



## Aberraciones Cromosómicas en Trabajadores Rurales de la Provincia de Córdoba Expuestos a Plaguicidas

MAÑAS FERNANDO<sup>(a,b)</sup>, PERALTA LAURA<sup>(a)</sup>, GORLA NORA<sup>(a,b)</sup>, BOSH BEATRIZ<sup>(c)</sup>, AIASSA DELIA<sup>(c)</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).

<sup>b</sup>CONICET. <sup>c</sup>Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico, Químicas y Naturales, UNRC.

Correspondencia: Delia Aiassa, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico, Químicas y Naturales, UNRC, Ruta 36, km 601- 5800- Río Cuarto (Cba), Argentina.

E-mail: daiassa@exa.unrc.edu.ar

### ABSTRACT

#### CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN WORKERS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO PESTICIDES IN CÓRDOBA

A preview genotoxic biomonitoring was carried out from a random sample in workers daily exposed to pesticides. Soy bean cultivation is the main activity of these rural workers from Córdoba. The total chromosomal aberrations (CA)/100 cells in the exposed group was  $11.50 \pm 4.33$  and  $7.71 \pm 3.45$  including and excluding gaps respectively, statistically different ( $p < 0.05$ ) from the reference group ( $5.25 \pm 2.77$  and  $2.58 \pm 1.83$ ). The most commonly pesticides used by the exposed group were glyphosate, cipermetrine and atrazine. The total amount of aberrant cells in the exposed group was  $11.21 \pm 3.87$  and  $7.50 \pm 3.00$  including and excluding gaps respectively, statistically different ( $p < 0.05$ ) from the reference group ( $5.08 \pm 2.71$  and  $2.58 \pm 1.83$ ). These findings showed the risk factor that represents pesticides exposure to human health in the studied group, compared with the reference group.

### RESUMEN

Se realizó el monitoreo citogenético preliminar de una muestra poblacional aleatoria integrada por trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas dada la intensa actividad agrícola que desarrollan, determinada principalmente por plantaciones de soja. Los plaguicidas más utilizados son glifosato, cipermetrina, atrazina. La cantidad de aberraciones cromosómicas (AC)/100 células y el porcentaje de células aberrantes, incluidos gaps, en el grupo de referencia ( $n = 12$ ) fue de  $5,25 \pm 2,77$  y  $5,08 \pm 2,71$ , y los valores para el grupo de expuestos ( $n = 14$ ):  $11,50 \pm 4,33$  y  $11,21 \pm 3,87$  ( $p < 0,05$ ). La cantidad de AC y el porcentaje de células aberrantes, gaps excluidos, en el grupo de referencia fue de  $2,58 \pm 1,83$  y en el grupo de expuestos:  $7,71 \pm 3,45$  y  $7,50 \pm 3,70$  ( $p < 0,05$ ). La mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas encontradas en los trabajadores rurales en comparación con el grupo de referencia pone de manifiesto el riesgo que representa la exposición a plaguicidas para la salud de esta población.

### INTRODUCCIÓN

El monitoreo de una población humana expuesta a agentes potencialmente dañinos es una herramienta valiosa en salud pública y ocupacional. En los grupos de trabajadores que son de alto riesgo por la naturaleza de los agentes físicos, químicos y biológicos a los que están expuestos terapéutica o accidentalmente, el monitoreo tie-

ne como objetivo ayudar a preservar la salud y la calidad de vida (Bolognesi, 2003, Gorla, 2006, Mudry y Carballo, 2006).

Los ensayos citogenéticos de aberraciones cromosómicas (AC) clásicos, como la búsqueda de gaps, roturas y dicéntricos; así como el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (MN), en linfocitos y en células epiteliales de las mucosas; o el uso de la citogenética

molecular para identificar el origen cromosómico de los micronúcleos, son importantes marcadores de efecto temprano, que permiten detectar un nivel de daño que todavía es reversible y por lo tanto permiten jugar un rol en la prevención. Estos ensayos son los marcadores más utilizados en estudios poblacionales (Hagmar et al. 1998, Cuenca y Ramirez, 2004, Bonassi et al. 2005).

