

## Trabajos

---

### Biomonitoreo de población rural expuesta a plaguicidas

---

RECIBIDO: 21/6/07  
ACEPTADO: 26/7/07

---

**Simoniello, M.F. • Scagnetti, J.A. • Mastandrea, C. •  
Grigolato R. • Paonessa, A. • Gigena, F. • Kleinsorge, E.C.**

Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. Santa Fe. Argentina

Correspondencia: fersimoniello@gigared.com  
Cát. Toxicología, Farm. y Bioq. Legal.  
Ciudad Universitaria-Paraje El Pozo

**RESUMEN:** Los pesticidas se utilizan para proteger los cultivos pero pueden representar un riesgo potencial para la salud de los trabajadores rurales y su ambiente. Este estudio involucró 88 donantes divididos en tres grupos: expuestos directos, indirectos y grupo control. En ellos se investigó los posibles efectos genotóxicos usando el Ensayo Cometa (Índice de Daño al ADN), y las actividades enzimáticas de Acetilcolinesterasa Eritrocitaria y de Colinesterasa Plasmática. Los resultados sugirieron que en los trabajadores expuestos directos e indirectos el Índice de Daño es significativamente más elevado en comparación con los controles. También, se determinó una inhibición de la actividad enzimática. Nuestros resultados indican que la exposición directa e indirecta a mezclas de pesticidas podría causar daño

al ADN humano. Del estudio se puede concluir que el Ensayo Cometa es un biomarcador sensible para la detección de genotoxicidad causada por mezclas de pesticidas.

**PALABRAS CLAVES:** Pesticidas, Genotoxicidad, Ensayo Cometa, Humanos

**SUMMARY:** *Biomonitoring in rural population exposed to pesticides.*

Pesticides are used in agriculture to protect cultures but they can represent a potential risk to farmers and environment. The study involved 88 donors divided into three groups: directly and indirectly exposed and control group. Genotoxic effects were investigated in them using Comet Assay (DNA Damage Index), and Erythrocyte Acetylcholinesterase and Plasmatic Cholinesterase activity.

The results suggested that directly and indirectly exposed had a significantly

increased in Damage Index when compared with controls. In addition, enzymatic activity inhibition was determined. Our findings indicate that direct and indirect exposure to pesticide mixtures could cause human genome damage. From the study it can be

concluded that Comet Assay is a sensitive biomarker for the detection of genotoxicity caused by pesticide mixture.

**KEY WORDS:** Pesticides, Genotoxicity, Comet Assay, Humans

---

### Introducción

Los pesticidas son un grupo muy amplio de tóxicos liberados al ambiente en forma intencional con los fines de combatir diferentes plagas agrícolas y vectores de enfermedades humanas. Sin embargo, muchos de ellos son capaces de actuar sobre otros organismos no-blanco, incluidos los humanos. La exposición ocupacional a pesticidas se relaciona a distintos riesgos para la salud de los trabajadores. Entre los posibles efectos, el daño genotóxico tiene importantes implicancias sobre la salud, como la inducción de diferentes tipos de cáncer y daños reproductivos (1). Distintos métodos y técnicas se han desarrollado para el monitoreo de poblaciones humanas que están ambientalmente expuestas a genotoxinas (2).

Diferentes biomarcadores son aplicados para evaluar la exposición a plaguicidas; entre ellos los metabolitos de los productos (3), los marcadores enzimáticos (4) y los de efectos genotóxicos (aberraciones cromosómicas, micronúcleo, intercambio de cromátidas hermanas, ensayo cometa) (2).

La dosimetría de la actividad enzimática de Acetilcolinesterasa Eritrocitaria (AChE) y Colinesterasa Plasmática (ChE) es el método más frecuentemente empleado para evaluar los efectos nocivos de pesticidas organofosforados (OF) y metil-carbámicos (M-C) (4)(5). Sin embargo: a) existen variaciones interindividuales de estas enzimas, b) se requieren datos basales o de pre-exposición y c) para

considerar que existe sobre-exposición se requiere de una inhibición de al menos el 20 % de la actividad enzimática afectada. Pero además, este monitoreo no es suficiente para realizar una evaluación del uso frecuente de plaguicidas en mezclas donde se emplean sustancias que ejercen acciones biológicas sobre distintas dianas celulares.

