

BIOMONITOREO CITOGÉNÉTICO DE JORNALEROS OCUPACIONALMENTE EXPUESTOS A PLAGUICIDAS

Cytogenetic biomonitoring of workers occupationally exposed to complex mixtures of pesticides

Dra. Carmen Martínez Valenzuela

Profesor Investigador SNI I
Instituto de Investigación en Ambiente y Salud
Universidad de Occidente. México
Contacto: maria.martinezv@udo.mx

Dr. Rubén Félix Gastélum

Profesor Investigador SNI II
Instituto de Investigación en
Ambiente y Salud
Universidad de Occidente. México

Dra. Arlene Guadalupe Mora Romero

Profesor de Tiempo Completo
Instituto de Investigación en Ambiente y Salud
Universidad de Occidente. México

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez

Profesor Investigador
Departamento Ciencias Biológicas
Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. México

Recibido: 12/06/2015 Aceptado: 11/08/2015

RESUMEN

Mediante el biomarcador intercambio de cromátidas hermanas (ICH) se evaluó el daño genotóxico en jornaleros agrícolas de San José, Ahome, Sinaloa, México, ocupacionalmente expuestos a mezclas de plaguicidas. El grupo expuesto se integró con 60 individuos con un promedio de 7 años de exposición ocupacional y el grupo no expuesto estuvo conformado por un número similar de participantes. Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en las frecuencias de ICH, CPC e IM. El análisis estadístico muestra correlación entre el tiempo de exposición y la frecuencia de ICH. Estos resultados pueden atribuirse a la exposición a plaguicidas por parte de los trabajadores de campo.

Palabras clave: Intercambio de cromátidas hermanas, biomarcadores, linfocitos humanos.

ABSTRACT

Genotoxic damage was evaluated in 60 agricultural workers, exposed to pesticides in San José, Ahome, Sinaloa, Mexico, with an average of 7 years of exposure. The effect was detected through the sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes of peripheral blood. Also, the influence on cellular proliferation kinetics (CPK) was studied by means of the replication index (RI) and the cytotoxic effect was examined with the mitotic index (MI). The non-exposed group consisted of 60 other persons. Significant differences between the exposed and the non-exposed groups were observed in SCE, CPK and MI. There was a correlation between exposure time to pesticides and SCE frequency. These results could have been due to the exposure of workers to pesticides containing different chemical compounds.

Keywords: Sister chromatid exchange, Biomarkers, Human lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son compuestos biocidas utilizados ampliamente en todo el mundo para combatir plagas diversas (Bortoli, Barbieri & Basso, 2009), representan una de las familias de productos químicos más empleadas por el hombre para el control de plagas agrícolas y su aplicación se considera la medida más aceptada y efectiva para lograr la máxima producción y la mayor calidad de los cultivos. El consumo y la variedad de plaguicidas usados a nivel mundial se ha incrementado dramáticamente a la par del aumento de la población y de la producción agrícola (Zhang, Jiang & Feng, 2011). En mayor o menor grado la población humana está inevitablemente expuesta a los plaguicidas a través de la contaminación ambiental ya sea en forma física o biológica, por medio de compuestos que circulan en aire, agua, suelo y alimentos (Bolognesi, 2003). Todos los plaguicidas son biocidas, lo que implica que habitualmente tienen elevada toxicidad en seres humanos, lo que ha sido motivo de preocupación, debido a su uso indiscriminado (Ferrer, 2003). La vigilancia en las poblaciones agrícolas expuestas a plaguicidas representa una herramienta útil para estimar el riesgo a largo plazo de sus efectos sobre la salud.

El estado de Sinaloa destaca a nivel nacional por la relevancia de su actividad agrícola, situación que le permite mantener un liderazgo en la producción de alimentos y materias primas derivadas de la agricultura, sin embargo, resulta innegable que las características ambientales de la zona favorecen la presencia de plagas y enfermedades durante todo el año, provocando con ello una serie de problemas que se reflejan tanto en la cantidad, como en la calidad de la producción. Entre las estrategias de combate de plagas se ha privilegiado el uso de plaguicidas, situación que ha generado una cultura productora ligada a este tipo de insumos. La gama de los efectos dañinos para la salud provocados por los plaguicidas, incluye lesiones agudas y persistentes sobre el sistema nervioso, pulmón y en órganos reproductores, disfunción del sistema inmunológico y endócrino. Además se vinculan como generadores de estrés oxidante y daño al ADN con efectos graves como enfermedades neurológicas, del sistema reproductor y cáncer (Muñiz et al., 2008).

