

Trabajo completo

Evaluación del daño oxidativo al ADN y efecto de la susceptibilidad genética en una población laboral y ambientalmente expuesta a mezclas de plaguicidas

RECIBIDO: 08/06/2011

ACEPTADO: 15/09/2011

Porcel de Peralta, M.¹ • Scagnetti J.¹ • Grigolato R.¹ • Sylvestre J. A.¹ • Kleinsorge E.¹ • Simoniello, M. F.^{1,2}

¹ Cát. Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL (CU), Santa Fe, Argentina. Tel.0342-4575221.

² CIGETOX. Citogenética Humana y Genética Toxicológica. INFI-BIOC. Depto. Bioquímica Clínica. FFyB. UBA. Buenos Aires. Argentina. E.mail: fersimoniello@yahoo.com.ar

RESUMEN: En las últimas décadas, se ha incrementado el uso de plaguicidas en los países en desarrollo producto de la expansión agrícola. La aplicación de biomarcadores de efecto y de susceptibilidad permite evaluar la exposición humana a plaguicidas. El propósito de este trabajo fue evaluar el daño oxidativo al ADN en un grupo de personas expuestas a mezclas de plaguicidas (n=24), empleando el Ensayo Cometa modificado con la enzima FPG y la susceptibilidad génica individual evaluando los polimorfismos GSTT1 y GSTM1.

Se encontraron incrementos estadísticamente significativos de purinas oxidadas en el grupo de aplicadores de plaguicidas, de fumadores y al utilizar la actividad agrícola y equipo de protección

como factor. Mientras que no se hallaron diferencias significativas respecto a los polimorfismos investigados, a los factores de confusión u otras variables laborales evaluadas.

El daño oxidativo al ADN encontrado en este grupo incentiva futuras investigaciones en otras poblaciones expuestas a plaguicidas.

PALABRAS CLAVE: plaguicidas, oxidación del ADN, biomonitorio humano, susceptibilidad genética

SUMMARY: *Evaluation of oxidative DNA damage and genetic susceptibility in population occupationally and environmentally exposed to pesticide mixtures*

In the last decades, pesticides used in developing countries have increased due to agricultural expansion. The application of effect and susceptibility biomarkers allows evaluating human exposure to pesticides. The purpose of this work was evaluate oxidative DNA damage in humans exposed to pesticide mixture (n=24) using Comet Assay modified with FPG enzyme and genotyping the GSTT1 and GSTM1 polymorphisms for individual gene susceptibility. Statistically significant increases of

oxidized purines were found in the groups of pesticide sprayers, smokers, as a function of agricultural activity and of protection equipment used, whereas no significant differences were found regarding investigated polymorphisms, confounding factors and other labour variables evaluated.

The oxidative DNA damage found in this group encourages future research in other populations exposed to pesticides.

KEYWORDS: pesticides, oxidation of DNA, human biomonitoring, genetic susceptibility

Introducción

En las últimas décadas, se ha incrementado considerablemente el uso de plaguicidas en los países en desarrollo producto de la expansión agrícola. A pesar que se introducen al mercado nuevos 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. Además, 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 relacionada a las mezclas de plaguicidas.

El liderazgo agrícola de la provincia de Santa Fe, tanto en cultivos de cereales como de hortalizas, marcó su trayectoria. Aunque la floricultura está poco desarrollada en todo el país, las provincias más importantes en esta actividad son Buenos Aires y Santa Fe. Tanto la horticultura como la floricultura se caracterizan por un uso intensivo de agroquímicos por unidad de superficie. En consecuencia, la evalua-

ción de la exposición a estos xenobióticos constituye una prioridad regional. Estudios epidemiológicos en humanos han mostrado que la exposición ambiental y ocupacional a plaguicidas incrementa el riesgo de contraer cáncer. Además, la exposición a estos químicos ha sido asociada a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, a efectos reproductivos y sobre el desarrollo (1).