Se presenta un monitoreo citogenético preliminar de trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas por la intensa actividad agrícola que desarrollan, determinada principalmente por plantaciones de soja.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de trabajo que se detalla cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas- IMBICE, La Plata. Después de obtener el consentimiento informado de los participantes y el cuestionario con datos personales y hábitos en la manipulación de plaguicidas, se tomó una muestra de sangre de 5 ml que ingresa al laboratorio con un código. El biomarcador de genotoxicidad empleado fue el ensayo de AC en sangre periférica (OECD, 1997) de catorce trabajadores rurales (fumigadores) como grupo de expuestos y de doce donantes urbanos, sin exposición laboral a sustancias agroquímicas, como grupo de referencia.

El cultivo de sangre periférica se realizó siguiendo procedimientos estándares (modificación de Moorhead et al., 1960) con RPMI-1640, suero fetal bovino al 20% y fitohemaglutinina, a 37 °C durante 48 horas. Para el análisis de las AC con coloración de Giemsa, los extendidos se observaron bajo el microscopio óptico con un aumento de 100X. Se calculó el índice mitótico: número de células en división por cada 1000 células. Se analizaron 100 metafases/ persona. Se registraron la cantidad AC por cada 100 células y el % de células aberrantes. Se analizaron AC de tipo estructural: rotura de una cromátida (ctb) y de dos cromátidas (csb); gap de cromátida (ctg) y de cromosoma (csg); cromosomas dicéntricos (dic) y fragmentos acéntricos (ace); endoreduplica-

ciones (end) y AC de tipo numérico (cambio en el número de cromosomas) sin especificar el par o grupo de cromosomas en el que se detectó la aberración. Análisis estadístico: Se comprobó si los resultados tenían una distribución normal empleando el test de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias entre expuestos y referentes se analizaron a través del test de Student, con un intervalo de confianza del 95%.

## Resultados y Discusión

La edad promedio del grupo de personas expuestas a plaguicidas fue de 40,4±12,7 años y para el grupo de referencia 35,3±11,8 años. Un solo participante (608) es fumador con un consumo de 10-12 cigarrillos diarios, durante 4 años. El tiempo de exposición laboral a plaguicidas varía entre 8 a 35 años. La periodicidad de aplicación está comprendida entre 6 y 8 meses por año. Los plaguicidas más utilizados son glifosato, cipermetrina y atrazina. Las fumigaciones son realizadas con mochila y máquinas fumigadoras. Las medidas de protección utilizadas son guantes y barbijos, y sólo en algunos momentos durante el proceso de fumigación. Los fumigadores no usan indumentaria destinada específicamente a la tarea (ej: mamelucos, botas).

La cantidad de aberraciones cromosómicas AC/100 células y el porcentaje de células aberrantes incluidos gaps, en el grupo de referencia fue de 5,25±2,77 y 5,08±2,71, y los valores para el grupo de expuestos: 11,50±4,33 y 11,21±3,87. La cantidad de AC y el porcentaje de células aberrantes, gaps excluidos, en ambos grupos fue de 2,58±1,83 y en el grupo de expuestos: 7,71±3,45 y 7,50±3,00 (Tabla I). Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de expuestos y grupo control en los dos parámetros analizados ( $p < 0,05$ ). El participante fumador tiene valores de AC muy próximos a la media de su grupo. En todos los individuos expuestos se observaron gaps y roturas de cromátidas y cromosomas y no se observaron dic. En el grupo de referencia no se observaron roturas de cromosomas, dicéntricos ni acéntricos. (Tabla I). Tanto los

