupo expuesto en parámetros tales como sexo, edad, hábito de fumar, consumo de alcohol, nutrición y estilo de vida. Del mismo modo que se realizó la evaluación de cultivos intensivos (Capítulo 3), se seleccionaron dos poblaciones, una expuesta laboralmente a agroquímicos y una población control, que no se encontraba expuesta en forma laboral a plaguicidas pero que pertenecía al mismo lugar geográfico, con condiciones socioculturales similares.

Al analizar las poblaciones de trabajadores y de controles es posible observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en el perfil de la muestra al comparar por edad ( $P=0,653$ ), hábitos de fumar ( $P=0,667$ ) y de consumir alcohol ( $P=0,875$ ). El 100% de los encuestados son de sexo masculino, ya que el trabajo con este tipo de productos, en los grupos reclutados de la provincia de Santa Fe, solo es realizado por varones.

Respecto al nivel de instrucción alcanzado, no se encontró ningún analfabeto en el grupo evaluado. El 75% había alcanzando instrucción mayor al primario, es decir secundario incompleto, completo y terciario o universitario, mientras que el 25 % de los entrevistados cumplimentó solo la enseñanza primaria. Los casos de nivel primario se encontraron entre los entrevistados de mayor edad ya que la mayoría terminaron sus estudios primarios en épocas donde no existían escuelas secundarias en su localidad. Los más jóvenes tenían los niveles mayores de educación e incluso algunos con la escuela secundaria, poseían el título de técnico agrónomo. El grado de instrucción recibido facilitó obtener respuestas en todos los ítems incluidos en la encuesta, fundamentalmente los relacionados con la actividad laboral.

Analizando los datos obtenidos de las encuestas laborales de los aplicadores, se observó una antigüedad laboral de  $11,33 \pm 9,78$  años. La jornada laboral en todos los casos fue mayor a 8 horas en los meses de intensa aplicación de pesticidas. Al consultar sobre sus inicios en la actividad, la mayoría señaló las oportunidades económicas que surgieron a fines de la década del 90 generadas por los cambios agrotécnicos. Muchos de los aplicadores comenzaron la actividad a temprana edad acompañando a sus padres como banderilleros, actividad que refieren no existe en el presente por la posibilidad de adquirir banderilleros satelitales que facilitan la labor.

A pesar que un 92 % conoce los productos que utiliza para las pulverizaciones y su clasificación de peligrosidad, ningún trabajador utilizó EPP de manera completa, y un 56 % no usó ningún tipo de protección. Considerando las buenas prácticas laborales exigidas en el manejo de pesticidas, si bien la totalidad de los aplicadores disponía de depósitos especiales para almacenar los agroquímicos, un alto porcentaje no tenían ningún tipo de equipo para manejar derrames o accidentes en el depósito.

El 71 % de los encuestados utilizaban equipos terrestres para pulverizar (mosquito o arrastre) y un 29 % lo hacía con avión. En esta encuesta también se incluyó como puntos a considerar otras tareas realizadas en contacto con los pesticidas además de pulverizar. La mayoría preparaba los pesticidas, y solo utilizaban EPP en esta labor en un 37,5 % de los casos. Además, también en altos porcentajes, los aplicadores son los encargados de transportar los pesticidas, lavar y reparar el equipo de pulverización (Figura 4.4).

Respecto a las condiciones a tener en cuenta para la aplicación de los productos, en la mayoría de los casos utilizaban para descansar el horario del mediodía cuando las temperaturas son más elevadas, pero refirieron que en momentos climáticos especiales, como por ejemplo luego de una temporada de lluvias, aplicaban los pesticidas en todo momento del día.

La provincia de Santa Fe (Argentina) dispone de la Ley de Productos Fitosanitarios N° 11273/97, donde se expresa que los agroquímicos se deben vender bajo receta agronómica y con el debido asesoramiento profesional, pero se verifica que la mayoría de los productores solicita la aplicación de los productos superando las dosis recomendadas y el número de aplicaciones por campaña. El 87 % de los pesticidas aplicados en el área se corresponde con productos categorizados según la OMS como extremadamente, altamente y moderadamente peligrosos (Tabla 4.2).

Por lo tanto, entre los determinantes de exposición es posible considerar en este estudio las vías probables de entrada (inhalatoria y dérmica), generadas por la ausencia de EPP adecuado y la duración acumulada de la exposición expresada en años de actividad laboral.

La medición de la actividad de BChE es recomendada como marcador de exposición en pulverizadores de pesticidas. A pesar de tratarse de una población con recursos económicos, acceso a centros de salud y conocimiento de los riegos, al no depender de empresas formales, sino en la mayoría de los casos, emprendimientos familiares que no cumplen las leyes de



riesgo de trabajo, no se pudo conseguir los datos basales pre-ocupacionales recomendados (OEHHA, 2002).

En el grupo de aplicadores de cultivos extensivos evaluado en este trabajo de Tesis, los niveles de actividad de BChE se encontraron inhibidos de manera estadísticamente significativa respecto a los controles ( $P < 0,05$ ; Tabla 4.4), similares resultados fueron encontrados por Panemangalore y col. (1999) en Kentucky, Estados Unidos, por Rastogi y col. (2008) en el norte de India, por Hofmann y col. (2009) en Washington, Estados Unidos, y por Kachaiyaphum y col. (2010) en Tailandia.

El biomarcador de acción biológica directa de la exposición a plaguicidas OFs utilizados más ampliamente en las poblaciones de trabajadores agrícolas ha sido el monitoreo de AChE (McCauley y col., 2006). El análisis de la inhibición de la actividad de AChE como biomarcador tiene sus ventajas y desventajas. La disminución en la actividad de esta colinesterasa se puede observar antes que los signos clínicos se manifiestan, lo que colabora con el reconocimiento temprano de individuos de alto riesgo (Wessels y col., 2003), pero son amplios los rangos de normalidad y las variaciones interindividuales (Carballo y col., 2011a). En este grupo evaluado de aplicadores de cultivos extensivos, la AChE mostró una disminución estadísticamente significativa en los trabajadores expuestos a pesticidas respecto a los controles ( $P < 0,05$ ; Tabla 4.4) en concordancia con estudios realizados en otros grupos de aplicadores expuestos a diferentes mezclas de plaguicidas en la India, en Irán y en España (Banerjee y col., 1999; Ranjar y col., 2002; Hernandez y col., 2005; Shadnia y col., 2005; Kesavachandran y col., 2006; López y col., 2007).

Las modificaciones en el estado oxidativo podrían ser un mecanismo importante del daño de los plaguicidas (Banerjee y col., 2001.; Halliwell, 2002). Diferentes clases de pesticidas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno y de daño oxidativo a nivel tisular, por lo tanto los marcadores de la respuesta celular al daño oxidativo son frecuentemente evaluados.

El grupo de aplicadores de plaguicidas de cultivos extensivos evaluado durante este trabajo de Tesis Doctoral, mostró incrementos estadísticamente significativos en la actividad de CAT respecto a los controles ( $P < 0,01$ ; Tabla 4.5), resultados que concuerdan con los hallados por Seth y col. (2000) y Shadnia y col. (2005) en humanos expuestos a pesticidas. Esto podría ser debido a que factores ambientales oxidativos inducen la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes, así como los niveles de las moléculas antioxidantes no enzimáticas (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009), aunque otros trabajos que analizaron los niveles de CAT

en humanos expuestos ocupacionalmente a mezclas pesticidas, mostraron disminuciones en su actividad (Lopez y col., 2007; Simoniello y col., 2010).

Diversos estudios disponibles indican que la actividad de las enzimas asociadas a mecanismos de defensa antioxidantes se altera en uno u otro sentido por la exposición a plaguicidas. Así, evaluaciones realizadas en glóbulos rojos humanos indican que la exposición *in vitro* a los OF pueden incrementar CAT y SOD utilizando fosafona o disminuirlas si se exponen a tricloroform, pero estas modificaciones llevan a que, en ambos casos la peroxidación de lípidos medida a través de los niveles de MDA se incremente (Altuntas y col., 2003, Catalgol y col., 2007). Por otro lado, trabajos realizados con herbicidas (Glifosato y 3-DMAP) reportaron aumentos de CAT en glóbulos rojos humanos (Pieniazek y col., 2004; Bukowska y col., 2007). Estudios realizados en ratas con piretroides, cipermetrina, permetrina, deltametrina, muestran incrementos de CAT (Kale y col., 1999; Nasuti y col., 2003; Rehman y col., 2006) mientras que ciflutrin, otro piretroide, generó la disminución de CAT (Eraslan y col., 2007). Lambdacialotrina, también un piretroide, utilizado *in vitro* en glóbulos rojos de conejo, mostró disminución de las enzimas antioxidantes CAT y SOD e incremento de TBARS (El-Demerdash, 2007). Endosulfan utilizado *in vivo* en animales de experimentación generó incrementos de SOD, CAT y MDA (Kalender y col., 2004). Clorpirifos, produjo disminución de SOD y CAT *in vivo* y aumentos en la lipoperoxidación (Mansour y Mossa, 2009), mientras que malatión generó el incremento de SOD, CAT y MDA en una exposición *in vivo* en ratas (Akhgari, 2003).

Los antioxidantes que pertenecen a la segunda línea de defensa incluyen el glutatión (GSH), la vitamina C, vitamina E (alfa-tocoferol, principalmente) y beta-caroteno (Irshad y Chaudhuri, 2002; Edge y Truscott, 1997). Los residuos cisteinil de GSH ofrecen un grupo tiol nucleofílico que es importante en la detoxificación de metabolitos electrofílicos y de agentes oxidantes producidos metabólicamente, siendo sustrato de las enzimas Glutatión peroxidasa y Glutatión-S-transferasa. GSSG es reducido de nuevo a GSH por una reacción dependiente de NADPH; por lo tanto, la relación GSH/GSSG es un indicador muy importante del estado redox de la célula (Rana y col., 2002; Verma y col., 2007).

En el grupo de aplicadores expuestos a mezclas de plaguicidas se evaluó la relación GSH/GSSG, observándose una disminución estadísticamente significativa con respecto a los controles ( $P < 0,01$ ; Tabla 4.5) debido a una disminución de los niveles de GSH y un aumento de los niveles de GSSG. La relación GSH/GSSG fue evaluada en otros trabajos *in vivo* con

animales de experimentación expuestos a plaguicidas (Venturino y col., 2001 y Verma y col., 2007) coincidiendo en su disminución con nuestros resultados, como también en otros estudios en humanos en los cuales las patologías evaluadas (Yeh y col., 2005; Machado y col., 2008) o las exposiciones laborales (Erben y col., 2010) generaron modificaciones en el balance oxidativo y fueron determinadas por una disminución de la relación GSH/GSSG.

En otros biomonitoreos de humanos expuestos a pesticidas, disponibles al momento de esta discusión, solo se evaluó GSH, obteniéndose disminución en sus niveles (Banerjee y col., 1999; Seth y col., 2000; Prakasam y col., 2001; Ranjbar y col., 2002; Rastogi y col., 2009) coincidiendo con evaluaciones realizadas *in vitro* en líneas celulares humanas, donde se observó una disminución de los niveles de GSH utilizando un DTC en la evaluación (Cereser y col., 2001), un OF (Catalgol y col., 2007) o una piretrina (El-Demerdash, 2007), sin embargo no se observaron cambios significativos en los niveles de GSH cuando se evaluó glifosato (Pieniazek y col., 2004). En estudios *in vivo* en animales, también se observó una disminución en los niveles de GSH en evaluaciones que incluyeron piretroides (Grajeda y Cota, 2004; Rehman y col., 2006), OFs (Venturino y col., 2001; Sivapiriya y col., 2006; Verma y col., 2007; Suke y col., 2008), carbamatos (Seth y col., 2001) y reguladores del crecimiento (Tuluze y Celik, 2006).

Puesto que los eritrocitos contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, de oxígeno molecular, de iones ferrosos en el estado ligado, y como contraparte, contienen enzimas y moléculas antioxidantes, GSH, CAT, SOD y GSH-Px, es de fundamental importancia la investigación de la toxicidad de diferentes compuestos a través de la peroxidación de lípidos.

Los resultados del presente estudio mostraron un aumento estadísticamente significativo en la formación de TBARS en el grupo de aplicadores expuestos a mezclas de pesticidas respecto a los controles ( $P < 0,01$ ; Tabla 4.5). La elevada actividad de la CAT determinada en este grupo evaluado podría deberse a una respuesta adaptativa generada por la presencia de los radicales libres, donde la peroxidación lipídica indicaría el fracaso de los mecanismos de defensa antioxidante para proteger los tejidos de los daños mecánicos causados por los plaguicidas (Akhgari, 2003). Resultados similares fueron hallados en otros estudios de trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas (Seth y col., 2000; Prakasam y col., 2001; Ranjbar y col., 2002; Kesavachandran y col., 2006; Singh y col., 2007; Muñiz y col., 2008; Kisby y col., 2009; Rastogi y col., 2009). Además, varias investigaciones han analizado la acción de

diferentes OF sobre la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos *in vitro* como también en animales de experimentación *in vivo* (Datta y col., 1992; Gultekin y col., 2000; Altuntas y col., 2003; Altuntas y col., 2004, Rehman y col., 2006; Catalgol y col., 2007; Mansour y Mossa, 2009; Suke y col., 2008), y otras muchas investigaciones sobre diferentes clases de plaguicidas (Aliciguzel y col., 2001; Cereser eta l, 2001; Bukowska, 2003; Bukowska, 2004b; Pieniazek y col., 2004; Kalender y col., 2004; Tuluze y Celik, 2006; Eraslan y col., 2007), encontrando en todos los estudios incrementos en la producción de peroxidación de lípidos.

El EC alcalino puede detectar daños en el ADN en las células eucariotas tratados *in vitro* o *in vivo* con agentes genotóxicos. La versión alcalina (pH>13), es capaz de detectar daños en el ADN midiendo las roturas del ADN de cadena simple, los sitios álcali-lábiles, los sitios de reparación y los enlaces cruzados (cross-link) en las células individuales. Por su facilidad de aplicación, el EC ha sido cada vez más utilizados en estudios de vigilancia en humanos (Valverde y Rojas, 2008). La mayoría de las investigaciones que emplean el EC en la vigilancia de humanos expuestos ocupacionalmente, lo han utilizado como un biomarcador tanto de exposición como de efecto, e incluso conjuntamente con otros biomarcadores de efecto temprano (por ejemplo, CA y MN). El uso de este ensayo para evaluaciones de riesgo está basado en la versatilidad de la prueba en la detección de diferentes tipos de daño al ADN incluyendo los presentes en las primeras etapas de la carcinogénesis y la capacidad de relacionar los resultados del EC con los resultados de otros marcadores biológicos. (Valverde y Rojas, 2009).

Nuestros hallazgos utilizando el EC muestran incrementos estadísticamente significativos en los valores de IDEC en los expuestos de 1,4 veces respecto a los controles (Tabla 4.6). Estos resultados concuerdan con otros trabajos que han analizado a aplicadores expuestos a mezclas utilizado el EC, en los que las condiciones laborales son determinantes de la exposición. Así en la literatura se encuentran distintos reportes donde se observan incrementos en los valores de EC que van desde 1,2 a 1,7 (Lebailly y col, 1998, a,b; Liu y col.,2006; Paz y Miño, 2007;) hasta 2 (Bhalli y col., 2009), 5 (Da Silva y col., 2008) y 7 veces (Remor y col., 2009) en el Índice de Daño del EC, con respecto a los grupos control. Sin embargo, también se han hallado resultados negativos al utilizar este ensayo en trabajadores rurales de Grecia, de España y de Polonia (Piperakis y col., 2003, 2006 y 2009).

En el presente trabajo de Tesis, se evaluó también la influencia de los mecanismos de reparación puestos en juego para inhibir el daño generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ADN de los

linfocitos *in vitro* utilizando también el EC. Se encontró un incremento de IDER de 1,5 veces en los aplicadores de pesticidas frente a los controles ( $P < 0,01$ ), pero cuando se analizó el daño al ADN antes y después del proceso de reparación, IDEC vs. IDER tanto para el grupo expuesto como el control, la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de los dos grupos luego de 30 minutos de reparación (Tabla 4.6).

Piperakis y col. (2003, 2006) observaron que la eficacia de la reparación era similar en los grupos estudiados luego de 2 horas de reparación, coincidiendo con nuestros hallazgos, mientras que en otro grupo evaluado en Polonia (Piperakis y col., 2009), obtienen una disminución del daño generado *in vitro* luego del mismo período de 2 horas de incubación. En un trabajo anterior de nuestro grupo, en trabajadores frutihortícolas (Simoniello y col., 2008) donde también analizamos este parámetro, el incremento de IDER en los aplicadores fue de 1,9 veces respecto a los controles, pero al analizar IDER vs IDEC tampoco hallamos diferencias estadísticamente significativas en 30 minutos de reparación. Estos hallazgos permitirían inferir que los mecanismos de reparación del daño oxidativo puestos en juego a través de la presencia de las defensas antioxidantes, controlan el ingreso del daño a la célula y generan, en un medio adecuado, la posterior reparación del ADN celular teniendo la capacidad de eliminar el daño generado *in vitro* y así mantener un estado de equilibrio dinámico.