Debido a ello diversas investigaciones apuntan a aplicar a poblaciones laboralmente expuestas a plaguicidas (fumigadores, trabajadores agrícolas, de la manufactura, etc.) distintos indicadores de daño genotóxico (6)(7)(8)(9). Estos son también designados puntos finales citogenéticos y tienen conclusiones dispares y a veces, controvertidas (10). 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. Por otro lado, las prácticas de higiene y protección utilizadas por los trabajadores agrícolas son a veces muy precarias y determinan los resultados hallados en los estudios, particularmente en aquellos realizados en los países en desarrollo. Por todo esto, es imprescindible el empleo conjunto de biomarcadores relevantes que permitan la detección temprana de los efectos de los pesticidas sobre la salud, atendiendo a toda la información que describa la población estudiada.

El uso de plaguicidas en cultivos de verduras y hortalizas es una práctica extendida en el cordón agrícola 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. La población vecina, circundante a los cultivos, está expuesta en forma indirecta a los productos aplicados. Esta observación provocó una evaluación de los pobladores de la zona, mediante la medición de los niveles de las enzimas afectadas por los pesticidas OF y M-C. Los resultados mostraron una ligera disminución de los niveles de AChE y ChE con respecto a población no expuesta (11). Como conclusión de dicho trabajo, se generó la hipótesis de aplicar otros métodos de monitoreo a la valoración de estos pobladores.

En nuestro estudio se aplicó el Ensayo de Electroforesis de una Sola Célula (EESC), también llamado Ensayo Cometa (EC). Planteado como test de genotoxicidad, es una herramienta de gran impacto para la investigación de distintos tipos de daño al ADN y su posible correlación con los mecanismos de reparación (12)(13). En la actualidad, este ensayo se emplea como monitor del daño al ADN en poblaciones humanas expuestas a muy diferentes agentes ambientales y ha demostrado sensibilidad y especificidad (14)(15)(16). Su aplicación utilizando linfocitos humanos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se convirtió en una técnica de elección para la detección de daño en poblaciones expuestas a bajos niveles de agentes químicos.

El EC luego de aplicarse en trabajadores de plantas productoras o de manufactura de plaguicidas (17)(18)(19), su uso se extendió a la evaluación de trabajadores agrícolas expuestos (20)(21).

## Materiales y Métodos

### *Población estudiada*

El estudio involucró a 58 sujetos de ambos sexos que viven y trabajan en el cordón de cultivo de hortalizas y verduras del departamento La Capital (Prov. de Santa Fe, Argentina). El grupo control consistió en 30 personas sanas sin exposición ocupacional a pesticidas u otros agentes sospechosos de causar genotoxicidad y que no residen en la zona agrícola.

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 (año 2001). Sin embargo se ha producido (a expensas de la producción de soja) una disminución de la zona cultivada con hortalizas. En la actualidad, esta actividad solo reúne 120 explotaciones (1500 hectáreas) donde residen grupos familiares dedicados a la misma (22). Rotativamente y de acuerdo a producción estacional, se emplean diferentes pesticidas.

Previo al estudio, todos los individuos fueron informados de los objetivos del trabajo. Dieron su consentimiento a responder a una encuesta y a la extracción de una muestra de sangre, la cual fue manipulada de acuerdo a los estándares éticos. La encuesta registró características sociodemográficas, ocupación, uso de elementos de protección personal, relación con los plaguicidas (fumiga, prepara, transporta), alteraciones en la salud post aplicación de plaguicidas, consumo de alcohol y tabaquismo.

El estudio se llevó a cabo en el período estival (Enero-Marzo/2007), de mayor actividad hortícola. El total de personas incluidas en el estudio fue de 58 (n). Se agruparon según su actividad en expuestos directos e indirectos. Los primeros fueron aquellos que en los siete días previos a la toma de mues-

tra sanguínea habían realizado actividades de fumigación y cuentan con una antigüedad laboral en las actividades rurales de  $18,80 \pm 9,06$  años con predominio de género masculino (88 %). Los expuestos indirectos reunieron 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 (por ejemplo, desmalezamiento, sembradío, etc.) y tienen una antigüedad laboral de  $18,30 \pm 9,88$  años. En esta última población se observó predominio de género femenino (73 %).

Conjuntamente, en el mismo período, se trabajó con una población control, sana y no expuesta a plaguicidas ( $n = 30$ ).