Grupo de referencia	Sexo	Edad	ctb	csb	ctg	csg	ace	end	AC/100 cél incluyendo gaps	% de células aberrantes incluyendo gaps	AC/100 cél excluyendo gaps	% de células aberrantes excluyendo gaps	Índice mitótico
601	M	31	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	7
602	F	17	1	0	6	1	0	1	9	8	2	2	11
605	M	40	1	0	0	1	0	0	2	2	1	1	10
606	M	40	2	0	2	1	0	0	5	5	2	2	7
609	F	50	4	0	1	0	0	0	5	5	4	4	7
706	M	45	0	0	4	0	0	0	4	3	0	0	8
707	M	17	1	1	2	1	1	1	7	7	4	4	10
714	M	39	0	0	1	0	0	1	2	2	1	1	11
809	M	25	3	0	2	0	0	0	5	5	3	3	13
909	M	50	3	0	4	1	2	0	10	10	5	5	9
910	M	44	2	0	1	1	1	1	6	6	4	4	10
912	M	26	4	0	2	0	1	0	7	7	5	5	12
									5,25± 2,77	5,08± 2,71	2,58± 1,83	2,58± 1,83	9,58± 2,02
Grupo de expuestos													
603	F	41	10	3	5	2	3	1	24	22	17	15	10
604	M	48	4	3	4	1	2	0	14	14	9	9	8
607	M	56	2	6	3	2	0	0	13	13	8	8	8
608	M	26	2	3	2	2	0	2	11	11	7	7	9
703	M	61	1	2	4	2	0	1	10	10	4	4	7
704	M	32	3	2	1	0	1	3	10	10	9	9	13
705	M	38	2	2	4	0	0	1	9	9	5	5	11
708	M	38	6	2	3	1	0	2	14	13	10	9	12
709	M	37	8	1	2	0	0	1	12	12	10	10	9
710	M	43	1	0	3	0	0	7	11	11	8	8	8
711	M	28	4	1	2	0	1	1	9	9	7	7	7
712	M	17	1	0	1	1	1	1	5	5	3	3	10
814	F	51	4	1	2	1	0	0	8	8	5	5	11
815	M	54	2	1	0	5	2	1	11	10	6	6	12
									11,50*± 4,33	11,21*± 3,87	7,71*± 3,45	7,50*± 3,00	9,64± 1,95

AC= aberraciones cromosómicas; F= femenino, M= masculino; ctb= rotura de una cromátida; csb= rotura de cromosoma; ctg= gap de cromátida; csg= gap de cromosoma; ace= fragmento acéntrico; end= endoreduplicación. \*diferencia significativa con el grupo de referencia ( $p < 0,05$ ).

Tabla I- Frecuencias de Aberraciones Cromosómicas en un grupo de trabajadores rurales fumigadores y el correspondiente grupo de referencia

gaps como las roturas de una cromátida predominan sobre las aberraciones que involucran ambas cromátidas de un cromosoma. La proporción de células endoreduplicadas es significativamente mayor en el grupo de expuestos. Esto sugiere que está afectada la división celular lo cual, de no ser eliminada la célula aberrante, puede conducir a células con aberraciones cromosómicas numéri-

cas (poliploides). Sin embargo, en las personas estudiadas no se detectaron poliploidías ni otros tipos de aberraciones estructurales complejas, tales como figuras trirradiales o tetrarradiales. Esta elevada frecuencia de roturas de cromátidas en la población de trabajadores rurales expuestos a plaguicidas podría ser causada por el efecto de los residuos de sustancias genotóxicas acumula-

das en las células. Este efecto dañino se expresa en forma de AC, que se producen cuando las células pasan por la fase de síntesis en su ciclo celular (Albertini et al., 2000).

La mayor frecuencia de AC y células aberrantes encontradas en este estudio preliminar de trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba, pone de manifiesto el riesgo que representa la exposición a plaguicidas para la salud de esta población. Estas observaciones se suman a las de otros estudios que demuestran la actividad mutagénica de los compuestos químicos que contienen los plaguicidas indicados por la presencia de AC (Antonucci y Colus 2000, Bolognesi, 2003, Ergene 2007). En nuestro país (Buenos Aires) Dulout et al. (1985) estudiando grupos laboralmente expuestos: floricultores de viveros que manipulaban mezclas de plaguicidas (carbamatos, organofosforados y organoclorados) mediante ensayo de AC e ICH, encontraron resultados positivos. En Uruguay, un estudio reciente informa una mayor tendencia al daño genético en niños y en mujeres, expresado a través de AC, cometas y porcentaje de células apoptóticas, de una población rural caracterizada por una intensa actividad agrícola en invernaderos horticólicas, plantaciones de caña de azúcar y plantaciones de arroz, expuesta a 2-4D, carbofuran, clorpirifos, cipermetrina, glifosato y endosulfán (Laborde et al., 2006). Resultados similares a través del ensayo de MN en células epiteliales bucales (Moura de Bortolia et al., 2009), y el ensayo cometa y de MN en sangre de trabajadores fumigadores (Remor et al., 2009) son informados para Brasil, líder mundial en el consumo de plaguicidas.