Como un indicador del estado redox general del organismo, las bases oxidadas del ADN pueden proporcionar un marcador útil en estudios donde se ha demostrado perturbaciones a nivel oxidativo y mecanismos de genotoxicidad puestos en juego. La combinación de enzimas con un método que detecta roturas de ADN, como es el EC, proporciona un enfoque alternativo (Dusinska y Collins, 2008). La base del EC fue modificada para la detección de lesiones específicas, digiriendo con enzimas la lesión de los nucleoides. En el presente estudio se utilizó FPG. Esta modificación aumenta enormemente el alcance de la prueba, ya que determinados tipos de daño en el ADN se relacionan con diferentes exposiciones ambientales y podrían estar relacionados con diferentes factores fisiológicos.

En este trabajo de Tesis se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en los sitios FPG de los aplicadores de pesticidas respecto a los controles ( $P < 0,01$ ; Tabla 4.6). Esta modificación del EC se ha aplicado en el trabajo de Muñiz y col. (2008), un biomonitoreo de aplicadores realizado en Estados Unidos. El plaguicida más utilizado en ese grupo de trabajadores, metilazinfos (AZM), fue aplicado en linfocitos humanos *in vitro*, obteniendo diferencias estadísticamente significativas y demostrando que, una cantidad significativa de daños del

ADN inducidos por AZM podrían ser debido al estrés oxidativo. En el trabajo de Gabbianelli y col. (2009), también se utilizó FPG para evaluar las modificaciones en las purinas oxidadas en linfocitos de ratas expuestas *in vivo* a permetrina observándose incrementos en el daño al ADN lo que permitió a los autores concluir que los resultados podrían indicar el papel clave de la permetrina en el estrés oxidativo, cuyas consecuencias podrían conducir a cambios bioquímicos.

Evaluando la información disponible de biomonitoreos ocupacionales que utilizaron FPG en trabajadores expuestos se encontró que para exposición al amianto, los niveles de bases oxidadas fueron elevados en comparación con los de los controles y además obtuvieron una fuerte correlación entre las lesiones y los años de exposición ocupacional (Dusinska y col., 2004). En contraste, la exposición ocupacional a fibra mineral y al estireno no se asoció con un aumento de daño oxidativo del ADN (Dusinska y col., 2004; Vodicka y col., 2004; Staruchova y col., 2008), pero hasta el momento, en la literatura disponible, no se ha utilizado esta modificación para evaluar trabajadores expuestos a mezclas de plaguicidas.

El EC tiene un alcance de detección que está limitada por la organización estructural del ADN ya que éste se encuentra saturado cuando todos los bucles se relajan (alcanzado en el nivel de alrededor de tres rupturas de la hebra por cada 109 Da o sea unos pocos miles por célula). Sin embargo, estos límites de detección cubren convenientemente el rango de daños encontrados en células humanas, y la prueba es, por lo tanto, muy apropiada para aplicaciones en epidemiología molecular. Su precisión no es tan grande como la de los métodos cromatográficos que miden 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-Gua) como metabolito de oxidación de ADN, pero parece ser mucho más precisos en la estimación de los niveles bajos de daño (Collins y col., 2009). En los estudios de población, la precisión no es tan importante siempre y cuando el número muestral sea lo suficientemente grande como para detectar diferencias entre medias (o medianas) de los grupos o los efectos de los factores dentro del grupo (Collins y col., 2009).

Otro biomarcador de genotoxicidad seleccionado para esta evaluación fue MNBC. En los seres humanos, los MNs puede ser fácilmente evaluados en eritrocitos, linfocitos y células exfoliadas epiteliales (por ejemplo, oral, urotelial, nasal) para obtener una medida del daño inducido en el genoma *in vivo*. El ensayo de MN, se puede realizar en células de descamación bucal o procedentes de otros tejidos epiteliales que se dividen rápidamente, sin la necesidad de una división nuclear *ex vivo*, de modo que los cultivos de células no son necesarios (Holland y col., 2008).

Las células bucales son la primera barrera de la vía de inhalación o ingestión y son capaces de metabolizar sustancias cancerígenas. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos se originan de las células epiteliales. Por lo tanto, se podría argumentar que las células epiteliales orales representan un sitio de destino preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al cuerpo por inhalación o ingestión (Holland y col., 2008).

En el presente trabajo de Tesis, se evaluó la frecuencia de MNMB en los aplicadores de plaguicidas en cultivos de grandes extensiones, observándose un incremento estadísticamente significativo respecto a los controles ( $P < 0,01$ ; Tabla 4.6). En la literatura este biomarcador presenta resultados contradictorios. Así, una serie de estudios llevados a cabo con trabajadores agrícolas procedentes de cuatro países europeos (España, Polonia, Grecia y Hungría) utilizando MNMB, no demostraron aumentos en su frecuencia que se relacione con la exposición a plaguicidas en ninguno de los grupos poblacionales, como tampoco en estudios realizados en Costa Rica (Castro y col., 2004) y en Brasil (Remor y col., 2009). Se ha planteado que la falta de efecto detectado a través de MNMB podría atribuirse a prevalencia de la exposición por vía cutánea sobre la oral e inhalatoria y a la genotoxicidad relativamente menor de la mayoría de los pesticidas modernos (Holland y col., 2008).

Sin embargo, otros estudios informaron aumentos significativos de MN en las células bucales de los trabajadores expuestos a los pesticidas (Gomez-Arroyo y col., 2000; Sailaja y col., 2006; Ergene y col., 2007; Bortoli y col., 2009; Martinez-Valenzuela y col., 2009).

Los monitoreos que utilizan métodos citogenéticos en personas expuestas a pesticidas que son muy variados, en números de muestras, tipos de cultivos, país, prácticas laborales y por supuesto mezclas de pesticidas utilizadas. Evaluaciones con marcadores de genotoxicidad en trabajadores expuestos a mezclas de pesticidas fueron realizadas en Europa (Lebailly y col., 1998, a,b; Bonassi y col., 1999; Lucero y col., 2000; Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2000, 2001; Hogenkamb y col., 2004; Bolognesi y col., 2003, 2004; Bouvier y col., 2006; Costa y col., 2006; Lopez y col., 2007; Piperakis y col., 2003, 2006, 2009), en Asia (Grover y col., 2003; Shadnia y col., 2005; Liu y col., 2006, Sailaja y col., 2006; Bhalli y col., 2006, 2009), en Norte América (Titenko-Holland y col., 1997; Muñoz y col., 2008), y en America Latina (Gomez-Arroyo y col., 2000; Palacios-Nava y col., 2003; Varona y col., 2003; Castro y col., 2004; Cuenca y Ramirez, 2004; Ascarrunz y col., 2006; Castillo-Cadena y col., 2006; Hoyos y col., 1996; Da Silva y col., 2008; Paz y Miño y col., 2002, 2004, 2007; Jors y col., 2007; Remor y col., 2009; Bolognesi y col., 2009; Simoniello y col., 2008, 2010) lo que muestra el continuo y

creciente interés por esta problemática. Latinoamérica debido al extenso uso de mezclas de pesticidas en sus variados cultivos, liderado las investigaciones, con una necesidad creciente de llegar a conclusiones que relacionen estos marcadores de genotoxicidad con los diferentes tipos de cultivos, con las prácticas laborales muchas veces inadecuadas y por ende generar medidas de vigilancia.

En las Tablas 4.7 y 4.8 se analiza la influencia de los factores de confusión sobre BChE, AChE, CAT, TBARS, GSH/GSSG, IDEC, IDER, Sitios FPG y MNMB en los aplicadores de plaguicidas de cultivos extensivos.

Al considerar la edad, solo para el biomarcador CAT se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los aplicadores mayores de 30 años. Esto podría deberse a que los efectos nocivos producidos por los radicales libres de manera azarosa durante el metabolismo aeróbico, pueden causar daños acumulativos en el tiempo (Valko y col., 2007) o bien, por la tasa de acumulación de plaguicidas persistentes, que actualmente no se encuentran en el mercado pero se ha planteado su permanencia en personas mayores (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

El hábito de fumar produjo modificaciones en los valores de MNMB en estos trabajadores como también en otros estudios donde se han reportado un incremento significativo de MNMB en trabajadores expuestos a pesticidas que además fumaban (Pastor y col., 2002), como también un incremento significativo de ICH (Padmavathi y col., 2000), aunque el consumo de alcohol de manera habitual, también generó modificaciones en MNMB. En varios estudios donde se analizaron como factores los estilos de vida sobre la frecuencia de MNMB, fue difícil distinguir el efecto del alcohol del de fumar. Por ejemplo, ni el consumo frecuente de alcohol o el hábito de fumar por sí solo, aumentan la frecuencia de MN en las células bucales, pero un efecto sinérgico del tabaquismo y el alcohol fue evidente en el trabajo de Stich y col. (1983), donde se observó un incremento de hasta 5,5 veces respecto de los controles en un estudio prospectivo donde se comparaban alcohólicos con carcinoma oral o en orofaringe con sujetos sanos que no consumieron nada de alcohol, encontraron una asociación significativa entre la frecuencia de MNMB y la edad del inicio y de cese del consumo de alcohol así como con la duración del consumo (Martínez y col., 2002). Esta interacción sinérgica aparente del consumo de alcohol y de tabaco, y la contribución relativa de cada exposición evaluada, es otro aspecto de la vigilancia de células bucales que requiere más estudio (Holland y col., 2008).



Al analizar la antigüedad laboral, lo que se intenta es investigar la posible relación entre el tiempo de exposición y su influencia sobre cada uno de los biomarcadores propuestos. En algunas investigaciones, la duración del empleo fue utilizado como un estimador de exposición en estudios en los que no fue factible analizar la evaluación cuantitativa de la exposición (Bolognesi, 2003). En el presente trabajo de Tesis, el factor antigüedad (> 10 años) modificó los resultados de AChE, de IDER y de Sitios FPG. Se postula entonces, una interacción entre la inhibición de la AChE y la acumulación de radicales libres que conduce a cambios en las macromoléculas (Yang y col., 1996, Akhgari, 2003). A pesar de la presencia del sistema de defensa antioxidante para contrarrestar el daño oxidativo de los radicales libres, este daño se acumula durante todo el ciclo de vida y sus efectos ocurren sobre el ADN, las proteínas y los lípidos (Alavanja y col., 2004). Esto podría explicar que, cuando el tiempo de exposición se incrementa, se generarían deficiencias en los procesos de reparación del ADN, provocando también la oxidación de sus bases. Se ha propuesto que el daño oxidativo con el transcurso del tiempo, podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad como el cáncer, la arteriosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Valko y col., 2007) que también se han asociado con la toxicidad crónica de los pesticidas.

El uso de EPP fue determinante en los resultados de AChE, Sitios FPG y MNMB, donde se comprueba que la genotoxicidad positiva observada en los trabajadores expuestos de este estudio puede deberse a la falta de medidas de protección adecuada. Bull y col. (2006) en su revisión evaluaron la genotoxicidad en humanos expuestos a pesticidas, destacando la importancia del uso de EPP. En cuatro estudios en los que la mayoría de los trabajadores habían utilizado medidas de protección (> 60%), no se obtuvieron incrementos en los resultados de AC, ICH ni MN en los expuestos respecto a los controles. Por el contrario, siete de ocho estudios evaluados donde el uso de EPP estuvo reducido o ausente, se notificaron considerables aumentos de daño citogenético. Las modificaciones en los marcadores AChE, sitios FPG y MNMB utilizando EPP como factor pueden ser debidas a que ningún trabajador utilizaba el equipo completo y un alto porcentaje utilizaba EPP de manera inadecuada.

En consecuencia, evaluar en este estudio particularmente la calidad de las medidas de protección, podría brindar información que permita implementar cambios en las conductas laborales de nuestra región, ya que se ha informado que los trabajadores que lograron disminuir sus niveles de exposición por lo menos por seis meses y que además utilizaron las

medidas de protección adecuadas tuvieron una importante reducción en sus marcadores de genotoxicidad (Carbonell y col., 1995).

Otro importante determinante de exposición en los aplicadores de plaguicidas son las múltiples mezclas utilizadas. Las exposiciones múltiples son una regla y no una excepción en la práctica agrícola. La gran cantidad de plaguicidas aplicados en forma de mezclas de agroquímicos incluyen un importante número de compuestos genotóxicos (Bolognesi, 2003). En los estudios toxicológicos, el principal desafío ha sido desarrollar métodos para predecir la toxicidad resultante de la exposición combinada a un gran número de productos químicos presentes en diversos ambientes, desde el aire, el agua, los alimentos, los medicamentos y también otros productos de consumo. Estos formidables desafíos (para biólogos, químicos, estadísticos) presentan obstáculos importantes para evaluar los riesgos de exposición a las mezclas (Borgert y col., 2004). Muchos efectos son más complejos que la simple unión a un receptor o una enzima y pueden generar una combinación que altera la expresión génica, que produce cambios en los niveles de las concentraciones intracelulares de los iones, en los reguladores celulares y altera el metabolismo celular.

En estas circunstancias, el efecto de las mezclas es más difícil de predecir. En realidad, pocos productos químicos tienen un objetivo celular único. La mayoría actúa en múltiples sitios, en diferentes tipos de células o en algunos casos, incluso con múltiples objetivos en el mismo tipo de célula. Las acciones en cada uno de estos sitios dependen de la presencia de genes, de receptores y de reguladores celulares en los tipos de células específicas (Carpenter y col., 2002).

En este trabajo de Tesis Doctoral, se tuvieron en cuenta las mezclas que los aplicadores utilizaron en la última semana, el lugar donde desarrollaron sus actividades los aplicadores y el número de trabajadores expuestos a cada mezcla (Tabla 4.3). Así, para el análisis se consideraron los datos obtenidos para todos los biomarcadores planteados utilizando la mezcla a la que estuvieron expuestos como factor (Tabla 4.9).

En AChE se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ; Test de K-W). La mayor inhibición enzimática se halló para la Mezcla 3 (metamidofos; 2,4D; glifosato). En esta mezcla en particular, el único compuesto que ha sido descrito con la capacidad de inhibir la enzima es metamidofos. En diversos trabajos, ha sido evaluado como un importante inhibidor específico de AChE (Jong y col., 1982; Singh y col., 1986).

Las variaciones marginalmente significativas para Sitios FPG ( $P = 0,05$ ) y estadísticamente significativas para TBARS ( $P = 0,028$ ) se obtuvieron al utilizar las mezclas como factor y se

observaron los valores más elevados para la mezcla 5 en ambos casos (metamidofos; clorpirifos; dimetoato; cipermetrina; glifosato; paraquat; 2,4D; picloran; pirimicard; glifosatotrimesium; monocrotofos). Considerando los productos químicos incluidos en esta mezcla es importante señalar que algunos de ellos han sido prohibidos en varios países debido a su alta toxicidad. Este es el caso, por ejemplo, de monocrotofos y metamidofos (Finkelman, 1994; Arevila y col., 1997), mientras que en los países en desarrollo, el proceso de prohibición es limitado (Repetto y Baliga, 1996).

Coincidiendo con los resultados hallados para los trabajadores de cultivos intensivos, los aplicadores que estuvieron expuestos a las mezclas más complejas, donde se encuentran presentes múltiples productos, con distintos principios activos, con distintos blancos biológicos y en proporciones desconocidas, podrían verse más afectados que los expuestos a mezclas menos complejas.

Un trabajo epidemiológico (n=629) realizado en la provincia de Córdoba (Lanteri y col., 2009), con características semejantes en la agricultura de cultivos extensivos a la provincia de Santa Fe, informó que la exposición a mezclas complejas de plaguicidas es importante. Establecieron además como factores de riesgo la falta de protección del aplicador, no utilizar la tecnología más segura (cabina equipada con filtro de carbón activado) y no tener indicación escrita por el ingeniero agrónomo de la dosis de aplicación, resultados que coinciden con los del presente trabajo de Tesis.

Como valioso complemento a la epidemiología convencional, los biomarcadores pueden proporcionar información útil sobre los mecanismos moleculares implicados en la exposición ambiental y ocupacional. Para investigar la asociación entre la exposición y los marcadores seleccionados, se utilizó el test de correlación de Spearman (Tabla 4.10). En cada grupo de biomarcadores, enzimas colinesterasas, daño oxidativo y daño genotóxico, se observó que cada biomarcador correlacionó con los de su grupo, mostrando la robustez analítica de los métodos empleados.