Los estudios de biomonitorio en poblaciones agrícolas muestran resultados muy diversos, pues se han utilizado biomarcadores tales como aberraciones cromosómicas (AB) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células de sangre periférica, para evaluar poblaciones heterogéneas expuestas (Carbonell, Puig, Xamena, Creus & Marcos, 1993; Bolognesi, Perrone & Landini, 2002).

Biomarcador intercambio de cromátidas hermanas

Este biomarcador es sensible para detectar daño al ADN, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) son eventos que se producen durante la fase de síntesis. Representa el intercambio simétrico, entre loci homólogos, de productos de replicación (Norppa, 2004). Ocurren sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica y es posible detectarlos en preparaciones cromosómicas en metafase obtenidas de cultivos adicionados con el análogo de una base del ADN que es la 5-bromodesoxiuridina (Latt, 1973). Los ICH no son sucesos letales para la célula, además, por sí mismos, no pueden ser considerados mutaciones ya que, en principio, no producen cambios en la información genética. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas aumenta cuando las células son expuestas a agentes mutagénicos y cancerígenos conocidos y en el caso de ciertas enfermedades congénitas como el síndrome de Bloom, Xeroderma pigmentosum (Wolf-Dieltrich, 2004) y la enfermedad de Behcet (Ikbal et al., 2006). Se puede observar incremento en la frecuencia de ICH por exposición de las células a agentes clastogénicos, lo que ha permitido que se reconozca como un evento indicador de daño al ADN (Zeljetic & Garaj-Vrhovac, 2002). Este biomarcador se utiliza en investigaciones sobre monitoreo biológico de individuos expuestos a agentes genotóxicos potenciales o conocidos (Cavallo et al., 2006).

Exposición ocupacional

Los efectos citogenéticos de los plaguicidas han sido estudiados tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, los efectos sobre personas que trabajan con estas sustancias en nuestro país han sido poco analizados (Gómez-Arroyo et al., 1992; Gómez-Arroyo, Díaz-Sánchez, Meneses-Pérez, Villalobos-Pietrini & De León-Rodríguez, 2000; Martínez-Valenzuela et al., 2009). Al respecto, las exposiciones ocupacionales a plaguicidas ocurren en agricultores, peones de campo, obreros industriales, exterminadores de plagas, trabajadores de invernaderos, entre otros, que constantemente presentan el riesgo de sufrir accidentes relacionados con estos productos. También la población en general está expuesta a través de las cadenas tróficas, al consumir alimentos contaminados por estos compuestos, por el empleo de insecticidas caseros, por dispersión en el ambiente (deriva ambiental), etc. (Bolognesi et al., 1993; Falck et al., 1999).

Diversos estudios de biomonitorio dirigidos a individuos expuestos a plaguicidas, realizados en diferentes

partes del mundo, evidencian la inducción de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos en personas en contacto ocupacional (Pastor et al., 2003). Trabajos desarrollados en este ámbito se han desarrollado en México, uno en el Estado de Morelos, donde mediante el análisis de ICH se determinó que los trabajadores dedicados a la floricultura, presentaron daños citogenéticos al compararlos con los individuos no expuestos (Gómez-Arroyo et al., 2000); otro estudio mostró daño genotóxico en jornaleros ocupacionalmente expuestos a plaguicidas en el Estado de Sinaloa utilizando ICH y Micronúcleos como biomarcadores (Martínez et al., 2009). En el contexto internacional se describen estudios realizados en trabajadores expuestos en viñedos, campos algodonereros y áreas forestales, encontrando también diferencias significativas entre los grupos expuesto y no expuesto (Páldy, Puskás, Vincze & Hadházi, 1987; Bolognesi, 2003). A través de los años se ha incrementado la atención sobre la probable carcinogenicidad y mutagenicidad causada por la exposición prolongada a plaguicidas; la importancia social de las investigaciones realizadas en el ámbito de la citogenética radica en el reconocimiento temprano de factores carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en individuos ocupacionalmente expuestos a compuestos genotóxicos (Nehéz et al., 1981; Pastor et al., 2003). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico mediante el Biomarcador ICH, sobre los jornaleros agrícolas ocupacionalmente expuestos a plaguicidas en San José, Municipio de Ahome, Sinaloa y se desarrolló durante el ciclo agrícola de otoño – invierno de 2013.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la zona agrícola de San José, Municipio de Ahome, Sinaloa, México. En la colecta de muestras se consideraron los procedimientos de Carrano y Natarajan (1988), y para determinar la relación entre efecto genotóxico y exposición de las personas a los plaguicidas se ha recurrido al biomarcador de efecto: intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica siguiendo el procedimiento de Perry y Evans (1975). También se analizó el IR el TPC y el IM. Se obtuvo por escrito el consentimiento de los participantes. El grupo expuesto se integró por 60 jornaleros agrícolas ocupacionalmente expuestos a plaguicidas con un tiempo de exposición promedio de 7 años laborando en los campos de cultivo de Chile. La Tabla 1 presenta los plaguicidas que son utilizados con mayor frecuencia en esta área. El grupo no expuesto se integró con 60 individuos, que habitan en la ciudad de Los Mochis, Sinaloa y sus trabajos no se relacionan con actividades agrícolas.