#### *Muestras sanguíneas*

Las muestras de sangre heparinizadas se obtuvieron por punción venosa 14 hs. post-exposición y se transportaron al laboratorio dentro de las 3 hs. Una alícuota se conservó a  $37^\circ\text{C}$  en RPMI 1640 (HYClone) y la otra se reservó a  $4^\circ\text{C}$  para la medición de la actividad de AChE y ChE (23)(24).

La viabilidad de las células se comprobó usando la técnica de exclusión del Azul de Tripán.

#### *Técnica de Ensayo de Cometa*

El Ensayo Cometa se realizó de acuerdo al protocolo de Singh N.P. y col (1988) (12) con algunas modificaciones (13). Como control positivo, se expuso *in vitro* a los linfocitos de la población control a una concentración  $50\ \mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno. Cada muestra se procesó por duplicado. Para preparar la capa celular,  $50\ \mu\text{l}$  de sangre entera fueron embebidos en agarosa de bajo punto de fusión (Sigma A9414) y se distribuyeron sobre dos portaobjetos. Estos previamente se acondicionaron con agaro-

sa de punto de fusión normal (Biodynamics D-LE) de manera que la unión al portaobjetos del gel que contiene las células resultara lo más efectiva posible. Sobre esta capa se colocó un cubreobjeto de tamaño adecuado y se refrigeró a  $4^\circ\text{C}$ . Transcurridos 5 minutos se retiraron los cubreobjetos. La capa de células se recubrió con una nueva capa de agarosa de bajo punto de fusión (para proteger la capa celular). Luego se repitió el mismo procedimiento de refrigeración.

Los preparados se sumergieron en solución tampón de lisis por el plazo mínimo de 1 hora para asegurar la lisis celular con la consecuente exposición del ADN nuclear. La solución de lisis contiene: 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris, pH 10; DMSO: Triton X-100, (89:10:1)  $4^\circ\text{C}$ .

En la etapa siguiente, para el desenrollamiento de la hebra de ADN, se sumergieron los portaobjetos en una solución alcalina de 0,3 M OHNa conteniendo 1 mM EDTA, pH  $>13$ , durante 20 minutos.

La electroforesis se realizó con la misma solución tampón del paso anterior, logrando la migración de los fragmentos de ADN en función del campo eléctrico, bajo condiciones de 25 v y 300 mAmp, durante otros 20 minutos. Posteriormente, con el fin de eliminar la alcalinidad residual y favorecer la posterior visualización, se neutralizó con un buffer 0,4 M Tris, pH 7,5 con tres lavados de 5 minutos cada uno. La observación de las células teñidas con bromuro de etidio se realizó con un microscopio Olympus Cx40 provisto de una lámpara de fluorescencia Olympus U-RFLT 50, ocular micrométrico Olympus WF10x.

Las drogas empleadas para la preparación de las soluciones fueron: ClNa: Merck pa; NaOH: Merck pa; Na<sub>2</sub>EDTA: Sigma E 5134; Trizma: Sigma T 6066; Triton X-100: Fluka 41644; DMSO: Sigma D 5879; Bromuro de Etidio: Sigma E 8751.

### *Análisis del Ensayo de Cometa*

Para evaluar el nivel de daño del ADN en los tratamientos y compararlos con los controles positivos y negativos se calculó el Índice de Daño. En cada portaobjeto se contabilizaron 100 células y se las clasificó en cinco categorías arbitrarias de nivel de daño de 0 a 4 de acuerdo al cotejamiento micro-métrico del largo de la cola formada por los fragmentos de ADN que migraron al ánodo. Se establecieron las siguientes categorías: "0" sin daño (menor de 5 micras); "1" bajo daño (5-20 micras); "2" daño moderado (20-40 micras); "3" daño elevado (40-80 micras); "4" daño extremadamente alto (más de 80 micras de ADN en la cola pero con núcleo definido). Los cometas con elevado daño pero sin núcleo detectable fueron clasificados como "nubes" y no se registraron al aplicar la siguiente fórmula:  $ID = n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$ , siendo  $n_i$  la cantidad de células dañadas que se registraron para cada una de las cuatro categorías (25).

### *Técnicas para la dosimetría*

#### *de Colinesterasa plasmática y eritrocitaria*

La AChE hidroliza a la acetiltiocolina siendo los productos de hidrólisis: acetato y tiocolina. Se empleó como muestra una dilución 1/10 del paquete globular lavado y como sustrato yoduro de acetil tiocolina, 156 mmol/l. (Sigma A 5751). Según el método de Ellman, G. y col (1961), la tiocolina reacciona con el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB, Sigma 8130) en solución tampón de fosfatos, pH 7,2 formando el compuesto coloreado 2-nitro-5-mercaptobenzoato, el cual fue medido con Espectrofotómetro Metrolab 1700 a 405 nm. La actividad de la enzima se determinó a temperatura constante de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (23).

