



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMONITOREO CITOGENÉTICO DE PLAGUICIDAS
EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS CRÓNICAMENTE
EXPUESTOS

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA LUISA VARGAS TORRES



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

2009

Hoja de datos del jurado

<p>1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombre (s): Teléfono: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera: No. de cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno. Vargas Torres María Luisa 56 41 25 82 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 072350551</p>
<p>2. Datos del tutor. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>2. Datos del tutor. Dra. Gómez Arroyo Sandra Luz</p>
<p>3. Datos del sinodal 1. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>3. Datos del sinodal 1. Dr. Villalobos Pietrini Rafael</p>
<p>4. Datos del sinodal 2. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Jiménez García Luis Felipe</p>
<p>5. Datos del sinodal 3. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>5. Datos del sinodal 3. Dra. Guzmán Rincón Judith Isabel</p>
<p>6. Datos del sinodal 4. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>6. Datos del sinodal 4. M. en C. Villela González María Alicia</p>
<p>7. Datos del Reporte de Investigación. Título: No. de páginas: Año:</p>	<p>7. Datos del Reporte de Investigación. Biomonitorio citogenético de plaguicidas en trabajadores crónicamente expuestos 84 p. 2009</p>

A mis padres
Filadelfia y Alberto

A Arturo, Andrea y Sabino

AGRADECIMIENTOS

Ofrezco mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, en la que he tenido el privilegio de formarme académicamente y con una conciencia social.

A todas las personas (maestros, compañeros, amigos) que en la Facultad de Ciencias, CCH Vallejo y CCH Oriente formaron parte de mi vida y a los que debo el haber aprendido a ser una mejor persona.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por abrir la posibilidad de integrarme a una de sus líneas de investigación, por su apoyo, consejos e invaluable aportaciones que hicieron posible la satisfactoria culminación de éste trabajo.

A Yolanda Carbajal López por haberme permitido participar en su investigación, por el apoyo técnico y moral que me brindó y sobre todo por su amistad.

Al profesor Ignacio Piña Millán por su ayuda en la realización del análisis estadístico y en la elaboración de gráficas, así como a Alejandro Meave Gallegos; a mi sobrino Erick Daniel Hernández Vargas por su participación en la toma e impresión de las microfotografías.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini y a la Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón por las valiosas observaciones que me permitieron enriquecer este trabajo. También agradezco la participación del Dr. Luis Felipe Jiménez García y de la maestra María Alicia Villela González como sinodales y la revisión que hicieron del presente documento.

A mi familia, amigos y amigas que me han acompañado en todo momento y cuyo apoyo moral me ha sido fundamental.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A todos. Muchas gracias.

ÍNDICE

CONTENIDO	Número de página
I. RESUMEN	6
II. INTRODUCCIÓN	8
III. ANTECEDENTES	10
III.1 Surgimiento de los plaguicidas en el mundo	10
III.2 Los plaguicidas en México	13
III.3 Plaguicidas: Características, modo de acción y efectos	17
III.4 Pruebas para la detección de daño genético. Análisis de micronúcleos y ensayo cometa	23
IV. OBJETIVO	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
VIII. CONCLUSIONES	58
IX. REFERENCIAS	61
X. ANEXOS	68
XI. TABLAS	70
XII. FIGURAS	80