Toma de muestras de sangre periférica y cultivo de linfocitos para ICH

Se tomaron 3 ml de sangre periférica a cada participante, utilizando jeringa heparinizada, manteniendo la sangre a 37 °C antes de ser procesada. A 100 ml de medio de cultivo Gibco RPMI 1640 se le adicionaron 4 ml de fitohemaglutinina (Gibco) (filtrada con membrana miliporo de 0.45 µm). En cada tubo de cultivo se agregaron 3 ml de RPMI y se añadieron 8 gotas de sangre, cada muestra se hizo por triplicado, los tubos se incubaron a 37°C durante 72 horas. Al cumplirse las 24 horas de cultivo, se agregaron 100 µl del análogo de la timina, 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma), a una concentración de 5 µg/ml para lograr la tinción diferencial de las cromátidas hermanas (Perry & Wolf, 1974) y se incubaron nuevamente a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de colchicina (Sigma) a concentración de 0.002 g/ml en 10 ml y dos horas después se cosecharon por centrifugación a 1200 rpm, durante 10 min. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Las células se hipotonizaron agregando 8 ml de cloruro de potasio (KCl a 0.075 M). Los tubos se incubaron a 37 °C por 20 minutos y se fijaron con metanol-ácido acético (3:1) durante 10 min.

Tinción diferencial

Las laminillas se colocaron en Hoescht 33258 [1:9] a una concentración final de 250 µg/ml durante 30 minutos en oscuridad, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar; se irradiaron con luz ultravioleta durante una hora. Se lavaron en agua corriente y se dejaron secar, posteriormente fueron colocadas en citrato de sodio salino (2XSSC a 60 °C), por 20 minutos y se lavaron con agua corriente, se secaron y tiñeron con Giemsa (al 10 %) por 2 min. Una vez teñidas las laminillas fueron etiquetadas con una nueva clave asignada y desconocida para el observador, con el fin de evitar algún tipo de prejuicio al realizar el registro de ICH. Para la lectura de laminillas se observaron 50 células en metafase de segunda división para cada individuo.

Para analizar el Índice de replicación (IR) se utilizó la tinción diferencial. La proporción de células de primera, segunda y tercera divisiones celulares fue determinada en 100 metafases consecutivas y el índice de replicación se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$IR = \frac{1(M1)+2(M2)+3(M3)}{100}$$

El Tiempo de la cinética de proliferación (TCP), se calculó a través de la fórmula propuesta por Ivett y Tice (1982).

Tabla1. Plaguicidas más frecuentemente utilizados por el grupo expuesto.