Cuando se analizan las correlaciones de las enzimas colinesterasas, se observa una asociación negativa con CAT, TBARS y GSH/GSSG, que coincide con las correlaciones halladas en trabajadores de cultivos intensivos. Se ha planteado que la inhibición de la AChE inicia la acumulación de radicales libres que conduce a incrementos en TBARS (Yang y col., 1996, Akhgari, 2003) y por el contrario, que los plaguicidas que no son OF, también puede disminuir la actividad de AChE ya que la peroxidación lipídica inducida por ellos puede afectar las

enzimas de membrana, como AChE (Hernandez y col., 2005; Banerjee y col., 1999). Aunque aún no está definido cuál es la causa y cuál el efecto, la correlación entre TBARS y la actividad de AChE en el presente trabajo de Tesis, está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Ranjbar y col., 2002, Akhgari, 2003, Singh y col., 2007, Simoniello y col., 2010). AChE mostró también correlación con IDEC e IDER lo que podría explicar que el daño genotóxico observado en los linfocitos tiene relación con la exposición a pesticidas. Las modificaciones a nivel de daño al ADN de los linfocitos también estarían relacionadas con la presencia de modificaciones a nivel redox celular (GSH/GSSG) y con el daño que podría ser generado por los plaguicidas sobre otros blancos biológicos como los lípidos (TBARS). En particular, el daño oxidativo generado al ADN de los linfocitos de los aplicadores (Sitios FPG) se correlacionó con el marcador de redox del medio interno de los eritrocitos y también con el daño clastogénico o aneugénico que presentaron las células de mucosa bucal. A su vez, el daño observado en estas células epiteliales también correlacionó positivamente con los tres marcadores de daño oxidativo en los eritrocitos e inclusive con el marcador de oxidación del ADN de los linfocitos. Sobre la base de estos resultados se inferiría que existe una estrecha relación entre exposición a mezclas de plaguicidas, daño oxidativo y daño genotóxico.

Al evaluar las variables cualitativas y cuantitativas en forma conjunta a través de la matriz de similaridad (Tabla 4.11), es posible deducir que los valores alterados en los biomarcadores seleccionados tienen una estrecha relación con determinadas características socio-demográficas (mayor edad, estudios secundarios incompletos y una prolongada residencia en la zona), con hábitos de los trabajadores (fumar y de consumir alcohol), y con determinadas prácticas laborales (el no uso del EPP, la antigüedad laboral y las pulverizaciones aéreas).

Cuando se analizan los Odds Ratio (Tabla 4.12) como una forma de expresar la proporción de veces que un suceso ocurra frente a que no ocurra, es posible observar que para todos los biomarcadores seleccionados, la proporción de veces que estarán alterados en los expuestos (aplicadores de cultivos extensivos) será entre 3 y 16 veces más respecto a los controles. El valor más elevado hallado es para Sitios FPG, lo que indica que hay 17 veces más probabilidad que este marcador esté alterado, frente a que no lo esté, y esto depende de la condición de ser aplicador o no. Si solo se analizan las probabilidades para el grupo de trabajadores, es posible predecir que la probabilidad de que se incrementen los resultados de Sitios FPG y de MNMB en los aplicadores estaría en relación con las medidas de protección utilizadas y la antigüedad laboral, condiciones ya ampliamente discutidas.

### *Conclusiones parciales*

Consideramos que este capítulo del trabajo de Tesis contribuye a la evaluación del daño potencial generado en los aplicadores por la exposición a las mezclas de agroquímicos utilizadas en los cultivos extensivos de la provincia de Santa Fe, Argentina.

Estos resultados demuestran que las alteraciones del sistema de defensa antioxidante, la peroxidación lipídica y el balance redox observadas en los aplicadores de cultivos extensivos se correlacionan con el daño del ADN en los linfocitos y en las células bucales. El tamaño de la muestra analizada aunque limitada, es representativo y las alteraciones halladas en este estudio podrían ser vinculados a posibles efectos adversos en la salud derivados de la toxicidad crónica de mezclas de plaguicidas.

## **CAPÍTULO 5**

### **Discusión y Consideraciones Finales**

### 5.1. Discusión general y consideraciones finales

La exposición a plaguicidas es uno de los riesgos laborales más importantes en los países en desarrollo (Coronado y col., 2004). Se ha prestado especial interés a la exposición ocupacional a los pesticidas con el fin de identificar los peligros que implica el uso de plaguicidas, poder establecer métodos seguros para su manipulación y establecer medidas de vigilancia sanitaria.

La exposición a plaguicidas en el ámbito rural tiene como patrón general el uso simultáneo de mezclas complejas, lo cual hace difícil determinar las consecuencias debido a posibles y/o desconocidos efectos sinérgicos o antagónicos. Si bien se dispone de información sobre la genotoxicidad de los plaguicidas utilizados, hay insuficientes datos sobre los efectos genotóxicos de las mezclas complejas. Las mezclas de plaguicidas no solo implican el uso regular de un gran número de principios activos diferentes, sino también de otras sustancias químicas, por ejemplo los coadyuvantes, que pueden variar su toxicidad potencial. Las evaluaciones realizadas para cada producto previo a su comercialización proporcionan la seguridad de que sin umbral, no se comercializaran genotoxinas ADN-reactivas. Estas estrategias de prueba utilizadas son generalmente consideradas como altamente eficientes en la identificación de mutágenos *in vivo* (Ashby y col., 1996). Sin embargo, siempre hay cierta incertidumbre en la extrapolación de las pruebas de toxicidad para la población humana expuesta. Por lo tanto, serían de enorme valor estudios adecuadamente diseñados de seguimiento posventa, para la evaluación continua de los riesgos de exposición a los pesticidas (Bull y col., 2006).

La exposición ocupacional a las mezclas de plaguicidas ha sido asociada con un aumento de estrés oxidativo y daño genotóxico (Simoniello y col., 2008, 2010). El daño inducido por los plaguicidas dependería del grado de exposición: los resultados francamente positivos se registraron en las poblaciones con altos niveles de exposición, fundamentalmente en trabajadores que descuidan las medidas de seguridad durante la temporada de pulverización (Bolognesi y col., 2011) y además, la exposición crónica a bajas dosis de mezclas complejas de plaguicidas provocaría efectos acumulativos como hemos comprobado en este trabajo de Tesis.

En general, los estudios de biomonitorio de poblaciones expuestas a plaguicidas son bastante específicos, ya que las diferentes poblaciones tienen distintos estilos de vida, hábitos alimentarios, condiciones climáticas y ambientales y están expuestos a diferentes mezclas de plaguicidas. Esto también podría explicar por qué algunos estudios han encontrado un

aumento de daño genético en poblaciones expuestas a pesticidas, mientras que en otros los resultados fueron negativos, aunque el nivel de exposición pueda ser considerado como significativo (Grover y col., 2003).

El mal uso de los agroquímicos en los diversos sectores de la agricultura a menudo ha sido asociado en todo el mundo, con problemas de salud y contaminación ambiental (Soares y col., 2003; Mancini y col., 2005; Remor y col., 2009) en especial en los países en desarrollo donde además se observa un frágil o hasta totalmente ausente marco regulatorio en el uso de plaguicidas, que podría constituir una de las principales razones de la elevada incidencia de intoxicaciones por estos compuestos en estos países (Konradsen y col., 2003). La provincia de Santa Fe (Argentina) dispone de la Ley de Productos Fitosanitarios N° 11273/97 que regula la elaboración, formulación, transporte, almacenamiento, distribución, fraccionamiento, expendio, aplicación y destrucción de envases de productos fitosanitarios. Sin embargo, el cumplimiento de la misma por parte de los actores involucrados (proveedores, productores y control de policía de Estado) es sumamente débil: se expenden los productos sin la receta agronómica adecuada, se aplican sin supervisión profesional y no se toman en cuenta las medidas protectivas necesarias (Poletta y col., 2010).

En referencia a la ausencia de EPP, Guivant (1994) señala: *“El escape colectivo a las referencias al peligro y a los accidentes es una de las razones por las cuales los agricultores rechazan las recomendaciones sobre las medidas de seguridad. Seguir tales cuidados podría implicar un reconocimiento del peligro que se pretende neutralizar”*. Otras importantes prácticas laborales tampoco son consideradas por los aplicadores: las condiciones climáticas (como por ejemplo temperatura y vientos en el momento de pulverizar), los cuidados al momento del lavado de los equipos y la disposición de los envases, que permanecen durante largos periodos en el campo sin tratamiento alguno.

En algunos sectores productivos, principalmente en los cultivos hortícolas, se han podido observar como determinantes de exposición: bajos niveles de educación de la población rural, falta de información de los peligros que ocasiona su manejo y tecnologías de pulverización inadecuada, como por ejemplo el uso de equipos de fumigación defectuosos. Debe considerarse que la formación en prácticas de seguridad en el manejo de los pesticidas y la inadecuada protección personal durante la pulverización de los agroquímicos es un patrón de comportamiento generalizado en todo tipo de cultivo y de condiciones socio-culturales en



nuestra provincia, como también en otras regiones del país en las que se han evaluado las prácticas laborales de los trabajadores rurales (Lanteri y col., 2009). Esto desempeñaría sin lugar a dudas, un papel trascendental en el escenario de la exposición crónica de los trabajadores rurales. En consecuencia, hay una urgente necesidad de transferir conocimientos a las personas que trabajan con los pesticidas sobre los riesgos potenciales de la exposición y la importancia de utilizar medidas de protección.

Las creencias erróneas de los agricultores acerca de la toxicidad de los plaguicidas, la falta de atención a las precauciones de seguridad, los riesgos que se generan en el ambiente, la información sobre primeros auxilios, el uso de equipos de fumigación defectuosa o la falta de mantenimiento adecuado de los equipos de pulverización, y la falta del equipo de protección adecuado durante la manipulación de plaguicidas también ha sido planteado por otros autores (Hurtado y col., 2003; Damalas y col., 2006a, 2006b; Ajayi y Akinnifesi, 2008; Chalermphol y Shivakoti, 2009; Plianbangchang y col., 2009; Sosan y Akingbohunge, 2009).

Teniendo en cuenta los daños a nivel oxidativo y en el material genético que han sido observados en la exposición crónica a plaguicidas (Bull y col., 2006; Limon-Pacheco y Gonsebatt, 2009; Bolognesi y col., 2011), a la latencia de los efectos adversos y la supuesta falta de conciencia de estos efectos por parte de algunos agricultores, se hace imperativo implementar programas que permitan la comunicación clara de los potenciales peligros del uso de plaguicidas. Diversas investigaciones han subrayado a menudo la necesidad de aumentar la conciencia de los agricultores sobre las consecuencias del uso de plaguicidas peligrosos y la importancia de los programas de comunicación y educación con el objetivo de reducir el riesgo (Ibitayo, 2006; Hashemi y col., 2008; Sosan y Akingbohunge, 2009; Damalas y Hashemi, 2010).

El primer paso en el desarrollo de programas sobre la reducción del peligro de los plaguicidas es identificar el grado del problema, mediante la investigación de los conocimientos de los agricultores, actitudes y percepciones sobre prácticas de seguridad y manejo de plaguicidas.

## 5.2. Perspectivas Futuras

Los daños genotóxicos de los compuestos químicos podrían estar influenciados por la herencia de los genes individuales, así como por las variantes polimórficas que participan en el metabolismo de compuestos químicos y en los mecanismos de reparación del ADN.

Aunque los datos disponibles sobre las poblaciones de los agricultores indican que las personas con alelos desfavorables en los genes metabólicos son más susceptibles a los efectos genotóxicos que aquellos con alelos favorables, no hay resultados concluyentes sobre si estos polimorfismos metabólicos afectan al daño cromosómico inducido por los plaguicidas (Bolognesi y col., 2011). Son necesarios estudios para caracterizar genéticamente a la población de individuos expuestos a plaguicidas en nuestro país respecto a polimorfismos de las enzimas metabólicas, tal como lo demuestran los primeros avances en este sentido que se han realizado en nuestro grupo de trabajo (Porcel de Peralta y col., 2010; Carballo y col., 2011b).

Teniendo en cuenta la carencia de los sistemas provinciales y nacionales de vigilancia de la salud de los trabajadores agrícolas y considerando las disparidades en el acceso a la atención médica, sería importante que desde las instituciones oficiales se promuevan investigaciones incluyendo biomarcadores de efecto que permitan detectar tempranamente cambios en la salud de los trabajadores expuestos a plaguicidas. Sin embargo al presente y en lo inmediato, se debería comenzar por incorporar, al menos, el control biológico regular de los trabajadores a través de la valoración de la actividad de AChE en aplicadores de plaguicidas y trabajadores rurales (Ranjar y col., 2002; Shadnia y col., 2005; Rastogi y col., 2009).

Nuevos estudios son fundamentales en las poblaciones rurales, en especial en los hijos de los trabajadores agrícolas que pueden ser particularmente vulnerables a los efectos biológicos de los plaguicidas (Mc Cauley y col., 2006). Aunque el mantenimiento de las cohortes de estudio es un desafío, se necesitan estudios que mejoren nuestra capacidad para el seguimiento, en el tiempo, de la población de zonas rurales. Esto es especialmente crítico en la evaluación del impacto de la exposición crónica a bajas dosis de plaguicidas y los efectos en las poblaciones más jóvenes. El uso de marcadores simples, no invasivos, que puedan medir el daño genotóxico como es el test de MNMB, podrían proporcionar una oportunidad para que expertos laborales y ambientales puedan generar cohortes para estudiar, en forma prospectiva, la posible asociación entre los hallazgos mediante biomarcadores y los efectos posteriores en la salud.

A pesar que muchos estudios que incluyen trabajadores agrícolas carecen del tamaño de muestra representativo, los investigadores deberían definir claramente en sus publicaciones los métodos de evaluación de la exposición y los efectos sobre la salud para permitir comparaciones entre los distintos reportes y así poder realizar meta-análisis de estudios similares. Esto es particularmente crítico en Latinoamérica, donde a través de los numerosos trabajos publicados es claro que se necesita llegar a conclusiones globales.

Las perspectivas de desarrollo de la biología molecular indican que, en un futuro próximo, un mayor número de biomarcadores estará disponible para evaluar la exposición y efectos biológicos, tales como daños en el ADN, estrés oxidativo, y otros mecanismos biológicos implicados. Estas técnicas, junto con los biomarcadores de susceptibilidad genética mejorarán nuestra capacidad para caracterizar el riesgo individual y además colaborarán para identificar a los miembros más vulnerables de la población. Se necesitará por lo tanto una comunicación eficaz, para explicar a los trabajadores agrícolas el porqué de estas pruebas y proporcionar la comunicación adecuada del riesgo. Iniciar un proceso de comunicación efectiva con los trabajadores agrícolas, es de esperar, incrementará su participación en futuras investigaciones, que permitan continuar con evaluaciones de los impactos en la salud en los trabajadores rurales.

### 5.3. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se puede llegar a las siguientes conclusiones finales:

- ✓ La exposición laboral a plaguicidas, tanto en cultivos intensivos como extensivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe, es la principal fuente de estrés oxidativo y daño al ADN en individuos expuestos.
- ✓ Los biomarcadores seleccionados durante el desarrollo de este trabajo de Tesis fueron válidos y eficientes proporcionando una herramienta interesante para acrecentar la comprensión de los mecanismos biológicos asociados al daño por exposición ocupacional a pesticidas.
- ✓ La ausencia del uso de medidas de protección durante la manipulación de plaguicidas, la antigüedad laboral y las distintas mezclas utilizadas, son factores fundamentales determinantes del impacto de la exposición.
- ✓ Estas conclusiones conducen a las siguientes recomendaciones:
  - a) Los individuos expuestos deberían ser monitoreados de manera frecuente para minimizar o reducir potenciales efectos nocivos de los pesticidas en su material genético.
  - b) Se debe continuar con la evaluación de los riesgos asociados con la exposición a pesticidas en la población expuesta de nuestro país.

## **CAPÍTULO 6**

### **Bibliografía**

- Abdollahi, M.; Balali-Mood, M.; Akhgari, M.; Jannet, B.; Kebriaezadeh, A. y Nikfar, S. (1996) *A survey of cholinesterase activity in healthy and organophosphate-exposed population*. *Irn. J. Med. Sci.* 21: 63–66.
- Abdollahi, M.; Ranjbar, A.; Shadnia, S.; Nikfar, A. y Rezaie, A. (2004). *Pesticides and oxidative stress: a review*. *Med. Sci. Monit.* 10(6): 141-147.
- Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro*. *Method. Enzymol.* 105: 121-126.
- Ajayi, O.C. y Akinnifesi, F.K. (2008). *Farmers' understanding of pesticide safety labels and field spraying practices: a case study of cotton farmers in northern Cote d'Ivoire*. *Sci. Res. Essays.* 2: 204-210.
- Akhgari, M. (2003). *Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats*. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 4: 205-211.
- Alavanja, M.C.; Hoppin, J.A. y Kamel F. (2004). *Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity*. *Annu Rev Public Health.* 25:155–197.
- Albano, E.; Tomasi, A.; Persson, J.O. Terelius, Y.; Gorla-Gatti, L. y Ingelman-Sundberg M. (1991). *Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols*. *Biochem Pharmacol.* 41:1895– 902.
- Albano, E.; Clot, P.; Morimoto, M.; Tomasi, A.; Ingelman-Sundberg, M. y French, S.W. (1996) *Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol*. *Hepatology.* 23:155– 63.
- Albertini, R.J.; Anderson, D.; Douglas, G.R.; Hagmar, L.; Hemminki, K.; Merlo, F.; Natarajan, A.T.; Norppa, H.; Shuker, D.E.; Tice, R.; Waters, M.D. y Aitio A. (2000). *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety*. *Mutat. Res.* 463: 111–172.
- Aliciguzel, Y.; Ozdem, S.; Demir, A.Y.; Unal, F.; Kumbul, D.; Ozdem, S.S.; Perry, G. y Smith, M.A. (2001). *Effect of the herbicide 4-CPA on human erythrocyte antioxidant enzymes in vitro*. *Redox Report.* 6: 153–154.