I. RESUMEN

A partir de la producción industrial de los plaguicidas su aplicación en la agricultura se ha ido incrementando con los años. Actualmente más de mil sustancias químicas han sido clasificadas como plaguicidas, representando muchas de ellas un riesgo para la salud debido a los efectos mutagénicos, citotóxicos y carcinogénicos, demostrados en algunas de ellas, pero aún desconocidos para la mayoría de estos productos. El combate a las plagas es un factor que ha contribuido a mejorar los niveles de vida y supervivencia de la población mundial, sin embargo también se han mostrado sus efectos negativos, representando un riesgo para la salud de las personas y una amenaza para los ecosistemas por la contaminación que se ha generado en los mismos. La magnitud con la que se usan los plaguicidas y el riesgo potencial que representan, particularmente por la posibilidad de inducir cáncer, sugiere que la evaluación del daño genético causado es una prioridad. Distintas pruebas de genotoxicidad permiten evaluar tanto exposición a sustancias genotóxicas como riesgo de carcinogénesis, con el ensayo cometa se puede determinar el daño causado por exposición a éstas sustancias y el análisis de micronúcleos es un biomarcador de riesgo carcinogénico. En el presente estudio el daño potencial asociado con exposición a mezclas complejas de plaguicidas fue evaluado a través del ensayo cometa y del análisis de micronúcleos en células de epitelio oral en 36 trabajadores agrícolas crónicamente expuestos, sin equipo de protección, a diversos plaguicidas (entre los que se encuentran organofosforados, piretroides, carbamatos y de otros tipos), en el municipio de Tlapehuala, Guerrero, contrastado con 20 personas de una zona lejana al sitio de exposición, ambos grupos del sexo masculino. Un incremento significativo en el daño al ADN fue detectado con el ensayo cometa a través del promedio en la longitud de la cauda, encontrándose que el grupo de trabajadores expuestos tuvo un promedio significativamente mayor al del grupo no expuesto. De

manera similar, los trabajadores expuestos a plaguicidas mostraron incremento significativo en células con micronúcleos en comparación con las personas no expuestas. Los resultados sugieren una asociación entre daño citogenético y exposición ocupacional a mezclas complejas de plaguicidas, indicando que éstos pueden causar daño genético en células somáticas y, por tanto, que el riesgo de desarrollar procesos cancerosos está latente en los trabajadores expuestos. Esta investigación mostró, también, que utilizar dos biomarcadores con distinto nivel de detección de daño, es apropiado y permite ubicar la magnitud del efecto causado por agentes genotóxicos.

II. INTRODUCCION

La existencia de plagas de diversa índole que afectan al hábitat humano, insumos, cultivos agrícolas y ganado, que destruyen materiales y construcciones o son vectores de enfermedades transmisibles han hecho necesario el consumo de plaguicidas químicos en áreas rurales y urbanas donde han mostrado su efectividad y contribución al minimizar el impacto sanitario, social y económico, sin embargo, la forma en la que se producen, distribuyen y aplican, minimizan los aspectos positivos debido a las políticas de los consorcios y gobiernos involucrados, que privilegian la obtención de ganancias por encima de un bienestar social real. Es por ello que los aspectos negativos de su manejo y aplicación sobresalen, al verse afectada la salud de los trabajadores y de la población expuesta a los productos en los que se utilizan, al contaminar el ambiente alterando los ecosistemas, al provocar la muerte masiva de organismos dada la afectación de las cadenas alimenticias (Bouguerra 1986, López *et al.* 1987, Restrepo 1988).

Se han realizado diversos estudios en torno a las características de los plaguicidas, formas de dispersión, efectos en los seres vivos, en particular en el hombre y estos han contribuido a determinar los niveles de toxicidad y daño causado; en investigaciones de laboratorio se ha determinado, con diversos plaguicidas, la relación dosis–efecto citotóxico, citostático y citogenético, encontrándose que muchos pueden ser muy perjudiciales (Dimitrov *et al.* 2006). También se realizan trabajos de campo para evaluar en las personas expuestas los daños ocasionados, encontrándose resultados contradictorios, muchas veces debido a factores de confusión (edad, sexo, tiempo de exposición, tipo de plaguicidas, hábitos de vida, etc.) o a la utilización de equipo de protección (Bolognesi 2003, Bull *et al.* 2006). Un problema en los estudios de campo se debe a que las personas se exponen a mezclas de plaguicidas, siendo

usualmente desconocidas las características toxicológicas de dicha combinación y por tanto, resulta imposible, dilucidar a qué sustancia(s) específicamente corresponden los efectos encontrados (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007); a pesar de este inconveniente es importante conocer la situación de las personas ocupacionalmente expuestas, ya que esto puede permitir generar alternativas en torno a proteger su salud y con ello a modificar el impacto negativo que ejercen estas sustancias.