	Organoclorados	Organofosforados	Carbamatos	Piretroides	Neonicotinoides	Triazina	Triazol	Otros
Insecticidas		Clorpirifos (II)	Aldicarb* (Ia, 3)	Betaciflutrin* (Ib)	Acetamiprid			Abamectina*
		Dimetoato* (II)	Carbofurán* (Ib)	Bifentrina* (II)	Clotianidina*			Novalurón (U)
	Endosulfan* (II)	Malatión* (III, 3)	Metomilo* (Ib)	Lambda Cihalotrina* (II)	Imidacloprid* (II)			Sulfoxaflor*
		Monocrotofós* (Ib)	Oxamil* (Ib)	Cipermetrina* (II)	Tiametoxam*	Ciromazina (III)		
		Paratión metílico* (Ia, 3)		Deltametrin* (3, II)				
Herbicidas				Permetrina* (II, 3)				2,4,D (II)
				Zeta cipermetrina* (Ib)				Dicamba (II)
						Atrazina* (III, 3)		Glifosato (III)
								Nicosulfurón (U)
								Paraquat* (II)
Fumigicidas	Pentaclorofenol* (Ib, 2B)		Benomil* (U)				Difenoconazole (II)	Azoxystrobin (U)
	Quintozeno (3)		Mancozeb* (U)				Epoxiconazole*	Boscalid (U)
			Tiram* (3)				Propiconazole (II)	Captan (U, 3)
							Tebuconazole (II)	Carbendazim* (U)
								Carboxin (III)
								Clorotalonil* (U, 3)
								Cymoxanil (II)
								Dimetomorf
								Fluazinam
								Fluoxastrobin
							Fosetil aluminio (U)	

		Mandipropamida (U)
		Metalaxil (II)
		Oxicloruro de cobre
		Procloraz (II)
		Pyraclostrobin
		Tiabendazol (III)
		Metil tiofanato* (U)
		Trifloxystrobin (U)
	Metam sodio* (II)	Bromuro de metilo* (FM, 3)

IARC (2012): 1= Carcinógeno en humanos, 2A= Probable carcinógeno para humanos, 2B= Posible carcinógeno para humanos, 3= No clasificable en carcinógeno para humanos, 4= Probable no carcinógeno para humanos.

WHO (2009) clasificación de peligrosidad: Ia= extremadamente peligroso, Ib= altamente peligroso, II= moderadamente peligroso, III= ligeramente peligroso, U= poco probable que presente riesgo agudo en uso norma, FM= Fumigante, O= Obsoleto como plaguicida, no clasificados.

PAN (2014): * = plaguicidas que aparecen en la lista de plaguicidas altamente peligrosos de PAN Internacional.

© Martínez, C., Gómez, S., Félix, R., Mora, A., Ortega, L., *Revista Ciencia desde el Occidente*, Vol. 2, Núm. 2, 2015

TCP= Tiempo en presencia de la 5-BrdU
IR

El Índice mitótico (IM), fue determinado como el número de metafases que se encuentran en 3000 células estimuladas y para calcularlo se utilizó la fórmula siguiente: $IM=M/TC$

Análisis estadístico

La prueba t de Student aplicada a los resultados obtenidos de ICH y de IR.

El análisis de varianza (ANOVA) permitió determinar el efecto sobre la cinética de proliferación celular donde los valores encontrados son significativos ($P < 0.001$). Tukey-Kramer permitió identificar los grupos que muestran diferencias significativas ($P < 0.001$). El análisis de correlación se realizó entre el tiempo de exposición a plaguicidas y la frecuencia de ICH. Se utilizó el programa Statistica 7 Re. 6.

RESULTADOS

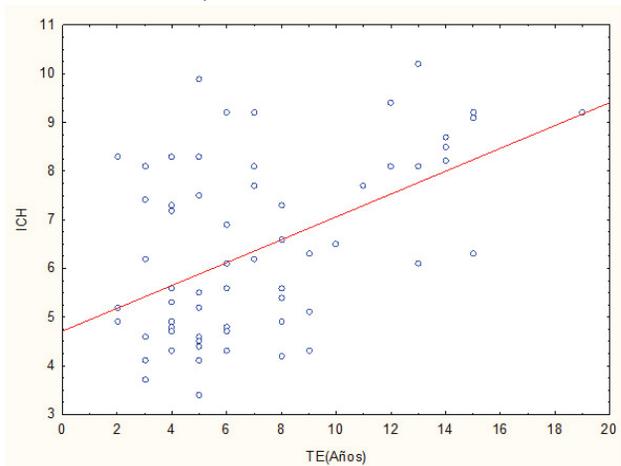
Se obtuvo la información referente a los principales plaguicidas utilizados por el grupo expuesto, éstos per-

tenecen principalmente al grupo de organofosforados, carbamatos, y además de algunos piretroides y otros (Tabla 1). Se resalta la situación particular de que el grupo expuesto maneja de manera constante mezclas de estos productos buscando obtener mejores resultados. La mayoría de los compuestos utilizados por el grupo expuesto presentan propiedades mutagénicas que potencialmente pueden generar la inducción de ICH.