Altuntas, I.; Delibas, N.; Doguc, D.K.; Ozmen, S. y Gultekin, F. (2003). *Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro*. Toxicol. in Vitro. 17: 153–157.

Altuntas, I.; Kilinc, I.; Orhan, H.; Demirel, R.; Koylu, H. y Delibas, N. (2004). *The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro*. Human and Experiment Toxicology. 23: 9–13.

Amoateng, A.Y.; Sathiakumar, N.; Delzell, E y Cole, P. (1995). *Mortality among workers at a pesticide manufacturing plant*. JOEM. 37:471-477.

Anderson, D.; Yu, T.W. y McGregor, D.B. (1998). *Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure*. Mutagenesis. 13,6: 539-55.

Aragón, J.R. (2003). *Control Insectos Perjudiciales de la Soja En la Región Pampeana*. INTA Marcos Juárez, Córdoba. INTA Ediciones. 75-82.

Arcury, T.A.; Quandt, S.A.; Austin, C.K.; Preisser, J. y Cabrera, L.F. (1999). *Implementation of US EPA's Worker Protection Standard training for agricultural laborers: an evaluation using North Carolina data*. Public Health Rep. 114: 459-468.

Arcury, T.A.; Quandt, S.A.; Cravey, A.J.; Elmore, R.C. y Russell, G.B. (2001). *Farmworker reports of pesticide safety and sanitation in the work environment*. Am J Ind Med. 39: 487-498.

Arcury, T.A.; Quandt, S.A.; Rao, P.; Doran, A.M.; Snively, B.M. y Barr, D.B. (2005). *Organophosphate pesticide exposure in farmworker family members in western North Carolina and Virginia: case comparisons*. Hum Organ. 64: 40-51.

Arcury, T.A.; Grzywacz, J.G.; Davis, S. W.; Barr, D.B. y Quandt, S.A. (2006), *Organophosphorus pesticide urinary metabolite levels of children in farmworker households in eastern North Carolina*. American Journal of Industrial Medicine. 49: 751–760.

Arevila, A.; Ramos, J. y Jimenez, B. (1997). *Evaluacion de la contaminacion dispersa por agroquímicos en Mexico*. Ingenieria Ambiental.1: 26–30.

Aronsson, G. (1999). *Contingent workers and health and safety*. Work, Employment and Society. 13: 439-459.

Aronsson, G.; Gustafsson, K. y Dallner, M. (2002). *Work environment and health in different types of temporary jobs*. Eur J Work Organ Psychol. 11: 151-175.

Arregui, M.C.; Beldoménico, H.R.; Cassano A.E.; Collins, P.; Gagnetten, A.M.; Kleinsorge, E.C.; Lajmanovich, R.C.; Lenardón, A.; Lorenzatti, E.; Luque, E.H.; Maitre, M.I.; Muñoz-de-Toro, M.; Ortega, H.H.; Peltzer, P.M.; Poletta, G.L.; Rodríguez, A.R.; Sánchez, D.; Scagnetti, J.; Simoniello, M.F.; Varayoud, J. y Zalazar, C.S. (2010). *Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato*. Universidad Nacional del Litoral, pp. 272. En prensa. ISBN: 987-657-506-6 (ISBN13: 978-987-657-506-5).

Ascarrunz, M.E.; Tirado, N.; Gonzales, A.R.; Cuti, M.; Cervantes, R.; Huici, O.; Jors, E. (2005) *Evaluacion de riesgo genotoxico biomonitorizacion de trabajadores agricolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas / Assessment of genoptoxic risk biomonitoring of farm workers exposed to pesticides in Caranavi, Guanay, Palca and Mecapaca*. Cuad. Hosp. Clín. 50,2: 27-37.

Ashby, J.; Waters, M.D. y Preston, J. et al. (1996) *IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens*. Mutat. Res. 352: 153–157

Babior, B.M. (1978). *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes*. N Engl J Med. 298: 721-728.

Bagchi, D.; Bagchi, M.; Hassoun, E.; Kelly, J. y Stohs, S. J. (1995) *Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats*. Toxicology. 95: 1–9.

Baigorri, H. y Pereyra, V. (2002). *El INTA y el desarrollo de la Soja en la Argentina*. INTA Marcos Juárez. Córdoba y Unidad Integrada Barilcarce. Buenos Aires. INTA Ediciones. 19-23.

Balaji, M. y Sasikala, K. (1993) *Cytogenetic effect of malathion in in vitro culture of human peripheral blood*. Mutat. Res. 301: 13–17.

Banerjee, B.D.; Seth, V.; Bhattacharya, A.; Pasha, S.T. y Chakraborty A.K. (1999). *Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers*. Toxicol. Lett. 107: 33-47.

Benencia, R. y Souza-Casadinho, J. (1993). *Alimentos y salud: uso y abuso de pesticidas en la horticultura bonaerense en Realidad Económica*. IADE, Buenos Aires. 114, 115: 29-53.



- Benencia, R. (1997) *Area Hortícola Bonaerense, cambios en la producción y su insidencia en los sectores sociales*. Bs.As. Ed. La Colmena.
- Bernard, A.M. (1995) *Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendation for applications in population studies*. Toxicology. 101: 65-71.
- Beuge, J.A. y Aust SD. (1978). *Microsomal lipid peroxidation*. Method. Enzymol. 52: 302–10.
- Bhagavan, N.V. (2001). *Medical Biochemistry, Fourth Edition*. Publisher: Academic Press. ISBN: 0120954400. 1067 pages.
- Bhalli, J.A.; Ali, T.; Asi, M.R.; Khalid, Z.M.; Ceppi, M. y Khan, Q.M. DNA (2009). *Damage in Pakistani Agricultural Workers Exposed to Mixture of Pesticides*. Environmental and Molecular Mutagenesis. 50: 37- 45.
- Biros, M.; Fish, S. y Lewis, R. (1999). *Implementing the food and drug administrations final rule for waiver of informed consent in certain emergency research circumstances*. Academic Emergency Medicine. 6(12): 1272-81.
- Bjelland, S. y Seeberg, E. (2003). *Review Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation*. Mutation Research. 531: 37–80.
- Blasiak, J.; Arabski, M.; Krupta, R.; Wozniak, K.; Zadrozny, M.; Kasznicki, J.; Zurawska, M. y Drzewoski, J. (2004). *DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus*. Mut. Res. 554: 297-304.
- Boffetta, P. (1995) *Sources of bias, effect of confounding in the application of biomarkers to epidemiological studies*. Toxicol Lett. 77: 235-238.
- Boiteux, S. (1993) *Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of Escherichia coli: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 19: 87–96.
- Bolognesi, C.; Perrone, E. y Landini E. (2002). *Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy*. Mutagenesis. 17: 391–397.
- Bolognesi, C. (2003). *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies*. Mutat. Res. 543: 251–272.

- Bolognesi, C.; Landini, E.; Perrone, E. y Roggeri, P. (2004). *Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe*. Mutat. Res. 557: 109–117.
- Bolognesi C.; Carrasquilla G.; Volpi S.; Solomon K. R. y Marshall E.J.P. (2009). *Biomonitoring of Genotoxic Risk in Agricultural Workers from Five Colombian Regions: Association to occupational Exposure to Glyphosate*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 72: 986–997.
- Bolognesi, C.; Creus, A.; Ostrosky-Wegman, P. y Marcos, R. (2011). *Review Micronuclei and pesticide exposure*. Mutagenesis. 26,1: 19–26.
- Bonassi, S.; Fontana, V.; Ceppi, M.; Barale, R. y Biggeri, A. (1999) *Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells*. Mutat. Res. 438:13–21
- Borgert, C.; Quill, T.; McCarty, L. y Mason, A. (2004). *Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment?* Toxicol Appl Pharmacol. 201:85–96.
- Bortoli, G. M.; Azevedo, M.B. y Silva, L.B. (2009) *Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers*. Mutat. Res. 675: 1–4.
- Bouvier, G.; Blanchard, O.; Momas, I. y Seta N. (2006). *Pesticide exposure of non-occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: a French pilot study*. Sci Total Environ. 366,1: 74-91.
- Bowden, R.D.; Buckwalter, M.R.; McBride, J.F.; Johnson, D.A.; Murray, B.K. y O'Neill, K.L. (2003). *Tail profiler: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay*. Mut. Research. 537: 1-9
- Boyle, S.P.; Dobson, V.L.; Duthie, S.J.; Kyle, J.A.M. y Collins, A.R. (2000) *Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal*. Eur. J. Nutr. 39: 213–223.
- Bradberry, S.M. y Vale, J.A. (2005) *Organophosphorus and Carbamate Insecticides*. In: Brent J, Wallece K, Burkhart K, Phillips S, Donovan JW. Critical Care Toxicology: Diagnosis and Manegement of the Critically Poisoned Patient. 1ra Edición. Ed. Elsevier Mosby. Philadelphia. 937-946.

- Breslin, W.J.; Liberacki, A.B.; Dittenber, D.A. y Quast J.F. (1996) *Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chloropyrifos in the rat*. *Fundam. Appl. Toxicol.* 29: 119–130.
- Bukowska, B. (2003). *Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 135: 435–441.
- Bukowska, B. (2004). *2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role of glutathione*. *Cell Biology International*. 28: 557–563.
- Bukowska, B.; Michałowicz, J. y Duda, W. (2007). *Alterations in human red blood cell properties induced by 3-(dimethylamino)phenol (in vitro)*. *Toxicology in Vitro*. 21, 8: 1574-1580.
- Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. (2006). *Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review*. *Mutagenesis*. 21: 93-103.
- Burke, T. (2006). *Human Biomonitoring for Environmental Chemicals* This PDF is available from the National Academies Press at:<http://www.nap.edu/catalog/11700.html>. Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants, National Research Council.
- Burlinson, B.; Tice, R.R.; Speit, G.; Agurell, E.; Brendler-Schwaab, S.Y.; Collins, A.R.; Escobar, P.; Honma, M.; Kumaravel, T.S.; Nakajima, M.; Sasaki, Y.F.; Thybaud, V.; Uno, Y.; Vasquez, M. y Hartmann, A. (2007). *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup*. *Mutat. Res.* 627: 31–35.
- Calabrese, E.J. (1990). *Multiple Chemical Interactions*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Cantor, K. y Booze, C. (1990). *Mortality among aerial pesticide applicators and flight instructors*. *Arch Environ Health*. 45: 295-302.
- Carballo, M.A.; Simoniello, M.F. y Kleinsorge, E.C. (2011a). *Agrochemicals: Horticulture Use Conditions Determine Genotoxic Effects and Oxidative Damage in Rural Populations in Santa Fe, Argentina* Chapter 17 in Source: Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, Book edited by: Margarita Stoytcheva, ISBN: 978-953-307-531-0, Publisher: InTech.

Carballo, M.A.; Porcel de Peralta, M.; Kleinsorge, E.; Simoniello, M.F. (2011b). *Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage in soybean pesticide applicators*. Toxicological Sciences S 2011: 1-619.

Carbonell, E.; Puig, M.; Xamena, N.; Creus, A. y Marcos, R. (1990). *Sister chromatid exchange in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides*. Mutagenesis. 5: 403–405.

Carbonell, E.; Valbuena, A.; Xamena, N.; Creus, A. y Marcos, R. (1995). *Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides*. Mutat. Res. 344: 127–134

Carpenter, D.O.; Arcaro, K. y Spink, D.C. (2002). *Understanding the Human Health Effects of Chemical Mixtures*. Environ Health Perspect. 110, 1: 25–42.

Carrero, D. (2007). *Norte De La Provincia De Santa Fe, Provincia Del Chaco, Provincia De Santiago Del Estero*. En: La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Estudio colaborativo multicéntrico. Ministerio de Salud. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable: OPS: AAMMA, 247-268, ISBN 978-987-96256-7-5, Buenos Aires. 2007.

CASAFE. (2010). *Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina*. <http://www.casafe.org/>.

Casarett y Doull (2005). *Fundamentos de Toxicología*. Klaassen, C.D., Watkins, J.B. (Eds). McGraw-Hill /Interamericana, Madrid, España.

Castignani, M.I.; Arregui, M.C. y Pelatti, N.S. (2004). *Estimación de contaminación por plaguicidas con indicadores ambientales y económicos en huertas de tomate en Santa Fe*. Revista FAVE Ciencias Agrarias. 3: 1-2.

Castillo, R.; Huerta, P.; Carrasco, R. y Rodrigo, R. (2003). *Estrés oxidativo y daño renal, Artículo de Revisión*. CIMEL. 8:144.

Castillo-Cadena, J.; Tenorio-Vieyra, L.E.; Quintana-Carabia, A.I.; Garcia-Fabila, M.M.; Ramirez-San, J.E. y Madrigal-Bujaidar, E. (2006). *Determination of DNA Damage in*

- Floriculturists Exposed to Mixtures of Pesticides*. Jour. Biomedicine and Biotechnology. 97896: 1–12.
- Castro, R.; Ramírez, V. y Cuenca, P. (2004) *Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas*. Rev. Biol. Trop. 52, 3: 611-621.
- Catalgol, B.K.; Ozden, S. y Alpertunga, B. (2007). *Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes*. Toxicol. in Vitro. 21: 1538–1544.
- Cavieres, M.F.; Jaeger, J. y Porter, W. (2002). *Developmental toxicity of a commercial herbicide mixture in mice: I. Effects on embryo implantation and litter size*. Environ Health Perspect. 110:1081–1085.
- Cellini, A. y Offidani, A. (1994). *An epidemiological study on cutaneous disease of agricultural workers authorized to use pesticides*. Dermatology. 189:129-132.
- Cencig, G.; Villar, J. y Keller, O. (2009). *Evaluación del comportamiento de cultivos de trigo pan en el centro de Santa Fe. Campaña 2008*. <http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/miscelaneas/>
- Cereser, C.; Boget, S.; Parvaz, P. y Revol, A. (2001) *Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death*. Toxicology 163: 153–162.
- Chalermphol, J. y Shivakoti, G.P. (2009). *Pesticide use and prevention practices of tangerine growers in northern Thailand*. J. Agr. Educ. Ext. 15: 21-38.
- Chambers, J.E. y Oppenheimer, S.F. (2004). *Toxicological highlight. Organophosphates, Serine Esterase Inhibition, and Modeling of Organophosphate Toxicity*. Toxicological sciences. 77: 185–187
- Cocker, J.; Mason, H.J.; Garfitt, S.J. y Jones K. (2002). *Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides*. Toxicology Letters. 134: 97–103.
- Collins, A. R.; Duthie, S.J. y Dobson V.L. (1993). *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA*. Carcinogenesis. 14: 1733–1735.

- Collins, A.R.; Dusinska, M.; Gedik, C.M. y Tetina R. (1996). *Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?* Environmental Health Perspectives. 104,3: 465–469.
- Collins, A.R.; Dusinska, M.; Franklin, M.; Somorovska, M.; Pterovska, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panayiotidis, M.; Rasilova, K. y Vaughan N. (1997). *Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications.* Environmental Molecular Mutagenesis. 30: 139–146.
- Collins, B.H.; Horska, A.; Hotten, P.M.; Riddoch, C. y Collins, A.R. (2001) *Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro.* Nutr.Cancer. 39: 148–153.
- Collins, A.R.; Harrington, V.; Drew, J. y Melvin, R. (2003) *Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study.* Carcinogenesis. 24: 511–515.
- Collins, A.R. y Dusinska, M. (2009) *Applications of the Comet Assay in Human Biomonitoring, In: The Comet Assay in Toxicology,* Dhawan, A. & Anderson, D. (Ed.), 201-227, RSC Publishing, ISBN 978-0-85404-199-2, Cambridge, U.K.
- COM Website. (2000) United Kingdom Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products, and the Environment. *Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity.* <http://www.doh.gov.uk/com/guidance.pdf>.
- Conde, R.C. (1986). *The growth of the Argentine economy, c. 1870–1914, c. 1870 to 1930.* Ed. Leslie Bethell. Cambridge University Press, 1986. Cambridge Histories Online. Cambridge University Press. 21 November 2010.
- Cooper, S.P.; Darrah, A.R.; Vernon, S.W.; Stallones, L.; MacNaughton, N.; Robison, T. (2001). *Ascertainment of pesticide exposures of migrant and seasonal farmworker children: findings from focus groups.* Am J Ind Med. 40:531-537.
- Coronado, G.D.; Thompson, B.; Strong, L.; Griffith, W.C. e Islas, I. (2004). *Agricultural Task and Exposure to Organophosphate Pesticides among Farmworkers.* Environ. Health Perspect. 112: 142–147.
- Costa, C.; Teixeira, J.; Silva, S.; Roma-Torres, J.; Coelho, P.; Gaspar, J.; Alves, M.; Laffon, B.; Rueff, J. y Mayan, O. (2006). *Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides.* Mutagenesis. 21: 343-350.