Para la determinación de ChE se utilizó el equipo Wiener lab®.

### *Análisis estadístico*

Las muestras fueron codificadas en el momento de la preparación y su recuento. Se decodificaron antes del análisis estadístico para su comparación. La media y el desvío estándar se calculó para cada biomarcador. Se analizó la distribución de los valores de enzimas y EC, a través del test de Kolmogorov-Smirnov. No se hallaron diferencias significativas respecto de la distribución normal de datos, por eso se usaron sin transformar. El análisis de variancia se realizó a través de ANOVA. Para comparar los datos de cada uno de los grupos expuestos –directos e indirectos– con los controles, para las tres variables, se analizó el Test de Dunnett. La media y las desviaciones estándar se consideraron con una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). Para los cálculos se empleó el software SPSS 11,5 para Windows.

### **Resultados**

Al valorar las características demográficas de las poblaciones se destaca que los expuestos directa e indirectamente tienen una alta tasa de escolaridad primaria. Aquellas personas que se dedican a las actividades de cultivo y aplicación de agroquímicos no cuentan con elementos de protección personal y sólo un 5 % de ellos emplea botas de goma. Para la fumigación se utiliza el equipo de mochila.

Las características de los grupos control y expuestos se muestran en la Tabla 1 y los principales resultados de la encuesta en la población expuesta, directa e indirectamente, se reúnen en la Tabla 2.

Más de 20 productos agroquímicos son empleados en los diferentes cultivos. Los utilizados con mayor frecuencia durante el período estival, se reunieron en Tabla 3 (26).

Los resultados de la dosimetría de la inhibición enzimática se exponen en la Tabla

4. A través de ANOVA, se demuestra una diferencia estadísticamente significativa tanto para AChE ( $P < 0,001$ ) como para ChE ( $P = 0,008$ ). A su vez, cada uno de los grupos expuestos se los comparó con el grupo control a través del Test de Dunnett, obteniendo también diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) en ambos grupos cuando se analizó la disminución de la actividad de AChE. En tanto, para la disminución de la actividad de ChE, los valores del mismo Test para los expuestos directos e indirectos fue  $P=0,038$  y  $P=0,002$  respectivamente.

Previo a la realización del EC, se observó el porcentaje de células viables e inviables con la coloración de exclusión azul de tripan. Obteniéndose en todos los casos una Viabilidad superior al 95%. Cuando se analizó el Índice de Daño al ADN medido a través del Ensayo Cometa (Tabla 5) se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA,  $P < 0,001$ ). A su vez, en el análisis realizado a través del Test de Dunnett la diferencia demostró ser estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) para ambas comparaciones (Figura 1).

En la población expuesta no se determinaron diferencias significativas en edad, género, fumador/no fumador, cuando se analizó EC utilizando ANOVA ( $P > 0,05$ ).

### Discusión

Los pesticidas son agentes químicos tóxicos pero sus beneficios a la economía y salud de la población son innegables. Sin embargo aún es un gran desafío garantizar el uso seguro de los mismos en los distintos ámbitos de su aplicación.

El trabajo en el Cordón de producción frutihortícola de nuestra región no es una actividad económica planificada, los trabajadores no están protegidos por seguros

de salud y riesgo que obliguen al monitoreo ocupacional y al empleo de elementos de protección personal.

La evaluación de la población expuesta laboralmente y de quienes viven en la zona inmediata es compleja debido a la multiplicidad de factores involucrados, el empleo de mezclas de productos agroquímicos o bien, se hacen aplicaciones secuenciadas de ellos, la obtención de las muestras biológicas de la población y su posterior procesamiento. La mezcla más frecuentemente empleada por los trabajadores en la zona, durante el período de estudio, fue Clorpirifos y Cipermetrina.

En los casos de exposición severa a OF y M-C, la inhibición de las actividades de AChE y ChE es significativo y no tiene equívocos. Pero para detectar moderados o bajos niveles de exposición a estas sustancias (como es nuestro caso) es necesario considerar múltiples factores para llegar a una conclusión (27). Hay una amplia variación interindividual en la actividad de las enzimas (particularmente en ChE) lo cual hace necesario contar con los niveles basales de los sujetos (nivel preocupacional). Los niveles de AChE son más representativos de exposición, pues la recuperación de la enzima requiere de mayor tiempo y por tanto, refleja mejor exposiciones pasadas y continuas a bajas dosis (28)(29).