Los promedios generales obtenidos de ICH, para el grupo expuesto fueron 7 ± 0.2 y para el no expuesto 3.8 ± 0.9 . Al aplicar la prueba de *t Student*, la diferencia fue significativa con $P < 0.0001$. El análisis de la correlación entre los valores promedios de ICH y tiempo de exposición a plaguicidas muestra que existe correlación significativa con $P < 0.0001$ (Figura 1, Tabla 2).

Los resultados obtenidos en las frecuencias de ICH en relación al tiempo de exposición se analizaron también formando rangos divididos por periodos de tiempo de exposición en la búsqueda de correlaciones más estrechas, sin embargo no se observó que los datos sigan alguna tendencia, lo cual se puede atribuir a que la población estudiada presenta características heterogéneas y que al se-

Figura 1. Correlación de Pearson entre tiempo de exposición TE (Años) y frecuencias de ICH en el grupo expuesto. Valor de $r = 0.5392$, $n = 60$



© Martínez, C., Gómez, S., Félix, R., Mora, A., Ortega, L., *Revista Ciencia desde el Occidente*, Vol. 2, Núm. 2, 2015

pararla en rangos se reduce significativamente el tamaño de muestra.

En la evaluación de la cinética de proliferación celular (CPC) de este estudio se muestra que el comportamiento del grupo no expuesto fue aproximado a lo normal de acuerdo con el criterio establecido por algunos autores, teniendo 29 % metafases de primera, 47 de segunda y 24 de tercera división, acercándose al comportamiento hipotético planteado en un ciclo celular donde no interfiere compuestos genotóxicos con valores de 25 % de primera, 50 % de segunda y 25 % de tercera división (Tabla 3); mientras que en el grupo expuesto M1 fue 23 M2 disminuyó significativamente a 34 y M3 aumentó significativamente al 43 lo cual se observó al aplicar ANOVA y la de comparación múltiple de Tukey-Kramer (Tabla 3). Los

datos obtenidos para el grupo expuesto se inclinan hacia una reducción en el número de metafases de segunda y un aumento considerable de terceras divisiones, lo cual sugiere que la exposición a plaguicidas ha ocasionado aceleración del ciclo celular ya que la frecuencia de M3 fue significativamente elevada.

Al aplicar la prueba U de Mann-Whitney a los valores del índice mitótico, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos y no expuestos a mezclas de plaguicidas. El índice de replicación (IR), a través de la prueba *t de Student* no fue significativo al comparar ambos grupos (Tabla 3). Al calcular el tiempo de la cinética de proliferación (TCP) se obtuvieron los siguientes datos: 21.5 h de TCP para el grupo expuesto y 25 h para el grupo no expuesto, al analizar estos resultados a través de prueba de χ^2 , se obtuvo una $P < 0.001$ que resultó significativa, observándose un comportamiento acelerado en el TCP del grupo expuesto.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado la preocupación por las consecuencias y riesgos hacia la salud humana generados por la exposición ocupacional a plaguicidas y aun cuando es conocido que estos son agentes químicos tóxicos, también se sabe que sus beneficios hacia la sociedad son grandes ya que han permitido potencializar la economía en términos de mejoras en la cantidad de producción agrícola en el mundo al disminuir las plagas y vectores de enfermedades. En los campos agrícolas sinoenses, hombres, mujeres, niñas y niños están expuestos a los plaguicidas, aunque con diferentes frecuencias e intensidades, pero es posible considerar que los que tienen mayor contacto con estas sustancias son los aplicadores.

Los campesinos participantes en el presente estudio, se han expuesto de forma ocupacional a mezclas de pla-

Tabla 2. Frecuencias de Intercambio de Cromátidas Hermanas en jornaleros del grupo expuesto e integrantes del grupo control.

	GRUPO EXPUESTO			GRUPO NO EXPUESTO	
	Edad (años)	Duración de exposición (años)	ICH/metafases $\bar{x} \pm E. E.$	Edad (años)	ICH/metafases $\bar{x} \pm E. E.$
Promedio	37	7	7.0*	38	3.8
E.E.	1.8		0.2	1.5	0.9

* t Student (cuando se compararon los grupos expuesto y no expuesto) $P < 0.0001$

© Martínez, C., Gómez, S., Félix, R., Mora, A., Ortega, L., *Revista Ciencia desde el Occidente*, Vol. 2, Núm. 2, 2015

Tabla 3. Cinética de proliferación celular, índice de replicación (IR) e índice mitótico (IM) en jornaleros agrícolas expuestos a plaguicidas y grupo no expuesto.