- Cuenca, P. y Ramírez, V. (2004) *Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas*. Rev. Biol. Trop. 52,3: 623-628.
- Curl, C.; Fenske, R.; Kissel, J.; Shirai, J.; Moate, T.; Griffith, W.; Coronado, G. y Thompson, B. (2002). *Evaluation of Take-Home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children*. Environ Health Perspect. 110: 787-792.
- Da Silva, J.; Moraes, C.R.; Heuser, V.D.; Andrade, V.M.; Silva, F.R.; Kvitko, K.; Emmel, V.; Rohr, P.; Bordin, D.L.; Andrezza, A.C.; Salvador, M.; Henriques, J.A.P. y Erdtmann, B. (2008) *Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes*. Mutagenesis. 23, 5: 415-422.
- Damalas, C.A.; Georgiou, E.B.; Theodorou, M.G. (2006a). *Pesticide use and safety practices among Greek tobacco farmers: A survey*. Int. J. Environ. Health Res. 16: 339- 348.
- Damalas, C.A.; Theodorou, M.G.; Georgiou, E.B. (2006b). *Attitudes towards pesticide labelling among Greek tobacco farmers*. Int. J. Pest Manag. 52: 269-274.
- Damalas, C.A.; Hashemi, S. M. (2010). *Pesticide risk perception and use of personal protective equipment among young and old cotton growers in northern Greece*. Agrocienca 44: 363-371.
- Datta, C.; Gupta, J. y Sarkar, A. (1992). *Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma*. Indian Journal of Experimental Biology. 30: 65-67.
- De Zwart, L.; Meerman, J.H.N.; Commandeur, J.N.M. y Vermeulen, N.P.E. (1999). *Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans*. Free Radical Biology & Medicine. 26, 1, 2: 202-226.
- Deacon, M.M.; Murray, J.S.; Pilny, M.K.; Rao, K.S.; Dittenber, D.A.; Hanley, T.R. Jr.; John, J.A. (1980) *Embryo toxicity and fetotoxicity of orally administered chloropyrifos in mice*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 54: 31-40.
- Deisseroth, A. y Dounce, A.L. (1970) *Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalase, and physiological role*. Physiol. Rev. 50: 319-375

- Delescluse, C.; Ledirac, N.; Li, R.; Piechocki, M.P.; Hines, R.N. y Gidrol, X. (2001). *Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells*. *Biochem Pharmacol* 61,4:399–407.
- Domingo, O.A. (2004) *Producción de Semilla de Cereales en la Argentina*. IDIA XXI. 6: 91-93.
- Dor, F.; Dab, W.; Empeur-Bissonnet, P. y Zmirou, D. (1999) *Validity of biomarkers in environmental health studies: The case of PAHs and Benzene*. *Critical Rev Tox.* 29: 129-168.
- Dulout, F.N.; Olivera, O.A.; von Guradze, H. y Pastori M.C. (1982) *Cytogenetic effect of malathion assessed by the micronucleus test*. *Mutat. Res.* 105: 413–416.
- Dulout, F.N.; Pastori, M.C.; Olivero, O.A.; Gonzalez Cid, M.; Loria, D.; Matos, E.; Sobel, N.; de Bujan, E.C. y Albiano, N. (1985). *Sisterchromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides*. *Mutat. Res.* 143: 237–244.
- Dusinska, M. y Collins, A.R. (1996) *Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay*. *Alternat. Lab. Anim.* 24: 405–411.
- Dusinska, M. A.; Collins, A.; Kazimirova, M.; Barancokova, V.; Harrington, K.; Volkovova, M.; Staruchova, A.; Horska, L.; Wsolova, A. y Kocan (2004) *Genotoxic effects of asbestos in humans*. *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 553: 91–102.
- Dusinska, M. y Collins, A. R. (2008). *The Comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions*. *Mutagenesis.* 23: 191–205.
- Duthie, S.J.; Ross, M.A. y Collins, A.R. (1996) *Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes*. *Cancer Res.* 56: 1291–1295.
- Ecobichon, D.J. (2005) *Efectos Tóxicos de los pesticidas*, en: Klaassen, C.D. y Watkins, J.B. (Eds), Casarett y Doull. *Fundamentos de Toxicología*, cap. 22, McGraw-Hill /Interamericana, Madrid, España.
- Edge, R. y Truscott, T.G. (1997) *Prooxidant and antioxidant reaction mechanism of carotene and radical interaction with vitamin E and C*. *Nutrition* 13: 992–994.



- El-Demerdash, F.M. (2007). *Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants*. Toxicol. in Vitro. 21: 392–397.
- Ellenhorn, M.J.; Schonowalt, S.; Ordog, G.y Wasserberger, J. (1997) *Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. Maryland: Williams and Wilkins: 1614-63
- Ellman, C.L. (1959). *Tissue sulphydryl group*. Arch.Biochem. Biophys. 82: 70-77.
- Ellman, G.L.; Curtney, K.D.; Andrews, V. y Featherstone, R.M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7: 88–95.
- Elmore, R.C. y Arcury, T.A. (2001). *Pesticide exposure beliefs among Latino farmworkers in North Carolina's Christmas tree industry*. Am J Ind Med 40:153-160.
- Eraslan, G.; Saygi, S.; Essiz, D.; Aksoy, A.; Gul, H. y Macit, E. (2007) *Evaluation of aspect of some oxidative stress parameters using vitamin E, proanthocyanidin and N-acetylcysteine against exposure to cyXuthrin in mice*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 88: 43–49.
- Erben, M; Galán, G; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Paonessa A.; Cuneo, F.; Simoniello, M.F. (2010). *Evaluación de población expuesta a agentes oxidantes utilizando Parámetros Bioquímicos, de Estado Oxidativo y Nutricionales*. Revista FABICIB.14: 84-96.
- Eren, K.; Ozmeric, N. y Sarda, S. (2002) *Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline Comet assay (single-cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine*. Clin. Oral Investig. 6: 150–154.
- Ergene, S.; Celik, A.; Cavas, T. y Kaya, F. (2007) *Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges*. Environ. Int. 33: 877–885.
- Fairbain, D.W.; Olive, P.L. y O'Neill, K.L. (1995). *The comet assay: a comprehensive review*. Mutat Res 339:37–59.
- FAO, 2006, [http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/)

FAO/WHO *Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. Second Revision. Disponible en [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/PestSpecsManual2010.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/PestSpecsManual2010.pdf). Consultado: 15/11/2010.

Faust, F.; Fekadu Kassie, F.; Siegfried Knasmüller, S.; Sebastian Kevekordes, S. y Mersch-Sundermann, V (2004). *Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies*. *Toxicology*. 198: 341–350

FDA Website. (2006) *Guidance for Industry and Review Staff Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results*. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

Fenske, R.A.; Kissel, J.C.; Lu, C.; Kalman, D.A.; Simcox, N.J.; Allen, E.H. (2000). *Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community*. *Environ Health Perspect*. 108: 515-520.

Feron, V.J.; Cassee, F.R.; Groten, J.P.; ve Vliet, P.W. y van Zorge, J.A. (2002). *International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures*. *Environ Health Perspect*. 110, 6: 893–899.

Finkel, T. (1998) *Oxygen radicals and signaling*. *Curr Opin Cell Biol*.10: 248-53.

Finkelman, J. (1994) *Epidemiologia Ambiental: Un proyecto para America Latina y el Caribe. 1era ed. Mexico: Organizacion Panamericana de la Salud y Organizacion Mundial de la Salud*.

Fontanetto, H.; O. Keller; L. Belotti; D. Giailevra y C. Negro. (2009). *Rendimientos de maíces de segunda fecha de siembra. EEA Rafaela. Campaña 2008/09. Información técnica de cultivos de verano*. Publicación miscelánea. EEA INTA Rafaela.115: 11-14.

Fortoul, T. I.; Valverde, M.; Lopez, M. C.; Avila-Costa, M. R. ; Avila-Casado, M. C. ; Mussali-Galante, P.; Gonzalez-Villalva, A.; Rojas, E.y Ostrosky-Shejet, P. (2004) *Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area*. *Environ. Res*. 94: 243–248.

- Gabbianelli, R.; Falcioni, G.; Nasuti, C. y Cantalamessa, F. (2002). *Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity*. Toxicology. 175: 91-101.
- Gabbianelli, R.; Falcioni, M. L.; Cantalamessa, F. y Nasuti, C. (2009), *Permethrin induces lymphocyte DNA lesions at both Endo III and Fpg sites and changes in monocyte respiratory burst in rats*. Journal of Applied Toxicology. 29: 317–322.
- Gadano, A. (2006) *Daño en la molécula de ADN de simple y doble hebra*. en: M.D. Mudry, M.A. Carballo (Eds.), Genética Toxicológica, Cap. 4, De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires, Argentina, pp. 83–108.
- Galloway, S.M.; Armstrong, M.A.; Reuben, C.; Colman, S.; Brown, B.; Cannon, F.; Ahmed, M.; Duk, S.; Rimpo, J.; Margolin, B.H.; Resnick, M.A.; Anderson, B. y Zeiger, E. (1987) *Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluation of 108 chemicals*. Environ. Mol. Mutagen. 10: 1–175.
- Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2000) *Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay*. Mutat. Res. 469: 279-285.
- Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2001). *Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides*. Toxicology. 165: 153–162.
- Garry, V.; Nelson, R.; Griffith, J. y Harkins, M. (1990) *Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants*. Teratog. Carcinog. Mutagen. 10: 21–29.
- Gerschman, R. (1954) *Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common*. Science.119: 623-6.
- Giorgi, R.; Tosolini, R.; Sapino, V.; Villar, J.; León, C. y Chiavassa, A. (2008) *Zonificación agroeconómica de la provincia de Santa Fe. Delimitación y descripción de las zonas y subzonas agroeconómicas Personal del Área de Investigación en Producción Vegetal, INTA EEA Rafaela: anexo zonas Estación Experimental Agropecuaria Rafaela INTA. CR Santa Fe. Publicación Miscelánea 110*.

- Goldman, L.; Eskenazi, B.; Bradman, A. y Jewell, N.P. (2004). *Risk behaviors for pesticide exposure among pregnant women living in farmworker households in Salinas, California*. Am J Ind Med. 45: 491-499.
- Gomez-Arroyo, S.; Noriega-Aldana, N.; Osorio, A.; Galicia, F.; Ling, S. y Villalobos-Pietrini, R. (1992). *Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides*. Mutat. Res. 281:173-179.
- Gomez-Arroyo, S.; Diaz-Sanchez, Y.; Meneses-Perez, M.A.; Villalobos-Pietrini, R. y De Leon-Rodriguez, J. (2000). *Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides*. Mutat. Res. 466: 117-124.
- González, M.; Soloneski, S.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2003) *Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells*. Mutat Res. 534,1-2:145-54.
- González, M.; Soloneski, S.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2005) *Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells*. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 19, 2: 289-97.
- Gordon, C.J. y Rowsey P.J. (1998) *Poisons and fever*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25: 145-149.
- Gordon, M. y Richter, E.D. (1991) *Hazards associated with aerial spraying of organophosphate insecticides in Israel*. Rev Environ Health.9: 229-238.
- Grajeda-Cota, P.; Ramirez-Mares, M.V. y Gonzalez de Mejia, E. (2004) *Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes*. Toxicology in Vitro 18: 13-19.
- Grandjean, P. (1995) *Biomarkers in Epidemiology*. Clin. Chem. 41/12: 1800-1803.
- Griehop, J.I.; Stiles, M.C.; Villanueva, N. (1996). *Prevention and resiliency: A cross-cultural view of farmworkers' and farmers' beliefs about work safety*. Hum Organ. 55: 25-32.

Grover, P.; Danadevi, K.; Mahbood, M.; Rozati, R.; Saleha Banu, B. y Rahman, M.F. (2003). *Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet Assay*. *Mutagenesis*. 18: 201-205.

Guivant, J. S. (1994) *Percepción de los agricultores del Gran Florianópolis (SC) sobre los riesgos derivados del uso de agrotóxicos*. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. 22-82.

Gultekin, F.; Ozturk, M. y Akdogan, M. (2000). *The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro)*. *Archives of Toxicology*. 74: 533–538.

Hagmar, L.; Stromberg, U.; Tinnerberg, H. y Mikoczy, Z. (2001). *The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis*. *Int J Hygiene Environ Health*. 204: 43–47.

Halliwell, B y Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon.1:142.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.

Halliwell B. (2002). *Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?* *Free Radic Biol Med*. 32,10: 968–974.

Hashemi, S.M.; Mokhtarnia, M.; Erbaugh, J.M.y Asadi, A. (2008). *Potential of extensión workshops to change farmers' knowledge and awareness of IPM*. *Sci. Total Environ*. 407: 84–88.

Hattis, D. y Silver, K. (1994). *Use of mechanistic data in occupational health risk assessment—the example of diesel particulates*, In: *Chemical Risk Assessment and Occupational Health Current Applications, Limitations, and Future Prospects* (Smith CM, Christiani DC, Kelsey KT, eds). Westport, CT:Greenwood Publishing Group, Inc. 167–177.

He, F.; Chen, S.; Tang, X.; Gan, W.; Tao, B. y Wen, B. (2002) *Biological monitoring of combined exposure to organophosphates and pyrethroids*. *Toxicology Letters*. 134: 119–124.

Heath, A. y Vale, J. (1992). *Clinical presentation and diagnosis of acute orgnophosphate insecticide and carbamate poisoning*. In: *Clinical and Experimental Toxicology of*

Organophosphates and Carbamates, Ballantyne, B. & Marrs, T. (Ed.), 513–519, ISBN 0750602716, Butterworth, Oxford.

Herath, J.F.; Jala, S.M.; Ebert, M.J. y Marsolf, J.T. (1989) *Genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion based on human lymphocytes in cultura*. *Cytologia*. 54: 191–195.

Hernandez, A.F.; Lopez, O.; Rodrigo, L.; Gil, F.; Pena, G.; Serrano, J.L.; Parron, T.; Alvarez, J.C.; Lorente, J.A. y Pla, A. (2005). *Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility*. *Toxicol. Lett.* 159: 13–21.

Hernandez-Valero, M.A.; Jones, L.A y Hajek, R.A. (2003). *Potential pathways of exposure for DDE and mirex and reported health problems in Mexican-American migrant and seasonal farmworker children residing in Texas*. *J Children's Health*. 1: 241-255.

Hernberg, S. y Aitio, A (1987) *Validation of biological monitoring tests*. In: Foa V, Emmett EA, Maroni M, & Columbi A ed. *Occupational and environmental chemical hazards: cellular and biochemical indices for monitoring toxicity*. Chichester, England, Ellis Horwood, pp 41-49.

Hertzberg, R.C. y Teuschler, L.K. (2002). *Evaluating quantitative formulas for dose-response assessment of chemical mixtures*. *Environ Health Perspect.* 110, 6: 965–970.

Hoar, Z.S. y Blair, A. (1992) *Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma*. *Cancer Res.* 52: 5485-5488.

Hoda, M. y Sinha, S. (1991) *Protective role of ascorbic acid and vitamin B-complex against pesticide-induced clastogeny in bone marrow cells of mice*. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 182: 155–158.

Hofmann, J.N.; Keifer, M.C.; Furlong, C.E.; De Roos, A.J.; Farin, F.M.; Fenske, R.A.; van Belle, G. y Checkoway, H. (2009). *Serum Cholinesterase Inhibition in Relation to Paraoxonase-1 (PON1) Status among Organophosphate-Exposed Agricultural Pesticide Handlers*. *Environ Health Perspect.* 117:1402–1408

Hogenkamp, A.; Vaal, M. y Heederik, D. (2004) *Pesticide exposure in dwellings near bulb growing fields in The Netherlands: an explorative study*. *Ann Agric Environ Med.* 11,1: 149-53.

- Holland, N.T.; Bolognesi, B.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S. y Fenech, M. (2008) *The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps*. *Mutat. Res.* 659: 93–108.
- Hoyos, L.S.; Carvajal, S.; Solano, L.; Rodríguez, J.; Orozco, L.; López, Y. y Au, W.W. (1996). *Cytogenetic Monitoring of Farmers Exposed to Pesticides in Colombia*. *Environ. Health Perspect.* 104: 535-538.
- HSE (2000). *Medical Aspects of work-related exposure to organophosphates Guidance note MS17: Health and Safety Executive*, HSE Books, ISBN 0 7176 1977 X, Sudbury Suffolk.
- Hughes, C. M.; Lewis, S. E.; McKelvey-Martin, V. J. y Thompson, W. (1996) *A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified Comet assay*. *Molec. Hum. Reprod.* 2: 613–619.
- Ibitayo, O.O. (2006). *Egyptian farmers' attitudes and behaviors regarding agricultural pesticides: Implications for pesticide risk communication*. *Risk Anal.* 26: 989-995.
- INTA (2002) <http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/miscelaneas.html>
- IPCS (1993) *Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. 1-57.
- Irshad, M. y Chaudhuri, P.S. (2002) *Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body*. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 1233–1239.
- Jamal, G.A.; Hansen, S. y Julu, P.O.O. (2002) *Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity*. *Toxicology* 181,182: 23-33
- Jeyaratnam, J. (1990). *Acute pesticide poisoning: A mayor global health problem*, in *Wld Hlth Statist. Quart.* 43
- Jones, D.P.; Carlson, J.L.; Mody, V.C.; Cai, J.Y.; Lynn, M.J. y Sternberg, P. (2000). *Redox state of glutathione in human plasma*. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 625–635.