Puesto que no se dispuso de valores basales de los marcadores enzimáticos de la población rural, se utilizaron como subrogante de ellos los valores de AChE y ChE determinados en población control no expuesta.

Se halló en la población expuesta, una importante inhibición de la actividad de AChE frente a los valores encontrados en población control. En la población no expuesta directamente, la disminución de la actividad fue menor.

**Tabla 1.** Características demográficas de población control y personas expuestas a plaguicidas

<b>Parámetro</b>	<b>Población Control (n = 30)</b>	<b>Población expuesta (n = 58)</b>
<b>Edad (años)</b> (media $\pm$ s)	37,70 $\pm$ 14,07	36,70 $\pm$ 12,40
<b>Género (%)</b>		
Femenino	45 %	52 %
Masculino	55 %	48 %
<b>Fuma (%)</b>		
Fumador	78 %	84 %
No-fumador	22 %	16 %

s = desvío estándar

**Tabla 2.** Características demográficas de las poblaciones expuestas directa e indirectamente a plaguicidas

<b>Parámetro</b>	<b>Expuestos Directos (n = 25)</b>	<b>Expuestos Indirectos (n = 33)</b>
<b>Edad (años)</b> (media $\pm$ s)	40,20 $\pm$ 11,44	34,06 $\pm$ 12,60
<b>Tiempo de residencia en la zona (años)</b> (media $\pm$ s)	25,57 $\pm$ 14,03	15,71 $\pm$ 8,15
<b>Antigüedad laboral (años)</b> (media $\pm$ s)	18,80 $\pm$ 9,06	18,30 $\pm$ 9,88
<b>Fuma (%)</b>		
Fumador	75 %	91%
No-fumador	25 %	9 %

s = desvío estándar

**Tabla 3.** Pesticidas usados por los aplicadores del grupo expuesto, clasificación de riesgo de la OMS, mutagenicidad (M) y carcinogenicidad (C) según datos experimentales.

Tipo de Uso	Producto	Clase (OMS)	M *	C *
Insecticida	Cipermetrina	II	-	+
	Lambdacialotrina	II	-	-
Insecticida-acaricida	Clorpirifos	II	-	-
	Metamidofos	Ib	+	-
	Dimetoato	III	sd	sd
	Endosulfan	II	+	-
Insecticida-nematicida	Lufenuron	IV (U)	sd	sd
	Imidacloprid	II	+	-
Insecticida-acaricida-nematicida	Carbofuran	Ib	+	-
Fungicida	Mancozeb	IV (U)	+	-
	Zineb	IV(U)	-	-
Herbicidas	Glifosato	IV(U)	-	-
	Linurón	IV(U)	-	-
	Trifluralina	IV(U)	-	+

Ia: extremadamente peligroso; Ib: altamente peligroso; II: moderadamente peligroso; III: ligeramente peligroso; IV (U) = improbable que presente peligro en el uso normal; sd = sin datos.  
(\*) Fuente: IARC

**Tabla 4.** Resultados de Acetilcolinesterasa Eritrocitaria y Colinesterasa Plasmática

Actividad Enzimática	Control (n = 30)	Expuestos Directos (n = 25)	Expuestos Indirectos (n = 33)
Acetilcolinesterasa Eritrocitaria (U/L GR) (media ± s)	9608,16 ± 2324,26	6412,20 ± 1326,28*	7369,15 ± 1784,31*
Colinesterasa Plasmática (U/L) (media ± s)	6713,26 ± 1195,95	6052,56 ± 1086,22**	5779,33 ± 1231,56***