	GRUPO EXPUESTO					GRUPO NO EXPUESTO				
	M1	M2	M3	IR	IM	M1	M2	M3	IR	IM
PROMEDIO	23	34*	43*	2.2	4.5	39	47*	24*	1.72	4.2
E.E.	1.25	1.023	1.70	0.21	0.16	0.72	1.34	0.51	0.14	0.19
MEDIANA	23	31	42	2.4	4.7**	28	46.5	23.7	1.7	3.9

*Diferencias significativas entre el grupo expuesto y no expuesto se observan con el Análisis de varianza encontrando $F = 59.39$, $P < 0.0001$. Se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer obteniendo $P < 0.001$ **Significativo con U de Mann Whitney

© Martínez, C., Gómez, S., Félix, R., Mora, A., Ortega, L., *Revista Ciencia desde el Occidente*, Vol. 2, Núm. 2, 2015

guicidas constituidos por diferentes ingredientes activos en su mayoría organofosforados, carbamatos y otros, algunos de ellos prohibidos por tener actividad mutagénica y carcinogénica ya demostrada (Rupa, Reddy, Sreemanarayana & Reddi, 1991; Falck et al., 1999). Los plaguicidas pertenecientes a estos grupos son inhibidores de la colinesterasa y otras enzimas, por la afinidad que tienen al combinarse con las proteínas del plasma sanguíneo, lo que genera alteraciones en las reacciones enzimáticas, provocando que se originen derivados o formas activas que ocasionan daños al ADN (Hollingsworth, 1981).

No es posible determinar el daño causado por cada plaguicida utilizado por el grupo expuesto, debido principalmente a que la exposición es a mezclas complejas. Sin embargo es bien conocida la acción genotóxica de cada uno de estos plaguicidas en condiciones *in vitro*, además, se sabe que los agentes tóxicos pueden diferir en el tipo y número de lesiones inducidas al ADN y en el efecto biológico que ocasionan.

La mayoría de las sustancias consideradas genotóxicas y/o carcinogénicas son altamente electrofílicas y tienen la capacidad de unirse covalentemente a moléculas biológicas como el ADN y ARN. En compuestos organofosforados como el clorpirifos, el grupo fosforilo es un sitio electrofílico potencial que puede reaccionar con el ADN y su grupo alquilo tiene la capacidad de interactuar con centros nucleofílicos de la molécula como el nitrógeno 7 de la guanina (Vindas, Ortiz, Ramírez & Cuenca, 2004). De este modo, el clorpirifos podría estar actuando como agente alquilante (AA). Los AA pueden reaccionar con centros altamente nucleofílicos del ADN (átomos de nitrógeno) o poco nucleofílicos (átomos de oxígeno). La alquilación de los oxígenos está relacionada con efectos mutagénicos y oncogénicos, mientras que la de los nitrógenos se asocia

con citotoxicidad (Qiao, Seidler, Violin & Slotkin, 2003).

Lo anterior permite suponer que el uso frecuente e indiscriminado de este tipo de mezclas de plaguicidas provoca alteraciones en la salud de los jornaleros, a pesar de que en este grupo existen personas con periodos largos y cortos de trabajo en contacto directo a plaguicidas, observándose valores de ICH similares en ambos casos. Sin embargo, es de esperarse que los individuos con mayor tiempo de laborar con estos compuestos presenten más alteraciones (Shaham, Kaufman, Gurchich & Levi, 2001; Bolognesi, 2003). En este trabajo se observó correlación entre el tiempo de exposición y la frecuencia de ICH. Estos resultados coinciden con Gómez-Arroyo et al., (2000) Martínez-Valenzuela et al., (2009); Pastor, Gutiérrez, Creus, Cebulska-Wasilewska & Marcos, (2001a), Pastor et al. (2001b) y Pastor, Creus, Xamena, Siffel & Marcos (2002).