Jong, L.P.A.; Wolring, G.Z. y Benschop, H.P. (1982) *Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by methamidophos and analogous (di)methylphosphoramidates*. Archives of Toxicology 49. 2: 175-183

Jørs, E.; Gonzáles, A.R.; Ascarrunz, M.E.; Tirado, N.; Takahashi, C.; Lafuente, E.; Dos Santos, R.A.; Bailon, N.; Cervantes, R.O.H.; Bælum, J. y Lander, F. (2007) *Genetic Alterations in Pesticide Exposed Bolivian Farmers: An evaluation by analysis of chromosomal aberrations and the comet assay*. Biomark Insights. 2: 439-445.

Kachaiyaphum, P.; Howteerakul, N.; Sujirarat, D.; Siri, S. y Suwannapong, N. (2010) *Serum Cholinesterase level of Tai-chili farm workers exposed to chemical pesticide: Prevalence estimates and associated factors*. J.Occup. Health. 52: 89-98.

Kale, M.; Rathore, N.; John, S. y Bhatnagar, D. (1999). *Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species*. Toxicol. Lett. 105: 197–205.

Kalender, S.; Kalender, Y.; Ogutcu, A.; Uzunhisarcikli, M.; Durak, D. y Açikgoz, F. (2004). *Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E*. Toxicology. 202: 227–235.

Kamal, A.; Elgarhy, M.T.; Maklady, F.; Mostafa, M.A. y Massoud, A. (1990) *Serum cholinesterase and liver function among a group of organophosphorus pesticides sprayers in Egypt*. J Toxicol Clin Exp. 10: 427-435.

Kamel, F. y Hoppin, J.A. (2004). *Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease*. Environ Health Perspect. 112: 950–958.

Kawaguchi, S.; Nakamura, T.; Yamamoto, A.; Honda, G. y Sasaki, Y.F. (2010) *Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity?* Journal of Nucleic Acids. 541050: 1-8.

Kesavachandran, C.; Singh, V.K.; Mathur, N.; Rastogi, S.K.; Siddiqui, M.K.J.; Reddy, M.M.K.; Bharti, R.S. y Khan, A.M. (2006) *Possible mechanism of pesticide toxicity-related oxidative stress leading to airway narrowing*. Redox Report 11, 4: 159-163.



- Kirsch-Volders, M.; Vanhauwaert, A.; Eichenlaub-Ritter, U. y Decordier I. (2003). *Review Indirect mechanisms of genotoxicity*. Toxicology Letters 540: 153-163.
- Kisby, G.E.; Muniz, J.F.; Scherer, J.; Lasarev, M.R.; Koshy, M.; Kow, Y.W.; McCauley, L. (2009) *Oxidative Stress and DNA Damage in Agricultural Workers*. Journal of Agromedicine. 14, 2: 206-214.
- Klein, S.M.; Cohen, G. y Cederbaum A. (1981). *Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating system*. Biochemistry. 20: 6006-6012.
- Kono, Y. y Fridovich, I. (1982) *Superoxide radical inhibits catalase*. J. Biol. Chem. 257: 5751–5754
- Konradsen, F.; Van der Hoek, W.; Cole, D.C.; Hutchinson, G.; Daisley, H.; Singh, S. y Eddleston, M. (2003). *Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides*. Toxicology. 192: 249-261.
- Kourakis, A.; Mouratidou, M.; Kokkinos, G.; Barbouti, A.; Kotsis, A.; Mourelatos, D. y Dozi-Vassil, J. (1992). *Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses*. Mutat. Res. 279: 145–148
- Lander, B.F.; Knudsen, L.E.; Gamborg, M.O.; Jarventaus, H. y Norppa, H. (2000). *Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers*. Scand. J. Work Environ. Health. 26: 436–442.
- Lantieri, M.J.; Meyer Paz, R.; Butinof, M.; Fernández, R.A.; Stimolo, M.I. y Díaz, M.P. (2009) *Exposición a plaguicidas en agroaplicadores terrestres de la provincia de Córdoba, Argentina: factores condicionantes*. Agriscentia. 26,2: 43-54.
- Lebailly, P.; Vigreux, C.; Lechevrel, C.; Ledemeney, D.; Godard, T.; Sichel, F.; Le Talaër, J.Y.; Henry-Amar, M. y Gauduchon, P. (1998a). *Damage in Mononuclear Leukocytes of Farmers Measured Using the Alkaline Comet Assay: Modifications of DNA Damage Levels after a One-Day Field Spraying Period with Selected Pesticides*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7: 929-940.

- Lebailly, P.; Vigreux, C.; Lechevrel, C.; Ledemeney, D.; Godard, T.; Sichel, F.; Le Talaër, J.Y.; Henry-Amar, M. y Gauduchon, P. (1998b). *DNA Damage in Mononuclear Leukocytes of Farmers Measured Using the Alkaline Comet Assay: Discussion of Critical Parameters and Evaluation of Seasonal Variations in Relation to Pesticide Exposure*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 917-927.
- Lence, S.H. 2010. *The Agricultural Sector in Argentina* *The Argentina: Major Trends and Recent Developments*. Chapter 14. Staff General Research Papers, Iowa State University, Department of Economics.
- Lichtenberg, E. y Zimmerman, R. (1999). *Adverse health experiences, environmental attitudes, and pesticide usage behavior of farm operators*. *Risk Anal* 19: 283-294.
- Limón-Pacheco, J. y Gonsebatt, M.E. (2009) *The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress*. Mini review. *Mutat. Res.* 674: 137–147
- Liu, Y.J.; Huang, P.L.; Chang, Y.F.; Chen, Y.H.; Chiou, Y.H.; Xu, Z.L. y Wong, R.H. (2006). *GSTP1 Genetic Polymorphism Is Associated with a Higher Risk of DNA Damage in Pesticide-Exposed Fruit Growers*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15.4: 659–66.
- Lódola, A. (2008) *Contratistas, cambios tecnológicos y organizacionales en el agro argentino*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Publicación de las Naciones Unidas.
- López Díaz-Guerrero, N.; Gutiérrez Ruiz, M.C.; Cortés Barberena, E.; Zentella Dehesa, A. y Konigsberg Fainstein, M. (2003) *Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos*. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22,2: 109-16.
- Lopez, O.; Hernandez, A.F.; Rodrigo, L.; Gil, F.; Pena, G.; Serrano, J. L.; Parron, T.; Villanueva, E. y Pla, A. (2007). *Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides*. *Toxicol. Lett.* 171: 146-153.
- Lucero, L.; Pastor, L.; Suarez, S.; Durbán, R.; Gómez, C.; Parrón, T.; Creus, A. y Marcos, R. (2000). *Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells*. *Mutat. Res.* 464: 255-262.

- Lueken, A.; Juhl-Strauss, U.; Krieger, G. y Witte, I. (2004). *Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts*. Toxicology Letters 147: 35–43
- Machado, M.V., Ravasco, P., Jesus, L., Marques-Vidal, P., Oliveira, C.R., Proenca, T., Baldeiras, I.; Camilo, M.E. y Cortez-Pinto, H. (2008) *Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet*. Scand. J. Gastroentero. 43, 1: 95 – 102.
- Mancini, F.; Van Bruggen, A.H.C.; Jiggins, J. L.S.; Ambatipudi, A.C. y Murphy, H. (2005). *Acute pesticide poisoning among female and male cotton growers in India*. Int. J. Occup. Environ. Health. 11: 221-232.
- Mandel, J.S.; Alexander, B.H.; Baker, B.A.; Acquavella, J.F.; Chapman, P. y Honeycutt, R. (2005). *Biomonitoring for farm families in the Farm Family Exposure Study*. Scand J Work Environ Health. 31,1: 98-104.
- Mansour, S.A. y Mossa, A.T. (2009) *Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 93, 1: 34-39.
- Mañas, F.;Peralta, L.; Gorla, N.; Bosh, B. y Aissa, D. (2009a). *Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas*. Journal of Basic and Applied Genetics 20 (1): version on line ISSN: 1852-6233
- Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; García Ovando, H.; Weyers, A.; Ugnia, L.; Gonzalez Cid, M.; Larripa I.y Gorla, N. (2009b) *Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolito of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests*. Ecotoxicol. Environm. Saf. 72: 834–837.
- Marnett, L. J. (2000). *Oxyradicals and DNA damage*. Carcinogenesis. 21: 361–370.
- Martínez, R.; Gratton, T.B.; Coggin, C.; Rene, A. y Waller, W. (2004). *A study of pesticide safety and health perceptions among pesticide applicators in Tarrant County, Texas*. J Environ Health. 66: 34-37.

- Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. (2007) *Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 23: 1-4.
- Martínez-Valenzuela, C.; Gómez-Arroyo, S.; Villalobos-Pietrini, R.; Waliszewski, S.; Calderón-Segura, M.E.; Félix-Gastelum, R. y Álvarez-Torres, A. (2009) *Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico*. Environ. Int. 35: 1155–1159.
- McCauley, L.A.; Lasarev, M.R., Higgins, G., Rothlein, J., Muniz, J., Ebbert, C. (2001). *Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: a community-based research approach*. Environ Health Perspect. 109: 533-538.
- McCauley, L.A.; Michaels, S.; Rothlein, J.; Muniz, J.; Lasarev, M. y Ebbert, C. (2003). *Pesticide exposure and self-reported home hygiene: practices in agricultural families*. AAOHN J. 51: 113-119.
- McCauley, L.A.; Anger, W.K.; Keifer, M.; Langley, R.; Robson, M.G. y Rohlman, D. (2006). *Studying Health Outcomes in Farmworker Populations Exposed to Pesticides*. Environ. Health Perspect. 114: 953–960.
- McConnell, R.; Keifer, M. y Rosenstock, L. (1994) *Elevated tactile vibration threshold among workers previously poisoned with methamidofos and other organophosphate pesticides*. Am J Ind Med. 25: 325-234.
- Mercille, S. y Massie, B. (1994). *Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells*. Biotechnology and Bioengineering. 44: 1140-1154.
- Migliore, L.; Colognato, R.; Naccarati, A. y Bergamaschi, E. (2006) *Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study*. Mutagenesis. 21: 149–52.
- Ministerio de la Producción de la Prov. de Santa Fe. (2007) Centro Operativo “Ángel Gallardo” <http://www.santafe.gov.ar/mprod.html>
- Ministerio de la Producción, ingreso (2010) <http://www.santafe.gov.ar/mprod.html>
- Mitchell, J.H. y Collins, A.R. (1999) *Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men a pilot study*. Eur.J. Nutr. 38: 143–148.

- Mladinic, M.; Berend, S.; Lucic Vrdoljak, A.; Kopjar, N.; Radic, B. y Zeljezic D.(2009) *Evaluation of Genome Damage and Its Relation to Oxidative Stress Induced by Glyphosate in Human Lymphocytes in Vitro*. Environmental and Molecular Mutagenesis. 50: 800-807.
- Moller, P.; Knudsen, L.E.; Loft, S. y Wallin, H. (2000). *The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9: 1005–1015.
- Möller, W.; Barth, W.; Kohlhäufel, M.; Häussinger, K.; Stahlhofen, W. y Heyder, J. (2001) *Human alveolar long-term clearance of ferromagnetic iron oxide microparticles in healthy and diseased subjects*. Exp Lung Res. 27, 7:547–568.
- Møller. P. y Loft, S. (2002) *Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies*. Am. J. Clin. Nutr. 76: 303–310.
- Møller, P.; Vogel, U.; Pedersen, A.; Dragsted, L.O.; Sandstrom, B. y Loft, S. (2003) *No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 12: 1016–1022.
- Møller, P., Viscovich, M.; Lykkesfeldt, J.; Loft, S.; Jensen, A. y Poulsen, H.E. (2004a) *Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers*. Eur. J. Nutr. 43: 267–274.
- Møller, P.; Loft, S.; Alfthan, G. y Freese, R. (2004b) *Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink*, Mutat. Res. 551: 119–126.
- Møller P. y Loft, S. (2004c) *Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair*. Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 551: 79–89.
- Møller, P. y Loft, S. (2006) *Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA*. Free Radic. Biol. Med. 41: 388–415.
- Monroy, C.M.; Cortés, A.C.; Sicard, D.M. y Groot de Restrepo, H. (2005). *Citotoxicidad y genotoxicidad en células humana expuestas in vitro a glifosato*. Biomédica 25: 335-345
- Montenegro Surís, A. (2003) *Política para la obtención y documentación del consentimiento informado*. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. La Habana. Cuba.

- Morris, B.; Blair, A.; Gibson, R.; Everett, G.; Cantor, K. y Schuman, L. (1990) *Pesticide exposures and agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota*. Cancer Res. 50: 6585-6591.
- Muniz, J.F.; McCauley, L.; Scherer, J.; Lasarev, M.; Koshy, M.; Kow, Y.W.; Nazar-Stewart, V. y Kisby, G.E. (2008). *Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study*. Toxicology and Applied Pharmacology. 227: 97–107.
- Muñoz R. (2010). *Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno, campaña 2010 INTA* Publicación Miscelánea 116: 79-86.
- Murgia, E.; Ballardín, M.; Bonassi, E.; Rossi, A.M. y Barale, R. (2008) *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 639, 1-2: 27-34
- Muscat, J.E. (1996) *Epidemiological reasoning and biological rationale*. Biomarkers. 1: 144-145.
- Nasuti, C.; Cantalamessa, F.; Falcioni, G. y Gabbianelli, R. (2003). *Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats*. Toxicology. 191: 233-244.
- Nicholas, A.H.; Vienne, M. y van den Berghe, H. (1979) *Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorus insecticide: malathion*. Mutat. Res. 67: 167–172.
- Nogueira, C. W.; Zeni, G. y Rocha, J.B.T. (2004). *Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology*. Chem. Rev. 104: 6255–6285.
- OEHHA (2002) *Guidelines for physicians who supervise workers exposed to cholinesterase-inhibiting pesticides. Fourth edition. Office of Environmental Health Hazard Assessment*. California Environmental Protection Agency.
- Oluwole, O. y Cheke, R.A. (2009). *Health and environmental impacts of pesticide use practices: a case study of farmers in Ekiti State, Nigeria*. Int. J. Agr. Sustain. 7: 153- 163.

- OMS (2009). *Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification*. World Health Organization, Geneva. ([http://www.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazards/en](http://www.int/ipcs/publications/pesticides_hazards/en))
- Padmavathi, P.; Prabhavathi, P.A. y Reddy, P.P. (2000) *Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers*. Bull Environ Contam Toxicol. 64: 155–160.
- Palacios Nava, M.E. (2003) *Aplicación de un instrumento para evaluar exposición a plaguicidas órganofosforados, efectos agudos y subagudos en la salud de trabajadores agrícolas*. Rev. Fac. Med. UNAM. 46,1: 22-27.
- Palus, J.; Dziubaltowska, E. y Rydzynski, K. (1999). *DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers furniture plant*. Mutat. Res. 444: 61-74.
- Panemangalore, M.; Dowla, H.A. y Byers, M.E. (1999). *Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers*. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 72: 84-88.
- Pastor, S.; Gutierrez, S.; Creus, A.; Cebulska-Wasilewska, A. y Marcos R. (2001a). *Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides*. Mutat. Res. 495:147–156.
- Pastor, S.; Gutierrez, S.; Creus, A.; Xamena, N.; Piperakis, S. y Marcos R. (2001b). *Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells*. Mutagenesis. 16: 539–545.
- Pastor, S.; Creus, A.; Xamena, N.; Siffel, C. y Marcos, R. (2002). *Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells*. Environ. Mol. Mutagen. 40: 101–109.
- Paunero, I.E.; Mitidieri, M.; Ferratto, J.; Giuliani, S.; Bulacio, L.; Panelo, M.; Amoia, P.; Strassera, M.E.; Granitto, G.; del Pino, M., Martínez, S., Fortunato, N.; Tangorra, M.; Andreau, R.; Garbi, M. y Martínez-Quintana, O. (2009). *Identifying the primary types of accidents that occur to horticultural workers in Argentina*. Agricultura, Sociedad y Desarrollo. 6, 2: 177-182.

- Paz-y-Miño, C.; Bustamante, G.; Sánchez, M.E. y Leone, P.E. (2002). *Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador*. Environ. Health Perspect. 110: 1077–1080.
- Paz-y-Miño, C.; Arévalo, M.; Sanchez, M.E. y Leone, P. (2004) *Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador*. Mutation Research. 562: 77–89.
- Paz-y-Miño, C.; Sánchez, M.E.; Arévalo, M.; Muñoz, M.J.; Witte, T., Oleas De-la-Carrera, G. y Leone, P.E. (2007) *Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate*. Genetics and Molecular Biology. 30. 2: 456-460.
- Peedicayil, J.; Ernest, K.; Thomas, M.; Kanagasabapathy, A.S. y Stephen, P.M. (1991) *The effect of organophosphorus compounds on serum pseudocholinesterase levels in a group of industrial workers*. Hum Exp Toxicol. 10: 275-278.
- Perkins, E. y Schlenk, D. (2000) *Acetylcholinesterase Inhibition, Metabolism, and Toxicokinetics of Aldicarb in Channel Catfish: Role of Biotransformation in Acute Toxicity*. Toxicological Sciences. 53: 308–315.
- Perry, M.J.; Marbella, A. y Layde, P.M. (2000). *Association of pesticide safety knowledge with beliefs and intentions among farm pesticide applicators*. J Occup Environ Med. 42: 187-193.
- Perry, M.J. y Layde, P.M. (2003). *Farm pesticides: outcomes of a randomized controlled intervention to reduce risks*. Am J Prev Med. 24: 310-315.
- Pieniasek, D.; Bukowska, B. y Duda, W. (2004). *Comparison of the effect of roundup ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 79: 58–63.
- Piesová, E. (2005) *The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes in vitro*. Acta Veterinaria (beograd) 55: 101-109.
- Pinhal, D.; Gontijo, A. M.; Reyes V. A. y Salvadori, D. M. (2006) *Viable human buccal mucosa cells do not yield typical nucleoids: impacts on the single cell gel electrophoresis/Comet assay*. Environ. Molec. Mutagen. 47: 117–126.