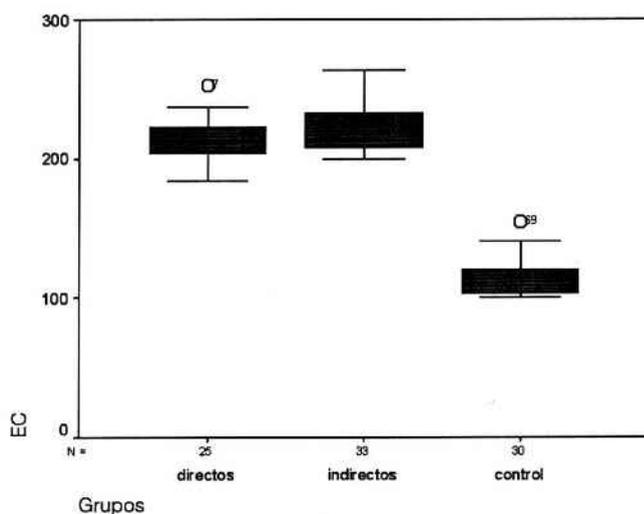
s = desvío estándar

\* Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de la enzima comparada al control (Test de Dunnett: P < 0,001). \*\* Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de la enzima comparada al control (Test de Dunnett: P = 0,038). \*\*\* Diferencia estadísticamente significativa de la concentración de la enzima comparada al control (Test de Dunnett: P = 0,002)

**Tabla 5.** Resultados de Índice de Daño al ADN

Ensayo Cometa	Control (n = 30)	Expuestos Directos (n = 25)	Expuestos Indirectos (n = 33)
Índice de Daño (media $\pm$ s)	113,36 $\pm$ 13,48	214,92 $\pm$ 15,44*	221,06 $\pm$ 18,32*

s = desvío estándar

\* Diferencia estadísticamente significativa para el Índice de Daño (Test de Dunnett:  $P < 0,001$ ).**Figura 1.** Índice de Daño al ADN en Población Control, Expuestos Directos y Expuestos Indirectos

Respecto de la actividad de ChE se hallaron diferencias con menor potencia estadística entre las poblaciones expuestas, directa e indirectamente, con respecto al control. Posiblemente esto se deba al predominio de población femenina en el grupo de expuestos indirectos y al tipo de actividad, preferentemente doméstica, que realizan.

El Ensayo Cometa se aplicó como marcador de genotoxicidad. El daño al ADN revelado por este ensayo podría ser originado por: roturas en la cadena de ADN en una o

en ambas hebras, la reparación incompleta de roturas de ambas cadenas, la formación de aductos del ADN, de uniones ADN-ADN y ADN-Proteínas (2)(12)(30)(31). Algunos pesticidas o sus metabolitos podrían generar este tipo de lesiones como resultado de su interacción con la molécula de ADN (17).

En nuestros resultados se halló una significativa diferencia en el Índice de Daño revelado a través del EC entre las poblaciones expuestas directa e indirectamente, frente a la población control. Dicho resultado po-

dría deberse a la exposición a plaguicidas actuando en forma sinérgica en mezclas como así también a los efectos genotóxicos propios de sus metabolitos.

El daño al ADN observado en el grupo de expuestos en forma indirecta, consideramos que podría ser causado no solo por la proximidad de las viviendas a los sitios de cultivo, sino que también se debería a que los sujetos cohabitan con los plaguicidas en sus hogares (usados de depósito), contribuyen a la preparación y al transporte de los mismos, aunque no intervienen directamente en la aplicación de las mezclas.

Se analizó la influencia de los factores de confusión sobre los efectos genotóxicos de la exposición. No se hallaron diferencias significativas entre fumadores y no fumadores, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores (6)(10)(16)(32).

Para evaluar genotoxicidad por plaguicidas se han realizado numerosas investigaciones aplicando el EC sobre poblaciones celulares *in vitro* y con un único plaguicida adicionado al cultivo (preferentemente de linfocitos) (2)(31)(32). Otras investigaciones han aplicado el EC a poblaciones expuestas laboralmente en la manufactura de pesticidas (18)(19). Pero la aplicación del EC *in vivo*, en poblaciones rurales expuestas a plaguicidas es mas reciente en muy diversos ambientes agrícolas (5)(8)(9)(33)(34)(35)(36)(37). Por otra parte, es muy poco frecuente el uso combinado del Ensayo Cometa con otros biomarcadores en poblaciones humanas que son afectadas por plaguicidas (por ejemplo, AChE y ChE).

En varios estudios *in vivo* referidos al uso de pesticidas en diferentes cultivos, se indica que los hallazgos pueden estar influenciados por la región que se estudia, por las diferentes técnicas agrícolas empleadas, la exposición simultánea a otros genotóxicos am-

bientales (20)(33)(37). También los diferentes estilos de vida, la sensibilidad individual, el estado del sistema inmune, la predisposición genética, las diferencias metabólicas y la capacidad de reparación de ADN de cada individuo pueden incidir sobre los hallazgos.