Estudios realizados en varios países como Croacia (Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2001; Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2002), Dinamarca (Lander & Ronne, 1995), Israel (Shaham et al., 2001), México (Gómez-Arroyo et al., 2000; Martínez-Valenzuela et al., 2009) Pakistán (Bhalli Khan, Haq, Khalid, & Nasim, 2006), Portugal (Costa et al., 2006) y Turquía (Ergene, Çelik, Çavaş & Kaya, 2007,) reportan frecuencia alta de ICH en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas, principalmente organoclorados, y organofosforados. Lo anterior puede atribuirse a factores como la edad, mezclas de plaguicidas, polimorfismo genético, métodos de aplicación, nivel genotóxico de los compuestos utilizados y la interacción de todas estas características (Martínez-Valenzuela & Gómez-Arroyo, 2007).

Por otro lado, el índice de proliferación celular constituye un criterio para evaluar los cambios en la replicación al acelerar o inhibir la duración del ciclo celular y en algunos casos provocar efectos en las respuestas inmunológicas.

cas de las células. Diversas investigaciones llevadas a cabo para evaluar alteraciones en el ciclo celular, muestran que algunos compuestos organofosforados como malatión y paratión empleados en la agricultura dañan al ADN e inducen aumento significativo en el índice de replicación y en la cinética de proliferación celular en linfocitos humanos *in vitro* (Sobti, Krishan & Pfaffenberger, 1982).

En el presente estudio se mostró que en el grupo expuesto a plaguicidas, se produjeron alteraciones en la cinética de proliferación celular, ya que las células M2 decrecieron pero las de M3 incrementaron significativamente su número, lo que sugiere que la exposición a plaguicidas ha inducido aceleración en el ciclo celular; asimismo se observó diferencia significativa en el IM.

Este comportamiento fue similar en trabajadores del Estado de Morelos y Sinaloa, México (Gómez-Arroyo et al., 2000; Martínez-Valenzuela et al., 2009). Estos resultados sugieren que cuando la cinética de proliferación celular muestra aceleración, el IR no aumenta ya que los cambios en sus valores de IR se incrementan cuando hay retraso, lo que refleja la inhibición de la síntesis del ADN.

Por lo tanto, la evaluación del IR, podría ser una herramienta útil para identificar los compuestos que provocan retraso en la síntesis del ADN, como ha sido sugerido por Lazutka (1991).

Mientras que al analizar el TCP se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo expuesto y el no expuesto, siendo un parámetro que podría adicionarse a este tipo de estudios ya que refleja el efecto de las alteraciones de la cinética a diferencia del IR.

En este estudio la aceleración en la tasa de división celular se manifestó con un incremento significativo en el IM, apoyado por los valores del TCP que muestra un comportamiento similar.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con relación al análisis de ICH en jornaleros ocupacionalmente expuestos de San José, Ahome, Sinaloa, sugieren que la exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas posiblemente son la causa de las diferencias significativas en la frecuencia de ICH, así como de las alteraciones en el IM y TCP encontradas en esta población con respecto al grupo no expuesto. En este sentido, se puede atribuir al uso frecuente e indiscriminado de mezclas de plaguicidas el daño genotóxico provocado en las personas ocupacionalmente expuestas que participaron en este estudio. Factores como el tiempo de exposición se correlacionaron con la frecuencia de ICH. Los incrementos estadísticamente significativos de frecuencias de ICH en linfocitos de sangre periférica de jornaleros indican un riesgo potencial generado por la exposición a mezclas de plaguicidas, situación que se observa en la reducción en el número de metafases de segunda división y el aumento considerable de tercera división, lo cual sugiere que la exposición a plaguicidas ocasiona aceleración en el ciclo celular

Los resultados enfatizan la necesidad de investigar y aplicar o implementar el uso de sustitutos de plaguicidas por otros menos agresivos para el ambiente y para la salud humana.