Los efectos observados sobre la salud han sido asociados a eventos como el daño al ADN y el estrés oxidativo. Este último, se produce como consecuencia de un desequilibrio entre la formación de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidantes. En esta condición, existen mayores probabilidades de que se lesionen moléculas de importancia biológica como ADN, proteínas y lípidos de membrana.

Los marcadores biológicos ofrecen oportunidades para evaluar los efectos sobre la salud en las poblaciones expuestas a distintos xenobióticos. Así, el biomonitoring puede ser utilizado como una herramienta de vigilancia para ayudar a interpretar un problema clínico o para evaluar y controlar

una determinada exposición ocupacional o ambiental.

A nivel internacional existen numerosos estudios de biomonitoreos genotoxicológicos en poblaciones expuestas a plaguicidas (2 - 12). Sin embargo, en Argentina aun son necesarios más estudios (13, 14, 15, 16). Entre los biomarcadores aplicados en la investigación de daño al ADN se encuentra el Ensayo Cometa, el cual es un método sencillo, rápido y de alta sensibilidad para detectar niveles bajos de daño al ADN en células individuales. Las células se colocan 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 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. Este ensayo puede ser modificado incluyendo en el protocolo la incubación con endonucleasas de reparación que remueven bases oxidadas, resultando en un método sensible para la medición del daño oxidativo al ADN. Una de estas enzimas es la formamidopirimidina ADN glicosilasa (FPG) la cual reconoce formamidopiridinas como por ejemplo la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (17).

Por otra parte, la Glutación S-Transferasa (GST) es una enzima clave de fase II y juega un rol crítico contra productos del estrés oxidativo y xenobióticos electrofilicos, a los

cuales conjuga con glutatión reducido para su eliminación. Se han descrito diferentes polimorfismos de esta enzima basados en diferencias en la secuencia aminoacídica. Dos de los más investigados son GSTM1 y GSTT1, cuya presencia/ausencia determina alteraciones en la actividad enzimática frente a plaguicidas (18). Así, la identificación de los polimorfismos de estas enzimas cobra valor en el análisis de los resultados de genotoxicidad obtenidos, como un biomarcador de susceptibilidad. En este trabajo se evaluó el daño oxidativo en el ADN empleando como biomarcador de efecto el Ensayo Cometa modificado con el agregado de la enzima bacteriana de reparación FPG. A efecto de considerar las diferencias en la susceptibilidad génica individual se realizó la determinación de los polimorfismos GSTT1 y GSTM1 de la enzima de detoxificación Glutación S-Transferasa mediante la técnica PCR múltiple.

Materiales y Métodos

Población en Estudio

En el estudio participaron 24 trabajadores vinculados con la actividad agrícola. El grupo estaba compuesto por floricultores, horticultores que utilizaban y que no utilizaban plaguicidas (cultivos orgánicos) y personas vinculadas con el manejo de plaguicidas (vendedores e ingenieros agrónomos). Todos ellos pertenecían a la localidad Santa Rosa de Calchines (Santa Fe, Argentina).

Se les explicó a los posibles voluntarios los objetivos de la investigación y quienes decidieron participar firmaron un consentimiento informado, establecido según los reglamentos del Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Los participantes en el estudio respondieron a un cuestionario destinado a reunir información sobre: a) datos demográficos (edad, sexo, etc.); b) estilo de vida (alimentación, hábito de fumar, consumo de alcohol y de medicamentos); c) datos laborales (horas de trabajo/día, años de exposición, uso de medidas de protección, etc.) y d) plaguicidas empleados.

Las muestras obtenidas, 10 ml de sangre entera anticoagulada con EDTA, fueron divididas en dos tubos (5 ml cada uno), conservados a 4° C y procesados dentro de las dos primeras horas.

Extracción de ADN y Genotipado:

El ADN genómico fue extraído a partir de 200 μ l sangre entera usando el kit de extracción comercial NucleoSpin® Tissue (Mancherey-Nagel).