- Piperakis, S.M.; Petrakou, E.; Tsilimigaki, S.; Sagnou, M.; Monogiudis, E.; Haniotakis, G.; Karkaseli, H. y Sarikaki, E. (2003). *Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides*. Environ. Mol. Mutagen. 41: 104–110.
- Piperakis, S.M.; Kontogianni, K., Piperakis, M.M. y Tsilimigaki, S. (2006). *Effects of Pesticides on Occupationally Exposed Humans*. The Scientific World Journal. 6: 1211-1220.
- Piperakis, S.M.; Kontogianni, K.; Karanastasi, G.; Iakovidou-Kritsi, Z.; Cebulska-Wasilewska, A. y Piperakis, M.M. (2009). *Investigation of the Genotoxic Effect of Pesticides on Greenhouse Workers' Lymphocytes* Environmental and Molecular Mutagenesis 50: 121-126.
- Plianbangchang, P.; Jetiyanon, K. y Wittaya-areekul, S. (2009). *Pesticide use patterns among small-scale farmers: A case study from Phitsanulok, Thailand*. SE Asian J. Trop. Med. Public Health. 40: 401-410.
- Poletta, G.L.; Larriera, A.; Siroski, P.; Kleinsorge, E. y Mudry, M.D. (2010) *Integral approach of Glyphosate-induced alterations in a South American caiman species*, en: Piotrowski, K.D. (Ed.) "Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards", Nova Science Publishers, New York, USA. En prensa.
- Pool-Zobel, B.L.; Bub, A.; Muller, H.; Wollowski, I. y Rechkemmer, G. (1997) *Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods*. Carcinogenesis. 18: 1847–1850.
- Pool-Zobel, B. L.; Dornacher, I.; Lambertz, R.; Knoll, M. y Seitz, H.K. (2004) *Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes*. Mutat. Res. 551: 127–34.
- Porcel de Peralta, M.S.; Scagnetti, J.A.; Kleinsorge, E.C. y Simoniello, M.F. *Polimorfismos genéticos de GSTM1 y GSTT1 en trabajadores expuestos a mezclas de pesticidas: influencia en el nivel de daño al ADN. GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms in workers occupationally exposed to pesticide mixtures: influence in DNA damage level*. XIV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis Y Teratogénesis Ambiental (ALAMCTA), XLIII Congreso de la Sociedad de Genética de Chile (SOCHIGEN), XXXIX Congreso de la Sociedad Argentina

de Genética (SAG). Memorias del Congreso: p.135. Viña del Mar, Chile, 1 al 5 de Octubre de 2010.

Porrini, M. y Riso, P. (2000) *Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption*. J. Nutr. 130: 189–192.

Prasanthi, K.; Muralidhara y Rajini, P.S. (2005). *Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite*. Toxicol. in Vitro. 19: 449–456

Propersi, P. (2006). *Persistencia y cambio de las unidades de producción hortícola en el cinturón verde del Gran Rosario*. Mundo agrario. Revista de estudios rurales, 7, 13, segundo semestre. [http://163.10.30.203:8080/mundo\\_agrario/numeros/folder.2006-11-22.5328005731/propersi](http://163.10.30.203:8080/mundo_agrario/numeros/folder.2006-11-22.5328005731/propersi) (Junio 2008).

Propersi, P.; Albanesi, R.; Burzacca, L.; Carrancio, L.y Duré, L. (2008). *Discriminación y salud en el sector rural: condiciones laborales de la población del cinturón verde del Gran Rosario*. V Semana Argentina de la Salud y Seguridad en el Trabajo. 28 al 30 de abril, ciudad de Buenos Aires. [http://www.srt.gov.ar/super/eventos/Semana2008/disertaciones/Martes29/1750/6\\_UNR.pdf](http://www.srt.gov.ar/super/eventos/Semana2008/disertaciones/Martes29/1750/6_UNR.pdf) (Junio 2008).

Quandt, S.A.; Arcury, T.A.; Austin, C.K. y Saavedra, R. (1998). *Farmworker and farmer perceptions of farmworker agricultural chemical exposure in North Carolina*. Hum Organ. 57: 359-368.

Quandt, S.A.; Arcury, T.A.; Austin, C.K. y Cabrera, L.F. (2001). *Preventing occupational exposure to pesticides: using participatory research with Latino farmworkers to develop an intervention*. J Immigr Health. 3: 85-96.

Quandt, S.A.; Arcury, T.A.; Mellen, B.G.; Rao, P.; Camann, D.E. y Doran, A.M. (2002). *Pesticides in wipes from farmworker residences in North Carolina*. In: Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterrey, CA (Levin H, ed). Santa Cruz, CA:Indoor Air. 900-905.

Quandt, S.A.; Arcury, T.A.; Rao, P.; Snively, B.M.; Camann, D.E. y Doran, A.M. (2004). *Agricultural and residential pesticides in wipe samples from farmworker family residences in North Carolina* Environ Health Perspect 112:382–387.

- Quinlan, M.; Mayhew, C. y Bohle, P. (2001). *The global expansion of precarious employment, work disorganization, and consequences for occupational health: placing the debate in a comparative historical context*. Int J Health Serv. 31: 507-536.
- Quintana, J.; Martí, I. y Ventura, F. (2001). *Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results*. J Chromatogr A. 938(1-2):3-13.
- Rahman, M.F.; Mahboob, M.; Danadevi, K.; Saleha Banu, B. y Grover, P. (2002) *Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes* Mutation Research 516: 139–147.
- Rajapakse, N.; Ong, D. y Kortenkamp, A. (2001). *Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens*. Toxicol Sci. 60: 296–304.
- Rana, S.V.S.; Allen, T. y Singh, R. (2002) *Inevitable glutathione, then and now*. Indian J. Expt. Iol. 40: 706–716.
- Ranjbar, A.; Pasalar, P. y Abdollahi, M. (2002). *Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers*. Hum. Exp. Toxicol. 21: 179-82.
- Rastogi, S.K.; Singh, V.K.; Kesavachandran, C.; Jyoti, M.K.; Siddqui, M.K.J.; Mathur, N. y Bharti, R.S. (2008) *Monitoring of plasma Butyrylcholinesterase and Hematological parameters in pesticide sprayers*. Indian Journal of Occupational and environmental medicine. 12,1: 29-32.
- Rastogi, S.K.; Satyanarayan, P.; Ravishankar, D. y Tripathi, S. (2009) *A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying*. Indian J Occup Environ Med.13, 3: 131-134.
- Rehman, H.; Ali, M.; Atif, F.; Kaur, M.; Bhatia, K. y Raisuddin, S. (2006) *The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice*. Clinica Chimica Acta. 369, 1: 61-65
- Remor, A.P.; Totti, C.C.; Moreira, D.A.; Dutra, G.P.; Heuser, V.D. y Boeira, J.M. (2009) *Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity*. Environ Int. 35, 2: 273-278.

- Repetto, M.; Martínez, D. y Sanz, P. (1995) *Actualización de la toxicología de los plaguicidas*. En: Repetto M. *Toxicología avanzada*. Editorial Díaz Santos. Madrid. 557-600.
- Repetto, R.C. y Baliga, S.S. (1996) *Pesticides and the Immune System: The Public Health Risks*. Washington, DC: World Resources Institute.
- Richter, D.E.; Chuwers, P.; Levy, P.; Gordon, M.; Grauer, F. y Marzouk, J. (1992) *Health effects from exposure to organophosphate pesticide in workers and residents in Israel*. *Isr J Med Sci*. 28: 594-598.
- Ringuelet, R., y J. Laguens. (2000). *Notas sobre el uso de agroquímicos. Espacio tecnológico, población y reproducción social en el sector hortícola de La Plata*. Ed. Universidad Nacional de La Plata.
- Rodríguez Perón, J.M.; Menéndez López, J.R. y Trujillo López, Y. (2001) *Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo*. *Rev Cubana Med Milit*. 30,1: 36-44.
- Rodriguez, A.R. y Lenardon, A.L. (2007). *Provincia Santa Fe Sur, In: La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente*. Estudio colaborativo multicéntrico. Ministerio de Salud. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable: OPS: AAMMA, 247-268, ISBN 978-987-96256-7-5, Buenos Aires.
- Rojas E.; Valverde, M.; Sordo M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996) *DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single-cell gel electrophoresis assay*. *Mutat. Res*. 370: 115–20.
- Rojas, E.; Valverde, M.; Lopez, M.C.; Naufal, I.; Sanchez, I.; Bizarro, P.; Lopez, I.; Fortoul T. I y Ostrosky-Wegman P. (2000) *Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single-cell gel electrophoresis assay*. *Mutat. Res*. 468: 11–17.
- Rose, R.L.; Hodgson, E. y Roe, R.M. (1999) *Pesticides*. Chapter 28. In *Toxicology* Edited by Marquardt, H., Schafer, S.G., McClellan, R.O., Welsch, F. Publisher: Academic Press Inc ISBN: 0124732704

- Rupa, D.S.; Reddy, P.P. y Reddi, O.S. (1989) *Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides*. Environ Res. 49: 1-6.
- Ryter, S. y Tyrrel, R. (1998) *Singlet molecular oxygen: A possible effector of eukaryotic gene expression*. Free Rad Biol Med. 24: 1520-34.
- Sailaja, N.; Chandrasekhar, M.; Rekhadevi, P.V.; Mahbood, M.; Rahman, M.F.; Vuyyuri, S.B.; Danadevi, K.; Hussain, S.A. y Grover P. (2006). *Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production*. Mutat. Res. 609: 74-80.
- Salazar, M.K.; Napolitano, M.; Scherer, J.A.; McCauley, L.A. (2004). *Hispanic adolescent farmworkers' perceptions associated with pesticide exposure*. West J Nurs Res. 26: 146-166.
- Salvadori, D.M.; Eibero, L.R.; Pereira, C.A. y Becak, W. (1988) *Cytogenetic effects of malathion on somatic and germ cells of mice*. Mutat. Res. 204: 283–287.
- Scarpato, R.; Migliore, L.; Angotzi, G.; Fedi, A.; Miligi, L. y Loprieno, N. (1996). *Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure*. Mutat. Res. 367: 73–82.
- Schatzkin, A.; Freedman, L.S.; Schiffman, M.H. y Dawsey, S.J. (1990) *Validation of intermediate endpoints in cancer research*. JNCI, 82: 1746- 1752.
- Schmid, W. (1975). *The micronucleus test*. Mutat. Res. 31: 9–15.
- Schulte, P.A. y Perera, F.P. (1993) *Validation*. In: Schulte PA & Perera FP ed. *Molecular epidemiology: principles and practices*, San Diego, CA, Academic Press, pp 79-107.
- Seed, J.; Brown, R.P.; Olin, S.S. y Foran, J. A. (1995) *Chemical Mixtures: Current Risk Assessment Methodologies and Future Directions*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 22, 1: 76-94.
- SENASA (2003) *Resolución SENASA N° 256/2003*. [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar). Actualización Abril 2008
- Sergerie, M.; Bleau, G.; Teule, R.; Daudin, M. y Bujan, L. (2005) *Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility*. Gynecol. Obstet. Fertil. 33: 89–101.
- Seth, V.; Banerjee, B.D. y Chakravorty, A.K. (2001). *Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to Propoxur*. Pest. Biochem. Phys. 71: 133-139.

- Sexton, K. y Hattis, D. (2006). *Assessing Cumulative Health Risks from Exposure to Environmental Mixtures Three Fundamental Questions*. Environ Health Perspect. 115: 825–832.
- Shadnia, S.; Azizi, E.; Hosseinil, R.; Khoei, S.; Fouladdel, S.; Pajoumand, A.; Jalali, N. y Abdollahi, M. (2005) *Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators*. Hum.Exp. Toxicol. 24: 439- 445.
- SI.NA.V.E. (2003). <http://www.deis.gov.ar>
- Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Grigolato, R.A.; Poletta, G.L. y Carballo, M.A. (2008) *DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures*. J. Appl. Toxicol. 28, 8: 957-965.
- Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Mastandrea, C.; Grigolato, R.A.; Paonessa, A.M. y Carballo, M.A. (2010). *Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population*. Biomarkers. 15, 1: 52-60.
- Singh, A. (1986) *Kinetic analysis of acetylcholinesterase inhibition by combinations of acephate and methamidophos*. Toxicology 15: 143-156.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells*. Exp. Cell. Res. 175, 1: 184-191.
- Singh, N.P.; Danner, D. B.; Tice, R. R.; Brant, L. y Schneider, E. L. (1990) *DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes*. Mutat. Res. 237: 123–130.
- Singh, N.P. y Khan, A. (1995). *Acetaldehyde: genotoxicity and citotoxicity in human lymphocytes*. Mutat. Res. 337: 9-17.
- Singh, V.K.; Jyoti; Krishna Reddy, M.M.; Kesavachandran, C.; Rastogi, S.K. y Siddiqui, M.K.J. (2007). *Biomonitoring of organochlorines, glutathione, lipid peroxidation and cholinesterase activity among pesticide sprayers in mango orchards*. Clin. Chim. Acta. 377: 268–272.
- SINITOX (2003). *Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana e Envenenamento*. Brasil, Rio de Janeiro: SINITOX.

Disponible en internet: <http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/umanalise2003.htm> [Acceso el 30/04/2007]

Sivapiriya, V.; Jayanthi Sakthisekaran y Venkatraman, S. (2006) *Effects of dimethoate (O,O-dimethyl S-methyl carbamoyl methyl phosphorodithioate) and Ethanol in antioxidant status of liver and kidney of experimental mice*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 85, 2: 115-121

Šiviková, K. y Dianovský, J. (2006) *Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes*. Inter. J. Hyg. Environm. Health. 209: 15-20.

Soares, W.; Almeida, R.M.V.R. y Moro, S. (2003). *Rural work and risk factors associated with pesticide use in Minas Gerais, Brazil*. Cad. Saúde Pública. 19: 1117-1127.

Soloneski, S.M; González, M.; Piaggio, E.; Apezteguía, M., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2001) *Effect of the dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed in vitro*. Mutagenesis 16, 6:487-93.

Soloneski, S.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2002a) *Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. II. micronucleus induction in immunophenotyped human lymphocytes*. Environmental and molecular mutagenesis 40, 1: 57-62,

Soloneski, S.; González, M.; Piaggio, E.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2002b) *Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells*. Mutat Res. 514,1-2:201-12.

Soloneski, S.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2003) *Vitamin E prevents ethylene bis(dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells*. Mutagenesis. 18, 6:505-510.

Soloneski, S.; González, N.V.; Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2007) *Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes*. Cell biology international. 31, 11: 1316-22.

Sosan, M.B. y Akingbohunge, A.E. (2009). *Occupational insecticide exposure and perception of safety measures among cacao farmers in southwestern Nigeria*. Arch. Environ. Occup. Health. 64: 185-193.

Souza-Casadinho, J. (2003). *Intoxicaciones con plaguicidas: un intento de interpretación desde la perspectiva de los campos sociales*. 6° Congreso Nacional de Estudios del Trabajo. Los trabajadores y el trabajo en la crisis. <http://www.aset.org.ar/congresos/6/archivosPDF/grupoTematico09/006.pdf> (Junio 2008).

Souza-Casadinho, J. (2007). *Región zona hortícola bonaerense*. En: La problemática del uso de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y sus envases. Estudio colaborativo multicentrico. Ministerio de salud de la Nación. Buenos Aires. Argentina.

Souza-Casadinho, J. y Bocero, S. (2008). *Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina)*. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica. 9: 87-101.

Spontón, J.L.; Ugolini, J.; Viotti, V.; Gonzalez Kees, E.; Perotti, R.; Ciancio, H.; Tanino, L.M.; Tavernier, F.; Baroni, E.; Alvarez, H.; Meinardi, C.; Lopez Anido, F; Damen D, y Mosconi, F.P. (2004) *El avance de la soja en la Argentina y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas*. Documento Institucional del Consejo del Centro Regional Santa Fe del INTA.

Staruchova, A.; Horska, L.; Wsolova, A. y Kocan, A. (2004) *Genotoxic effects of asbestos in humans*. Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech.Mutagen. 553: 91–102.

Staruchova, M.; Collins, A.R.; Volkovova, K.; Mislanova, C.; Kovacikova, Z.; Tulinska, J.; Kocan, A.; Staruch, L.; Wsolova, L. y Dusinska, M. (2008) *Occupational exposure to mineral fibres. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defence and associations with DNA damage and repair*. Mutagenesis 23, 4: 249–260.