REFERENCIAS

- Bhalli, J., Khan, Q., Haq, M., Khalid, A. & Nasim A. (2006). Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis*, 21,143-148.
- Bolognesi, C., Parrini, M., Bonassi, S., Lanello, G. & Salanito A. (1993). Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutation Research*, 285, 239-249.
- Bolognesi, C., Perrone, E. & 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. *Mutation Research*, 543, 251-172.
- Bortoli G., Barbieri de Azevedo M. & Basso da Silva L. (2009). Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutation Research*, 675, 1- 4.
- Carbonell, E., Puig, M., Xamena, N., Creus, A. & Marcos, R. (1993). Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 8, 511-516.
- Carrano, A. & Natarajan, A. (1988). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 204, 379 - 406.
- Cavallo, D., Cinzia, L., Carelli, G., Iavicoli, I., Ciervo, A., Perniconi, B., Rondinone, B., Gismondi, M. & Laviconi S. (2006). Occupational exposure in airport personnel. Characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicology*, 223, 26-35.
- Costa, C., Texeira, J., Silva, S., Roma-Torres, J., Coehlo, P., Gaspar J., Alves, M., Laffon, B., Rueff, J. & Mayan O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 21, 343-350.
- 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. *Environment International*, 33, 877-885.
- Falck, G., Hirvonen, A., Scarpato, R., Saarikoski, S., Migliore, L. & Norppa, H. (1999). Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. *Mutation Research*, 441, 225-237.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Toxicología Clínica*, 6, 1-5.
- Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. (2001). Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165, 153-162.
- Gómez-Arroyo, S., Noriega-Aldana, N., Osorio, A., Galicia, F., Ling S. & Villalobos-Pietrini R. (1992). Sister chromatid exchange analysis in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutation Research*, 281,173-179.
- Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M., Villalobos-Pietrini, R. & De León-Rodríguez J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research*, 466, 117-124.
- Hollingworth, R. (1981). Comparative metabolism and selectivity of organophosphates and carbamates insecticides. *Bulletin of the World Health Organization*, 44, 155-170.
- Ikbal, M., Atasoy, M., Pirim, I., Aliagaoglu, C., Karatay, S. & Erdem, T. (2006). The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behcet's disease with and without HLA-B51. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 20, 149-52.
- Ivett, J. L. & Tice, R. P. (1982). Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 4, 358 (abstract).
- Lander F. & Ronne M. (1995). Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide exposed greenhouse sprayers. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 21, 283-288.
- Latt S. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3395-3399.
- Lazutka, J. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17, 188-95.
- Martínez-Valenzuela C. & Gómez-Arroyo S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23,185-200.
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M.E., Félix-Gastélum, R. & Alvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ-*

- ment International, 35, 1155-1159.
- Muñiz, J., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y., Nazar-Stewart, V. & Kisby, G. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol. Toxicology and Applied Pharmacology*, 227, 97-107.
- Nehéz, M., Berencsi, G., Páldy, A., Selypes, A., Czeizel, A., Szentesi, I., Csankó, J. & Nagy, K. (1981). Data on the chromosome examinations of workers exposed to pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1, 116-112.
- Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149, 309-334.
- Páldy, A., Puskás, N., Vincze, K., Hadházi, M. (1987). Cytogenetic studies on rural population exposed to pesticides. *Mutation Research*, 187, 127-132.
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A. & Marcos, R. (2001a). Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 495, 147-156.
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S. & Marcos R. (2001b). Cytogenetic analysis of Greek farmers by using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and in buccal cells. *Mutagenesis*, 16, 539-545.
- Pastor, S., Creus, A., Xamena, N., Siffel, C. & 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 101-109.
- Pastor, S., Creus, A., Parrón, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S. & Marcos, R. (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, 18, 249-258.
- Perry, P. & Evans, H. (1975). Cytological detection of mutagen, carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-124.
- Perry P., Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Lond.)* 251,156-158.
- Qiao, D., Seidler, F., Violin, J. & Slotkin, T. (2003). Nicotine is a developmental neurotoxicant and neuroprotectant: stage-selective inhibition of DNA synthesis coincident with shielding from effects of chlorpyrifos. *Developmental Brain Research*, 147, 183-190.
- Remor, A., Caprini, C., Alves, D., Pimentel, G., Dahlström, V. & Marlei, J. (2009). Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environment International*, 35, 273-278.
- Rupa, D., Reddy, P., Sreemannarayana, K. & Reddi O. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18, 136-138.
- Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R. & Levi, Z. (2001). Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 491, 71-80.
- Sobti, R., Krishan, C. & Pfaffenberger, C. (1982). Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemical on human lymphoid cells in vitro: organophosphates. *Mutation Research*, 102, 89-102.
- Vindas, R., Ortiz, F., Ramírez, V. & Cuenca P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 52, 601-609.
- Wolf-Dieltrich, H. (2004). A new deal for Holliday junctions. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 117-119.
- Zhang, W., Jiang, F. & Feng Ou J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecology and Environmental Science*, 1, 125-144.
- Zeljezik, 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.
- Zeljezik, D. & Garaj-Vrhovac, V. (2002). Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere*, 46, 295-303.