Los marcadores polimórficos fueron investigados por genotipado usando la técnica de PCR Multiplex descrita por Abdel-Rahman y col. (19) con modificaciones. Brevemente, la mezcla de reacción consistió en 150 ng de ADN genómico, 15 pmol de cada primer, 200 pmol dNTPs, 100mM de Buffer PCR 10x y 1.5 mM $MgCl_2$ y 2 U taq polimerasa. Como control interno se amplificó el exón 7 del gen CYP1A1, usando los primers 5'-GAA CTG CCA CTT CAG C TG TCT y 5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC. Las secuencias de los primers de GSTT1 fueron 5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C y 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G; y para GSTM1 fueron 5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC y 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA .

Ensayo Cometa modificado con FPG:

Se utilizó el procedimiento descrito por Singh y col. (20) con modificaciones. Se realizó una dilución 1:20 de la sangre entera con RPMI 1640, se centrifugó y con

el sedimento se realizaron dos preparados por cada muestra. Brevemente, las células a investigar se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se colocaron sobre portaobjetos previamente acondicionados con agarosa de punto de fusión normal. Los vidrios así preparados se sumergieron en una solución salina de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10.1% tritón X-100, y 10% dimetil sulfoxido). Luego de una hora, los vidrios fueron lavados tres veces con buffer de FPG y cubiertos con 50 μ l de buffer de enzima o de FPG en buffer (según corresponda) y se incubó 30 minutos a 37°C.

Los vidrios se sumergieron en una solución altamente alcalina por 20 minutos (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) con el objeto de lograr el desenrollamiento de la cadena de ADN. Se realizó posteriormente la electroforesis horizontal en el mismo buffer para lograr la migración de los fragmentos de ADN en función del campo eléctrico a 0.7 v/cm por 20 minutos. La etapa de neutralización se realizó con 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) y se procedió a la deshidratación de los preparados con etanol por el término de 5 minutos. Los preparados teñidos con 50 μ l de bromuro de etidio (2 μ g/ μ l) fueron observados en microscopio bajo fluorescencia (Mikoba 350). Para realizar la etapa de conteo, y se analizaron 100 células en cada uno de los dos geles duplicados clasificando las células en una escala de 1-4. Las categorías se designaron en función de nivel de daño que presentaba el ADN, esto es el largo de la cola medida en micras: Categoría 1 menos de 20 micras, Categoría 2: 20-40 micras, Categoría 3: 40-60 micras y por último Categoría 4 cuando la cola tiene más de 60 micras (21). La puntuación total, entre 100 y 400 uni-

dades arbitrarias, se relaciona con la frecuencia de las roturas del ADN. Se calculó el Índice de Daño Ensayo Cometa (IDEC) para cada muestra, utilizando la siguiente fórmula $\text{IDEC} = n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4$. Siendo n_1 las células incluidas en la categoría 1, n_2 en la categoría 2, n_3 en la categoría 3 y n_4 en la de mayor daño (15).

El número de sitios FPG fue calculado por resta de los valores obtenidos de IDEC con la enzima FPG menos el IDEC obtenido sin la enzima.

Número de Sitios FPG = IDEC con FPG – IDEC sin FPG (21)

Análisis Estadístico:

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 y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene.

Se utilizaron test no paramétricos: Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para comparar los diferentes grupos en función de los distintos parámetros analizados (marcadores de efecto y susceptibilidad), los factores de confusión (sexo, edad, hábitos, tiempo de residencia) o los parámetros laborales (tarea realizada, antigüedad laboral, equipo de protección, tipo de cultivo). Un nivel significativo fue considerado $P < 0,05$.

Resultados

El promedio de edad del grupo evaluado fue de $39,26 \pm 12,81$ años. Todos los donantes vivían en las cercanías de los cultivos y el promedio de años de residencia fue de $38,08 \pm 11,75$ años. La antigüedad laboral fue de $21,90 \pm 14,57$ años. Al analizar los datos referidos al uso de equipo de protección personal (EPP), se observa que ningún

trabajador o aplicador utiliza el equipo de manera adecuada. El 62,5 % no usa ningún tipo de protección, y solo el 16,5 % utiliza al menos 2 elementos para protegerse.