Por otro lado existen evidencias experimentales y epidemiológicas que las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas están involucradas en la carcinogénesis (Mitelman, 1997). Además, a nivel de grupo, una frecuencia aumentada de AC en sangre periférica está asociada con un riesgo general aumentado de cáncer (Hagmar, 1994, 1998, Bonassi et al., 2005).

En los estudios de monitoreo de poblaciones expuestas, el empleo de marcadores biológicos

como las AC, puede ayudar a fortalecer las estrategias de prevención, al permitir identificar poblaciones en riesgo de padecer diferentes enfermedades (Au et al., 2001). Para implementar estas estrategias también es necesario contar con leyes, basadas en datos científicos obtenidos localmente, que fomenten la vigilancia y el control de los problemas de salud (Shibuya et al., 2003). El porcentaje aumentado de AC y células aberrantes detectado en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas compromete a profundizar el estudio como actualmente se está realizando, complementando el ensayo de AC con biomarcadores como el ensayo cometa y el de micronúcleos (Mañas et al., 2008) como así también aumentando el número de personas expuestas y controles.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto "Biomarcadores citogenéticos del potencial genotóxico en la exposición laboral a agroquímicos" subsidiado por Agencia Córdoba Ciencia y Universidad Nacional de Río Cuarto. Los autores agradecen a todas las personas que voluntariamente participaron en este estudio.

## REFERENCIAS

- 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., Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463: 111-172.
- Antonucci, G.A., Colus I.M. (2000). Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20:265-272.
- Au, W.W., Badary, O.A., Heo, M.Y. (2001). Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. *Occup. Med.* 16:345-57.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesti-

- des: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, 51–272.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R. y Tucker, J. (2005). Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45: 2-3, 258–270.
- Cuenca, P. y Ramírez, V. (2004). Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev. Biol. Trop.* 52: 219-224.
- Dulout, F., Pastori, M.C., Olivero, O.A., Gonzales Cid, M., Loria, D., Matos, E., Sobel, N., Bujan, C.E., Albiano, N. (1985). Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 143: 237-244.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T., Kaya, F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ. Internat.* 33: 877–885.
- Garj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2002). Assessment of genome damage in a Croatian population worker employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J. Appl. Toxicol.* 22, 249- 255.
- Gorla, N. B. M. (2006). Efectos tóxicos sobre el material genético, mutagénesis y carcinogénesis. Imprenta de la Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C. (1988). The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 58: 4117-4121.
- Laborde, A; Martínez, L., Martínez-López W., Méndez-Acuña, L., Morador, M. J., Fuster, T., Sponton, F., Tomasina, F. (2006). Evaluación clínica y biomarcadores de genotoxicidad en una población de niños y adultos expuestos a múltiples plaguicidas. *Acta Toxicol. Argent.* 14: 31-33
- Mañas, F., Aiassa, D., Peralta, L., Gentile, N., Gorla, N. (2008). Biomarcadores de genotoxicidad en una población de trabajadores rurales expuestos a agroquímicos. XXXVII Congreso Argentino de Genética, Sociedad Argentina de Genética.
- Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, F. (1997). A break point map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet.* 15: 417–474.
- Moorhead, R., Howell, P., Mellman, W., Batteps, W., Hundgerford, D. (1960). Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 2, 613-616.
- Moura de Bortolia, G., Barbieri de Azevedoa M., Basso da Silvab L. (2009). Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat. Res.* 675: 1-4.
- Mudry, M. y Carballo, M. (2006). *Genética Toxicológica*, Ed. De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires.
- OECD (1997). Test guideline 473. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, París.
- Remor, A. P., Caprini Totti, C., Alves Moreira, D., Pimentel Dutra, G., Dahlström Heuser, V., Marlei Boeira, J. (2009) Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Internat.* 35: 273-278.
- Shibuya, K., Ciecierski, C., Guindon, E., Bettcher, D.W., Evans, D.B., Murria, C.J. (2003). WHO Framework Convention on Tobacco Control: development of an evidence based global public health treaty. *Br. Med. J.* 327:154–7.