El hecho de que las alteraciones al ADN detectadas por el EC puedan ser reparadas antes de que se fijen como una mutación, impulsa a investigar la capacidad de reparación de las poblaciones expuestas a pesticidas.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que las exposiciones simultáneas a mezclas de plaguicidas, aun a moderadas o bajas dosis, provocan, además de una inhibición enzimática, un importante efecto genotóxico que el EC es capaz de poner en evidencia. La sensibilidad, economía y rapidez del EC vuelven a esta técnica un biomarcador importante de daño genotóxico, muy útil en actividades de prevención de salud en poblaciones expuestas (sea directa y/o indirectamente) a mezclas de pesticidas. Por eso también el EC, aplicado junto a otros biomarcadores puede contribuir a una más completa evaluación de los riesgos potenciales a la salud asociados al uso y exposición a agroquímicos (38)(39).

### Agradecimientos

Mag. Elena Carrera, Ing. Liliana Contini, Lic. Stella Vaira, Departamento de Matemática, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. (UNL), por su colaboración en el tratamiento estadístico.

Asistente Social Jacqueline A. Chiapello y al personal del Hospital Protomédico "José Rodríguez", Monte Vera, Santa Fe (Arg), por su apoyo en el trabajo de campo en la zona frutihortícola.

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto CAID+D UNL 12/B420 "Biomonitorio de población rural expuesta a pesticidas mediante el Ensayo del Cometa alcalino en linfocitos".

## Bibliografía

1. Acquavella, J., Doe, J., Tomenson, J., Chester, G., Cowell, J., Bloemen, L. (2003). Epidemiologic Studies of Occupational Pesticide Exposure and Cancer: Regulatory Risk Assessments and Biologic Plausibility. *Ann Epidemiol.* **13**:1-7
2. Richard J. Albertini, R.J., Anderson, A., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Altio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mut. Research.* **463**: 111-172.
3. Dana B. Barr, Larry L. Needham (2002). Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *Journal of Chromatography B.* **778**: 5-29
4. Cocker, J., Mason, H.J., Garfitt, S.J., Jones, K. (2002). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Tox. Letters.* **134**: 97-103
5. He, F., Chen, S., Tang, X., Gan, W., Tao, B., Wen, B. (2002) Biological monitoring of combined exposure to organophosphates and pyrethroids. *Tox. Letters.* **134**: 119-124
6. P Lebailly, C. Vigreux, T. Godard, E. Deslandes, F. Sichel, J. Y. Le Talaëra, M. Henry-Amar and P. Gauduchon (1997). Use of alkaline comet assay to detect DNA damages in mononuclear leukocytes of farmers occupationally exposed to pesticides. *Mut. Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* **379**, (1), Suppl 1: S157
7. Lucero, L, Pastor, S., Suarez, S., Durbán, R, Gómez, C., Parrón, T, Creus, A., Marcos, R. (2000) Cytogenetic monitorin of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mut. Reserch.* **464**: 255-262
8. Paz y Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E., Leone, P.E. (2002). Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect.* **110**: 1077-1080
9. Hoyos, L.S, Carvajal, S., Solano, L., Rodriguez, J., Orozco, L., López, Y., Au, W.W. (1996) Cytogenetic Monitoring of Farmers Exposed to Pesticides in Colombia. *Environm.. Health Persp.* **104**, (3): 535-538
10. Faust, F., Fekadu Kassie, F., Siegfried Knasmüller, S., Sebastian Kevekordes, S., 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
11. Soltermann, G., Mastandrea, C., Kleinsorge, E., Ahumada, N., Ojeda, M., Campo, A. (2003). Niveles de Colinesterasa Plasmática y Eritrocitaria en Población Rural (Santa Fe, Argentina) *Acta Toxicológica Argentina* (2003) **11** (2): 71-72.
12. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., 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.
13. Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999). Review. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Jour. Chromatography B.* **722**: 225-254
14. K. Danadevi, K., Roya Rozati, R., Saleha Banu, B., Hanumanth Rao, P, Grover, P. (2003) DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology.* **187**: 183-193
15. Farmer, P.B., Singh, R., Kaur, B., Sramb, R. J., Binkova, B. Kalina, I., Popov, T.A., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A., Cebulska-Wasilewskah, A. (2003). Molecular epidemiology studies of

- carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mut. Research*. **544**: 397-402
- 16.** Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Potter, F., Martus, H.J., Fjallman, A., Frieau, W., Ster, W. (2001). Use of the alkaline comet assay for industrial toxicity screening: comparative investigation with micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. **39**: 843-858.
- 17.** Garaj-Vrhovac, V. and 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. *Mut. Research*. **469**: 279-285.
- 18.** Zeljezic, D. Garaj-Vrhovac, V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*. **16**: 359-363.
- 19.** Blasiak, J., Jaloszynski, P., Trzeciak, A., Szyfter, K., (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mut. Research* **445**: 275-283
- 20.** De Marco, A., De Salvia, Polani, S., Ricordy, R., Sorrenti, F., Perticone, P., Cozzi, R., D'Ambrosio, C., De Simone, C., Guidotti, M., Albanesi, A T., Duranti, G., Festa, F., Gensabella, G., Owczarek, M. (2000). Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Properties of Pesticides Employed in Italian Agricultural Practices. *Environ. Research Section A*. **83**: 311-321
- 21.** Garaj-Vrhovac, V. and Zeljezic, D. (2001). Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*. **165**: 153-162
- 22.** Fuente: Ministerio de la Producción de la Prov. de Santa Fe. Centro Operativo "Angel Gallardo" (2007)
- 23.** Villaamil Lepori, E., Ridolfi, A., Quiroga, P. (2002). Procedimiento normalizado para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa Eritrocitaria, E.C. 3.1.1.7. (AChE). *Cát. de Toxicología y Qca. Legal*, FFyB, UBA
- 24.** Meraldi de Díaz, N.; Nieto, R.A.; Bett, E.; Basco, J.; Megyes, E.; Roses, O. (1990). Valores Referenciales para Población Clínicamente Sana en la Ciudad de Buenos Aires. *Rev. ABA*. **54** (1-2): 16 -18.
- 25.** Rodríguez Ferreiro, G., Cancino Badías, L., López-Migro, M., Palermo, A., Mudry, M., Prieto Gonzalez, E., Carballo, M.A. (2002). DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivates. *Tox. Letters*. **132**: 47-55
- 26.** WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, in [http://www.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazards/en](http://www.int/ipcs/publications/pesticides_hazards/en) (2004)
- 27.** Karalliedde, L.D., Edwards, P., Marrs, T.C. (2003). Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. *Food and Chemical Toxicology*. **41**:1-13
- 28.** Coronado, G.D., Thompson, B., Strong, L., Griffith, W.C., Islas, I. (2004). Agricultural Task and Exposure to Organophosphate Pesticides among Farmworkers. *Environ. Health Perspect*. **112**:142-147
- 29.** Palacios Nava, M.E. (2003) Aplicación de un instrumento para evaluar exposición a plaguicidas organofosforados, efectos agudos y subagudos en la salud de trabajadores agrícolas. *Rev. Fac. Med. UNAM*. **46** (1): 22-27
- 30.** Bowden, R.D., Buckwalter, M.R., McBride, J.F., Johnson, D.A., Murray, B.K., O'Neill, K.L. (2003). Tail profiler: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mut. Research*. **537**: 1-9
- 31.** Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., 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
- 32.** Chuang, Cheng-Hung and Hu, Miao-Lin (2004). Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mut. Research*. **564**: 75–82
- 33.** Møller, P., Knudsen, L. E., Loft, S., Wallin, H. (2000). The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **9**: 1005–1015
- 34.** Lebailly, P., Vigreux, C., Lechevrel, C., Ledemenev, D., Godard, T., Sichel, F., Le Talaëra, J.Y., Henry-Amar, M., Gauduchon, P. (1998). 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **7**: 929-940
- 35.** Lee, E., Oh, E., Lee, J., Sul, D., Lee, J. (2004) Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Tox. Sciences*. **81**: 121–132
- 36.** Hogenkamp, A., Vaal, M., Heederik, D. (2004). Pesticide exposure in dwellings near bulb growing fields in The Netherlands: an explorative study. *Ann. Agric. Environ Med*. **11**, 149–153
- 37.** Lebailly, P., Vigreux, C., Lechevrel, C., Ledemenev, D., Godard, T., Sichel, F., Le Talaëra J.Y., Henry-Amar, M., Gauduchon, P. (1998). 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **7**, 917-927
- 38.** 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., Hartmann, A. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mut. Research*. **627**: 31–35
- 39.** R. Julian Preston (2003). Molecular epidemiology: potential impacts on the assessment of public health. *Mut. Research*. **543**: 121–124.