Los tratamientos contra insectos y gusanos cortadores, en el período previo al muestreo fueron realizados con clorpirifos, en dosis cercanas al litro por ha, y cipermetrina en dosis que van desde los 500 a $1000 \text{ cm}^3 \text{ ha}^{-1}$. En el momento del muestreo, cercano a la floración, se utilizó mezcla de los anteriores con el agregado de lambda-cialortina, imidacloprid, deltametrina, tiame-toxam y lambda-cialotrina, novaluron, también se uso en zanahoria los nematocidas: aldicarb y furadan.

La distribución de los genotipos GSTM1 y GSTT1 se muestra en la Tabla 1. El 87,5 % de trabajadores fueron GSTT1 positivo, mientras que el 54,16 % lo fue para GSTM1. La distribución de los genotipos en la población en estudio siguió el equilibrio Hardy-Weinberg.

En las Tablas 2, 3 y 4 se resumen los resultados de IDEC y el número de sitios FPG, respecto a los factores de exposición, de susceptibilidad, parámetros laborales y factores de confusión. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el número de sitios FPG en las personas que fumigan, que utilizan el EPP, así como en aquellos que fuman a través del test de Mann-Whitney y utilizando el test de Kruskal-Wallis, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a la actividad laboral en el mismo parámetro. La edad, la antigüedad laboral, el alcohol y los polimorfismos GSTM1 y GSTT1 no mostraron diferencias significativas utilizando FPG ni para ninguno de los factores analizados utilizando el Ensayo Cometa.

Tabla 1. Frecuencia de los Polimorfismos GSTT1 y GSTM1 en la población en estudio.

Polimorfismo		N° de Casos (%)
GSTT1	Nulo	3 (12,5)
	Positivo	21 (87,5)
GSTM1	Nulo	11 (45,84)
	Positivo	13 (54,16)

Tabla 2. Análisis los resultados de índice de daño a través de Ensayo Cometa (IDEC) y Sitios FPG considerando parámetros de exposición y susceptibilidad (promedio \pm desvío estándar).

Parámetro		IDEC	Sitios FPG
Exposición	No Fumiga	161,81 \pm 21,32	39,7 \pm 12,33
	Fumiga	149,54 \pm 32,24	64,9 \pm 14,67*
GSTM1	Nulo	164,72 \pm 33,23	52,45 \pm 7,77
	Positivo	146,63 \pm 29,12	52,18 \pm 26,12
GSTT1	Nulo	155,50 \pm 32,56	35,50 \pm 11,45
	Positivo	155,70 \pm 27,67	54,00 \pm 25,89

*P<0,05 (Test Mann-Whitney)

Tabla 3. Análisis los resultados de índice de daño a través de Ensayo Cometa (IDEC) y Sitios FPG considerando parámetros laborales (promedio \pm desvío estándar).

	Parámetro	IDEC	Sitios FPG
Equipo de Protección Personal (EPP)	No usa	159,38 \pm 33,76	63,77 \pm 14,89*
	Usa	150,33 \pm 27,89	44,38 \pm 12,78
Tipo de actividad	Zanahoria y Choclo	151,00 \pm 20,21	50,75 \pm 19,05
	Verduras de hoja	159,66 \pm 30,51	47,83 \pm 20,80
	Zanahoria	157,66 \pm 13,47	53,33 \pm 23,89
	Orgánico	169,50 \pm 34,74	44,00 \pm 17,15
	Floricultor	127,50 \pm 37,47	89,50 \pm 27,87**
Antigüedad	Ingeniero o Venta	166,00 \pm 24,56	63,00 \pm 17,88
	\leq 20	153,00 \pm 28,44	50,66 \pm 15,89
	> 20	158,90 \pm 30,77	59,30 \pm 12,90

*P<0,05 (Test Mann-Whitney). **P<0,05 (Test Kruskal-Wallis)

Tabla 4. Análisis los resultados de índice de daño a través de Ensayo Cometa (IDEC) y Sitios FPG considerando factores de confusión (promedio \pm desvío estándar).