Stich, H.F. y Rosin, M.P. (1983) *Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells*. Int. J. Cancer 31: 305–308.

Stokes, L.; Stark, A.; Marshall, E. y Narang, A. (1995) *Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates*. Occup Environ Med. 52: 648-653.



- Suke, S.G., Ahmed, R.S., Pathak, R., Tripathi, A.K. y Banerjee, B.D. (2008) *Attenuation of phosphamidon-induced oxidative stress and immune dysfunction in rats treated with N-acetylcysteine*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 41: 765-768.
- Szeto, Y. T.; Benzie, I. F.; Collins, A. R.; Choi, S. W.; Cheng, C. Y.; Yow C. M. y Tse, M. M. (2005) *A buccal cell model Comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies*. Mutat. Res. 578: 371–81.
- Thomas, R.S.; Rank, D.R.; Penn, S.G.; Zastrow, G.M.; Hayes, K.R. y Hu, T. (2002). *Application of genomics to toxicological research*. Environ Health Perspect. 110,6: 919–923.
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.-C. y Sasaki. Y. F. (2000). *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*. Environ. and Molecular Mutagenesis. 35: 206–221.
- Titenko-Holland, N.; Windham, G.; Kolachana, P.; Reinisch, F.; Parvatham, S.; Osorio, A.M. y Smith, M.T. (1997). *Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers*. Mutat. Res. 338: 85-95.
- Titenko-Holland, N.; Jacob, R.A.; Shang, N.; Balaraman, A. y Smith, M.T. (1998) *Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate*. Mutat. Res. 417: 101–114.
- Toraason, M.; Albertini, R.; Bayard, S.; Bigbee, W.; Blair, A.; Boffetta, P. (2004). *Applying new biotechnologies to the study of occupational cancer a workshop summary*. Environ Health Perspect. 112: 413–416.
- Tuluçe, Y. y Celik, I. (2006) *Influence of subacute and subchronic treatment of abscisic acid and gibberellic acid on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats* Pesticide Biochemistry and Physiology 86: 85–92.
- U.S. EPA (1988) *Dichlorvos: Initiation of special review*. Fed. Regist. 53: 5542-49.
- U.S. EPA. (2000). *Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures*. EPA 630-R-00-002. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

- U.S. EPA. (2003). *Framework for Cumulative Risk Assessment*. EPA/600/P-02/001F. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M.T.D.; Mazura, M. y Telser, J. (2007). *Review Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Intern. J. Biochem. Cell Biology. 39: 44–84.
- Valverde, M. y Rojas E. (2009). *The Comet Assay in Human Biomonitoring. Chapter 10, In: The Comet Assay in Toxicology*, Dhawan, A. & Anderson (Ed.), D., 57-78, RSC Publishing, ISBN 978-0-85404-199-2, Cambridge, U.K.
- Van Konijnenburg, A.; Lascano, O. y Santagni, A. (2010) *Horticultura*. Publicaciones INTA, Fruticultura y Diversificación. 63: 6-7.
- Varona, M.; Cárdenas, O.; Crane, C.; Rocha, S.; Cuervo, G. y Vargas, J. (2003) *Alteraciones citogenéticas en trabajadoras con riesgo ocupacional de exposición a plaguicidas en cultivos de flores en Bogotá / Cytogenetic alterations in field workers routinely exposed to pesticides in Bogotá flower farms*. Biomédica (Bogotá). 23,2: 141-152.
- Vaughan, E. (1993). *Chronic exposure to an environmental hazard: risk perceptions and self-protective behavior*. Health Psychol. 12:74-85.
- Venturino, A.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; Cocca, C.; Bergoc, R.M. y Pechen de D'Angelo AM (2001) *Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad Bufo arenarum*. Comp. Biochem. Phys. C. 130: 191-198.
- Verma, R.S.; Mehta, A. y Srivastava, N. (2007) *In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 88: 191–196.
- Vigliola, M. I. (1991). *Manual de horticultura, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. Primera edición: 1986. 1991:5-6.
- Vodicka, P.; Tuimala, J.; Stetina, R.; Kumar, R.; Manini, P.; Naccarati, A.; Maestri, L.; Vodickova, L.; Kuricova, M.; Jarventaus, H.; Majvaldova, Z.; Hirvonen, A.; Imbriani, M.; Mutti, A.; Migliore, L.; Norppa, H. y Hemminki, K. (2004) *Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers*. Environ. Health Perspect. 112: 867–871.

- Welshons, W.; Thayer, K.A.; Judy, B.M.; Taylor, J.A.; Curran, E.M. y vom Saal, F.S. (2003) *Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity*. Environ Health Perspect. 111: 994–1006
- Wessels, D.; Barr, D.B. y Mendola, P. (2003). *Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health*. Environ Health Perspect. 111: 1939–1946.
- Williams, G.M.; Kroes, R. y Munro, I.C. (2000). *Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 31: 117–165.
- Yang, R.S.H. (1994) *Introduction to the toxicology of chemical mixtures*. In: Toxicology of Chemical Mixtures: Case Studies, Mechanisms, and Novel Approaches (Yang RSH, ed). San Diego, CA: Academic Press:1-10.
- Yang, Z.P.; Morrow Jwu, A.; Roberts, L.J. y Dettbarn, W.D. (1996) *Diisopropylphosphorofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation in vivo*. Biochem Pharmacol. 52: 357-61.
- Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K., Huang, J.C., Wang, L.H., Wu, S.H., Hou, L.A., Ma, H. y Tsai, L.Y. (2005) *Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer*. Clin. Chem. Acta. 361: 104–111.
- Young, J.T.; Szabo, J.R.; Grandjean, M. (1990) *Chlorpyrifos: subchronic dietary toxicity/oncogenicity study in Fischer-344 rat*. Toxicologist 10: 344.
- Yu, B.P. (1994) *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol. Rev. 74: 139–162.

# **ANEXO I**

ENCUESTA TRABAJADORES Y APLICADORES CULTIVOS INTENSIVOS. FBCB - UNL							
<b>N° de Caso</b>		<b>Fecha</b>	/ /	<b>Telefono</b>			
<b>Lugar</b>							
Datos Personales (alfanuméricos)							
<b>Últimos 5 NUM. DNI</b>				<b>Edad (años)</b>			
<b>Domicilio</b>				<b>Sexo</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	
				<b>Tiempo Residencia (años)</b>			
Socio-Cultural (marcar con x)							
<b>Educación</b>	Primaria	Secundaria		<b>Vivienda</b>		<b>Sanitarios</b>	
Completa				Material		Completo	
Incompleta				Precaria		Precario	
Hábitos-Salud (marcar con x)							
<b>Fuma</b>	Si	No		<b>Alcohol</b>	Si	No	
<b>Concurre a Hospital-SAMCO</b>	Si	No		<b>Medicación</b>	Si	No	
<b>Acceso a Obra Social</b>	Si	No		<b>Enfermó por fumigar</b>		Si	No
Agua (marcar con x)							
<b>Agua</b>	de Pozo	de Aljibe	de Red				
<b>Instalación de Agua</b>	Si	No					
Trabajo Actual (numéricos)							
<b>Jornada Laboral</b>	Horario	8 horas	mas de 8 horas	<b>Frecuencia Semanal</b>			
<b>Antigüedad (años)</b>				<b>Frecuencia Estacional</b>			
Otros Trabajos Anteriores (alfanuméricos)							
<b>Tipo</b>				<b>Duración</b>			
SOLO SI TRABAJA EN EL CAMPO (Expuesto Indirecto; marcar con x)							
<b>Tipo de trabajo</b>	Prepara terreno	Cosecha	Empacado	Transporte	Otro	<b>Usa EPP</b>	
Siempre						SI	
Temporal						NO	
SOLO SI TRABAJA EN FUMIGACIÓN (Expuesto Directo; marcar con x y alfanuméricos)							
<b>Fumiga</b>				<b>Prepara</b>	SI	NO	
<b>Mochila</b>	SI	NO		<b>Lava equipo</b>	SI	NO	
<b>Arrastre</b>	SI	NO					
<b>Banderillero</b>	SI	NO					
<b>Mosquito</b>	SI	NO					
<b>Otro Equipo</b>							
<b>Conoce los productos que usa en la fumigación</b>				SI	NO		
<b>Puede dar el nombre de alguno</b>							
<b>Los productos se guardan</b>	En depósito especial			En la vivienda		En ambos	
<b>EPP en deposito</b>	SI			NO			
<b>Usa alguna protección cuando fumiga</b>						<b>Fumigó hace</b>	
Ropa	SI			NO		1 semana	
Botas	SI			NO		2 semanas	
Guantes	SI			NO		1 mes	
Antiparra	SI			NO			
Mascarilla	SI			NO			
Sombrero	SI			NO			
	<b>Acepto el contenido:</b>						

ENCUESTA APLICADORES CULTIVOS EXTENSIVOS. FCB - UNL									
<b>N° de Caso</b>		<b>Fecha</b>	/ /	<b>Telefono</b>					
<b>Lugar</b>									
<b>Datos Personales (alfanuméricos)</b>									
<b>Últimos 5 NUM. DNI</b>				<b>Edad (años)</b>					
<b>Domicilio</b>				<b>Tiempo Residencia (años)</b>					
<b>Socio-Cultural (marcar con x)</b>									
<b>Educación</b>	Primaria	Secundaria		<b>Vivienda</b>					
Completa				Material					
Incompleta				Precaria					
<b>Hábitos-Salud</b>									
<b>Fuma</b>	Si	No		<b>Alcohol</b>	Si	No			
<b>Concurre a Hospital-SAMCo</b>	Si	No		<b>Medicación</b>	Si	No	Nombre		
<b>Acceso a Obra Social</b>	Si	No		<b>Enfermó por fumigar</b>	Si	No			
<b>Alimentación</b>									
<b>Agua</b>	de Pozo	de Aljibe	de Red						
<b>Carbohidratos</b>	Vegetales	Frutas	Pan/Dulces	<b>Proteínas</b>	Carnes	Lacteos	Huevos		
Ingesta sem				Ingesta sem					
<b>Trabajo Actual</b>									
<b>Jornada Laboral</b>		8 horas	mas de 8 horas		<b>Frecuencia Semanal</b>				
Horario					<b>Frecuencia Estacional</b>				
<b>Antigüedad (años)</b>									
<b>Otros Trabajos Anteriores</b>									
<b>Tipo</b>				<b>Duración</b>					
<b>SOLO SI TRABAJA EN EL CAMPO (Expuesto Directo)</b>									
<b>Tipo de trabajo con plaguicidas</b>		Cultivo	Transporte	Fumigación	Otro				
	Siempre								
	Temporal								
<b>SOLO SI TRABAJA EN FUMIGACIÓN (Expuesto Directo)</b>									
<b>Fumiga</b>				<b>Prepara</b>	SI	NO			
Avión	SI	NO		<b>Transporta</b>	SI	NO			
Mosquito	SI	NO		<b>Repara</b>	SI	NO			
Arrastre	SI	NO		<b>Lava equipo</b>	SI	NO			
Banderillero	SI	NO							
Mochila	SI	NO							
Otro Equipo									
<b>Conoce los productos que usa en la fumigación</b>				SI	NO				
<b>Puede dar el nombre de alguno</b>									
<b>Los productos se guardan</b>	En depósito especial			En la vivienda			En ambos		
<b>EPP en deposito</b>	SI	NO							
<b>Usa alguna protección cuando fumiga</b>							<b>Fumigó hace</b>		
Ropa		SI	NO				1 semana		
Botas		SI	NO				2 semanas		
Güantes		SI	NO				1 mes		
Antiparra		SI	NO						
Mascarilla		SI	NO						
Sombrero		SI	NO						
				<b>Acepto el contenido:</b>					



## **ANEXO II**



## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1) Título del Estudio: Exposición ocupacional a los agroquímicos.

Evaluación del Daño Genético y su relación con Procesos de Estrés Oxidativo.

2) **Consentimiento informado Fecha:**.....

3) **Introducción:**

Lo invitamos a participar en forma voluntaria del presente estudio realizado por la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioq. Legal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) y el laboratorio de Citogenética Humana y Genética Toxicológica, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, (UBA) bajo la Dirección y co-dirección de Prof. Dra. Marta A. Carballo y Prof. Bioq. Elisa C. Kleinsorge.

4) **Justificación y Objetivos de la Investigación:**

El objetivo de este trabajo es utilizar un conjunto de marcadores bioquímicos y genéticos en un grupo de trabajadores expuestos a plaguicidas en los cultivos de la región Centro-Norte de la provincia de Santa Fe y de personas que no de la misma zona pero que no trabajen en contacto con los plaguicidas. Con el fin de evaluar los posibles mecanismos involucrados en su toxicidad y su relación con aspectos laborales de la población en estudio.

5) **Metodología empleada**

- a. Se desea que la población muestreada sea de ambos sexos, con una edad comprendida entre 18 y 55 años.



- b. La participación tendrá una duración de 5 minutos para la toma de muestra y 20 minutos para la respuesta a una encuesta.
- c. El estudio no requiere de aleatorización ni cegamiento

#### **6) Tratamientos que pueden ser administrados en el estudio:**

Durante el estudio no se administrará ninguna sustancia ni fármaco. Solo se le pedirá un enjuague de la boca con agua potable.

#### **7) Procedimientos y su propósito:**

- Entrevista: Se realizará una entrevista, previa asignación de un código alfa numérico en la que se consignarán edad, sexo y hábitos de fumar y consumir bebidas alcohólicas, datos de la vivienda, educación, salud y aspectos laborales.
- Muestras para el laboratorio: Se obtendrá sangre por punción venosa y células bucales por cepillado de la cara interna de ambas mejillas. El material será conservado en tubos preparados especialmente y marcados con código alfa numérico y serán refrigerados hasta su procesamiento.
- Concluido el estudio las muestras serán destruidas en un plazo no mayor a 30 días.
- No se harán estudios posteriores las muestras.
- Si por motivos personales o religiosos el invitado no acepta participar, no será incluido ya que es absolutamente voluntario.
- Los participantes no serán informados de los resultados ya que es un estudio preclínico para obtener valores poblacionales.

#### **8) Incomodidades y riesgos derivados del estudio:**

El participante no sufrirá ningún riesgo o molestia predecible resultante de su participación en la investigación.

#### **9) Beneficios derivados del estudio:**

No existen beneficios personales por la participación en este estudio, pero si beneficios para la sociedad en cuanto al cuidado de la salud.

## **10) Costos y Pagos a realizarse para el estudio**

Todos los materiales para la obtención de las muestras serán proporcionados gratuitamente al donante. No habrá compensación económica por la participación en el estudio

## **11) Privacidad y Confidencialidad**

Toda la información y resultados que se obtengan del presente estudio serán resguardados en soporte magnético y de acuerdo a las normas establecidas por el Comité de Ética del Hospital José María Cullen. Solo tendrá acceso al mismo el equipo de investigación y el Comité de Ética.

## **12) Participación voluntaria y Retiro del Estudio**

Carácter voluntario de su participación, así como posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que ello le acarree una sanción o la pérdida de sus beneficios que tendría derecho a recibir como trabajador.

## **13) Contactos para responder cualquier duda o pregunta y en caso de ser necesario**

- a. Investigador Dra. CARBALLO, Marta A.

Dirección: Laboratorio de Citogenética Humana y Genética Toxicológica,  
Depto Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires.

Teléfono: 011-59508707

Correo electrónico: [macarballo@ffyb.uba.ar](mailto:macarballo@ffyb.uba.ar)

- b. Investigador Bioq. KLEINSORGE, Elisa C.

Dirección: Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal,  
FBCB, CU, Universidad Nacional del Litoral.

Santa Fe

Correo electrónico: [ekaczan@fcb.unl.edu.ar](mailto:ekaczan@fcb.unl.edu.ar)

Teléfono: 0342-4575216 int.155

**14) Proporcionar información sobre el manejo de los resultados al finalizar el ensayo clínico**

Los resultados del presente estudio podrán ser publicados en revistas y eventos científicos, pero en ningún momento se darán a conocer datos personales de los participantes.

**Título del estudio:**

**Exposición ocupacional a los agroquímicos.**

**Evaluación del Daño Genético y su relación con Procesos de Estrés  
Oxidativo.**

**Yo ..... (Nº DNI).....**

**He leído la hoja de información que se me ha entregado.**

**He podido hacer preguntas sobre el estudio.**

**He recibido suficiente información verbal y escrita sobre el estudio.**

**He hablado con..... (Nombre del investigador)**

**Comprendo que mi participación es voluntaria.**

**Comprendo que puedo retirarme del estudio:**

- 1. Cuando quiera**
- 2. Sin tener que dar explicaciones**

**Presto libremente mi conformidad para participar en el ensayo**

**Fecha y hora.....**

**Firma del participante.....**

**Nombre en imprenta del participante .....**

**Le he explicado este proyecto al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él comprende la información descrita en este documento y accede a participar en forma voluntaria.**

**Fecha y hora (la misma fecha cuando firma el participante) .....**

**Firma del Investigador/a.....**

**Nombre del Investigador/a.....**