Parámetro		IDEC	Sitios FPG
Edad	\leq 38	153,36 \pm 27,54	58,45 \pm 20,15
	> 38	158,00 \pm 31,14	46,18 \pm 16,23
Fuma	No	161,00 \pm 27,75	47,90 \pm 23,33
	Si	119,50 \pm 23,33	93,50 \pm 14,23*
Alcohol	No	155,83 \pm 26,17	49,16 \pm 33,00
	Si	163,00 \pm 46,16	61,60 \pm 31,73

*P<0,05 (Test Mann-Whitney)

Discusión:

La proximidad de las viviendas a los campos agrícolas tratados con pesticidas se ha sugerido como un factor estrechamente relacionado con la exposición ambiental a plaguicidas (22). Los estudios de muestras de polvo de los hogares de trabajadores agrícolas apoyan esta sugerencia, tanto en términos de las concentraciones de plaguicidas (23) como en el número de pesticidas hallados en el hogar (24, 25). Las prácticas de higiene y protección utilizadas por los trabajadores expuestos a pesticidas son, por lo general muy precarias y determinan los resultados hallados en los estudios, particularmente en aquellos realizados en los países en desarrollo (14, 15). 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.

En este trabajo, se seleccionaron dos poblaciones, una encargada de la tarea de aplicar los plaguicidas o expuestos directos (n=12) y una expuesta indirectamente de forma laboral o ambiental (n=12), ambas pertenecían al mismo lugar geográfico, con condiciones socioculturales similares.

De las encuestas surge además, que ningún aplicador utiliza el equipo de protección completo y un 62,5 % no usa ningún tipo de protección. En la encuesta realizada por Souza-Casandinho y Bocero (26) 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. 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.

En estudios realizados previamente en la provincia de Santa Fe, la exposición ocupacional a las mezclas de plaguicidas ha sido asociada con un aumento de estrés oxidativo y daño genotóxico (14, 15). 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 Ensayo Cometa, proporciona un enfoque alternativo (27). La base de este ensayo fue modificada para la detección de lesiones específicas, digiriendo con enzimas la lesión de los nucleótidos. En el presente estudio se determinaron los sitios FPG, obteniendo diferencias significativas en función de la exposición, el uso de EPP, el hábito de fumar y el tipo de cultivo (Tablas 2, 3 y 4). Los resultados obtenidos en esta modificación del Ensayo Cometa aumentan su sensibilidad, ya que el daño oxidativo al ADN se relacionan con diferentes exposiciones ambientales y podrían estar relacionados con diferentes factores fisio-patológicos. Esta modificación del Ensayo Cometa se ha aplicado en el trabajo de Muñoz y col. (28), un biomonitorio de aplicadores realizado en Estados Unidos. El plaguicida más utilizado en ese grupo de trabajadores, metil-azinfos (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. (29), 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.

En los últimos años se ha prestado especial atención a identificar aquellas diferencias interindividuales que hacen que una persona sea más susceptible o que responda de forma diferente frente a diversas exposiciones ambientales. Se ha demostrado que distintos genes polimórficos de las GST son responsables del metabolismo de algunos plaguicidas (30). Las GSTs son un grupo de enzimas polimórficas que interviene en la detoxificación de los metabolitos electofílicos generados en la fase I del metabolismo, y que también protegen del daño oxidativo (31). Los genotipos GSTM1 y GSTT1 nulos se han asociado con incrementos en la frecuencia de cáncer y con un incremento de daño citogenético (32). En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en el índice de daño obtenido por Ensayo Cometa ni en los sitios FPG respecto a GSTM1 y GSTT1 positivo, resultados similares a los de otras investigaciones (33, 34). 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 genotóxi-

cos que aquellos con alelos favorables, no hay resultados concluyentes sobre si estos polimorfismos metabólicos afectan al daño cromosómico inducido por los plaguicidas (1). En la Argentina solo se han caracterizado los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1 en relación a la prevalencia de cierto tipo de cáncer en un monitoreo realizado en la provincia de Córdoba (35) donde la distribución de estos genes (evaluados en 215 personas) coincide con los realizados en este estudio. Estos resultados incentivan a la utilización de este biomarcador de susceptibilidad para nuevas evaluaciones relacionadas con exposición a diferentes mezclas de pesticidas de origen ambiental o laboral con el fin de analizar este factor.

Conclusiones

Utilizando el Ensayo Cometa modificado por el agregado de la enzima FPG se encontraron incrementos estadísticamente significativos de purinas oxidadas en el grupo de aplicadores de plaguicidas y de fumadores. Se observaron diferencias en el índice de oxidación de purinas al evaluar el tipo de actividad agrícola que realizaban los expuestos a mezclas de plaguicidas y también en función del equipo de protección utilizado mientras se desarrollaban las tareas de pulverización. Aunque que no se hallaron diferencias significativas respecto a los polimorfismos investigados, a los factores de confusión u otras variables laborales evaluadas.

Como valioso complemento a la epidemiología convencional, los biomarcadores pueden proporcionar información útil sobre los mecanismos moleculares implicados en la exposición ambiental y ocupacional. El daño inducido por los plaguicidas depen-

dería 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.

El tamaño de la muestra analizada aunque limitada, es representativo y las alteraciones halladas en este estudio podrían ser vinculadas a posibles efectos adversos en la salud derivados de la toxicidad crónica de mezclas de plaguicidas.

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Andrew R. Collins del Departamento de Nutrición, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oslo, Noruega, por la donación de la enzima FPG.

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto PI 09-50: Evaluación de la exposición a Plaguicidas en población expuesta directa e indirectamente a través de marcadores de Exposición.

Referencias bibliográficas

- Bolognesi, C.; Creus, A.; Ostrosky-Wegman, P. y Marcos, R., 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*. **26**, 1: 19-26.
- Carbonell, E.; Puig, F.; Xamena, N.; Creus, A. y Marcos, R., 1990. Sister chromatid exchange in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* **5**: 403-405.
- Dulout, F.N.; Lopez Camelo, J.S. y Guradze, H.N., 1992. Analysis of sister chromatid exchanges (SCE) in human population studies. *Rev. Brasil. Genet.* **15**: 169-182.
- Bolognesi, C.; Parrini, M.; Bonassi, S.; Ianello, G. y Salanitro, A., 1993. Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutat. Res.* **285**: 239-249.
- Scarpato, R.; Migliore, L.; Angotzi, G.; Fedi, A.; Miligi, L. y Loprieno, N., 1996. Cytogenetic monitoring of a group of Italian oriculturists. No evidence of DNA damage related to pesticide exposure. *Mutat. Res.* **367**: 73-82.
- Pasquini, R.; Scassellati-Sforzolini, G.; Angeli, G.; Fatigoni, C.; Monarca, S.; Beneventi, L.; Di Giulio, A.M. y Bauleo, F.A., 1996. Cytogenetic biomonitoring of pesticide exposed farmers in central Italy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **15**: 29-39.
- Amr, M.M., 1999. Pesticide monitoring and its health problems in Egypt; a Third World country. *Toxicol. Lett.* **107**: 1-13.
- Falck, G.C.M.; Hirvonen, A.; Scarpato, R.; Saarikoski, S.T.; Migliore, L. y Norppa, H., 1999. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1; GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* **441**: 225-237.
- Gomez-Arroyo, S.; Diaz-Sanchez, Y.; Meneses-Perez, M.A.; Villalobos-Pietrini, R. y De Leon-Rodriguez, J., 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican Foriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* **466**: 117-124.
- Lander, 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.
- Piperakis, S.M.; Kontogianni, K., Piperakis, M.M. y Tsilimigaki, S., 2006. Effects of Pesticides on Occupationally Exposed Humans. *Scientific World Journal.* **6**: 1211-1220.
- 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.
- Simoniello, M.F.; Scagnetti, J.A.; Mastandrea, C.; Grigolato, R.; Paonessa, A.; Gigena, F. y

- Kleinsorge, E.C., 2007. Biomonitoring de Población Rural expuesta a Plaguicidas. *FABICIB*. **11**: 73-85.
- 14.** 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.
- 15.** 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.
- 16.** Mañas, F.; Peralta, L.; Gorla, N.; Bosh, B.y Aissa, D, 2009. Aberraciones Cromosómicas en Trabajadores Rurales de la Provincia de Córdoba Expuestos a Plaguicidas. *J. Basic Appl. Genet.* **20**, 1: 09-13.
- 17.** Gedik, C.M.; Boyle, S.P; Wood, S.G.; Vaughan, N.J. y Collins, R., 2002. Oxidative stress in human: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis* **23**, 9: 1441-1446.
- 18.** Fuciarelli, M.; Caccuri, A.; De Francesca, M.; Ferazzoli, F.; Piacentini, S. y Porreca, F., 2009. Modulation of the GSTT1 activity by the GSTM1 phenotype in a sample of Italian farm-workers. *Arch. Toxicol.* **83**: 115-120
- 19.** Abdel-Rahman, S.Z.; El-Zein, R.A.; Anwar, W.A. y Au, W.W.; 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies; *Cancer Letters* **107** 229-233.
- 20.** 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.
- 21.** Collins, A. R.; Osoez, A. A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C. y Stetina, R., 2008. Review. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. **23**, 3: 143-151.
- 22.** Fenske, R.A.; Kissel, J.C.; Lu, C.; Kalman, D.A.; Simcox, N.J. y Allen, E.H.; 2000. Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community. *Environ Health Perspect.* **108**: 515-520.
- 23.** McCauley, L.A.; Lasarev, M.R.; Higgins, G.; Rothlein, J.; Muniz, J.y Ebbert; C.; 2001. Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: a community-based research approach. *Environ Health Perspect.* **109**: 533-538.
- 24.** 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.
- 25.** 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.
- 26.** 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.
- 27.** Dusinska, M. y Collins, A.R.; 2008. The Comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. **23**: 191-205.
- 28.** 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.
- 29.** 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.

30. Sultatos, L.G.; 1992. Role of glutathione in the mammalian detoxification for organophosphorus insecticides. "Organophosphates Chemistry; Fate and Effects" Academic Press (New York), 155-168.

31. Berhane, K; Widersten, M.; Engström, A.; Kozarich, J.W. y Mannervik, B.; 1994. Detoxication of base propenals and other α ; β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**: 1498-1484.

32. Pastor, S.; Creus, A.; Parrón, T.; Cebulska-Wasilewska, A.; Siffel, C.; Piperakis, S. y Marcos R; 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers; Mutagenesis **18**, 3: 249-258.

33. Da Silva, J.; Moraes, C.R.; Heuser, V.D.; Andrade, V.M.; Silva, F.R.; Kvitko, K.; Emmel, V.; Rohr, P.; Bordin, D.L.; Andreazza, 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.

34. Liu, Y.J.; Huang, P.L.; Chang, Y.F; Chen, Y.H.; Chiuo, Y.H.; Xu, Z.L. y Wong R.H.; 2006. GSTP1 Genetic Polymorphisms is Associated with a Higher Risk of DNA Damage in Pesticide-Exposed Fruit Growers; Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**, 4: 659-666.

35. Moore, L.E.; Wiencke, J.K.; Bates, M.N.; Zheng, S.; Rey, O.A. y Smith, A; 2004. Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina; Cancer Letters. **211**: 199-207.