El presente estudio se ubica en el marco de evaluar el daño causado por los plaguicidas en una población expuesta a mezclas complejas debido a la necesidad de conocer los efectos a nivel citogenético que estos compuestos causan a los trabajadores crónicamente expuestos, particularmente del municipio de Tlapehuala, Guerrero, región en la que no existen estudios previos. El biomonitoreo genotoxicológico en poblaciones humanas es una herramienta útil para estimar el riesgo genético de una exposición integrada por mezclas complejas de agentes químicos (Bolognesi 2003). Se seleccionaron dos procedimientos de biomonitoreo para la detección del daño genotóxico: el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos, debido a la alta sensibilidad que presentan para la detección de daño genotóxico y mutagénico (Albertini *et al.* 2000).

La importancia de este trabajo radica en dar a conocer la relación entre empleo de plaguicidas y niveles de daño causado; contribuir a que se generen medidas de protección adecuadas a la salud de los trabajadores y sus familias; brindar elementos para la toma de conciencia de la sociedad sobre los riesgos que conlleva seguir utilizando los plaguicidas de forma indiscriminada.

III. ANTECEDENTES

III.1 SURGIMIENTO DE LOS PLAGUICIDAS EN EL MUNDO

Desde que el hombre toma conciencia de lo que le rodea, se ha dado cuenta del papel devastador que pueden tener las plagas sobre los organismos que forman parte de su sustento y del daño que le pueden causar a él mismo. Cuando crea la agricultura, se ve en la necesidad de cuidar los cultivos del efecto perjudicial de los organismos patógenos en todos los momentos de su desarrollo, para lo que se sirve de los venenos naturales que ha ido conociendo en su contacto con el mundo. Así, utiliza sustancias como cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, ácido sulfúrico, alquitrán, compuestos de mercurio, zinc, plomo, cobre, etc. para luchar contra los insectos, hongos y malezas perjudiciales. Estas sustancias en general son muy tóxicas, poco efectivas en el control de plagas y persisten hasta por 50 años en el ambiente, por lo cual muchas de ellas están prohibidas (Cremlyn 1986).

A partir de 1930 inicia la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos, destacando el DDT (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano), sintetizado en 1874, aunque su uso comienza en 1939 al descubrirse sus propiedades insecticidas; su alta efectividad y bajo costo de producción implicaron la generalización de su empleo en los ámbitos de la salud pública y la agricultura, sin embargo poco a poco se fueron conociendo los efectos dañinos que causaba en los seres vivos debido a su bioacumulación y transferencia a través de las cadenas alimenticias, a los daños en el ambiente como resultado de su persistencia, al hecho de que se le asocia con efectos

carcinogénicos, por lo que en 1972 fue prohibido en EUA y otros países desarrollados (Cremllyn 1986, López *et al.* 1987, Albert 2005).

La industria moderna de los plaguicidas empezó después de la segunda guerra mundial y a partir de ese momento fueron sintetizadas gran variedad de sustancias, que incluyen, hidrocarburos clorados, compuestos organofosforados, carbamatos, derivados del fenol, compuestos nitrogenados y arsenicales, entre otros. Dichas sustancias se encuentran en gran variedad de plaguicidas destinados a prevenir, controlar y destruir cualquier forma de vida considerada como plaga (López *et al.* 1987, Alpuche 1991). Desde 1945 más de 15,000 compuestos químicos individuales y 35,000 formulaciones han sido usadas como plaguicidas agrícolas; en años recientes el uso de éstos se ha incrementado progresivamente y es probable que continúe e incluso se acreciente en un futuro cercano. Se estima que en 1997 aproximadamente 5,684 millones de libras de ingredientes activos de plaguicidas fueron aplicados en el mundo. Toda la gente está inevitablemente expuesta a éstos agroquímicos de manera ocupacional o a través de contaminación ambiental por residuos incluyendo productos de degradación físicos y biológicos en aire, agua y alimentos o por efecto de su bioacumulación y transferencia a través de las cadenas alimenticias. La Organización Mundial de la Salud reportó que aproximadamente un millón de envenenamientos por pesticidas ocurren anualmente, resultando en 20,000 muertes en el mundo (OMS 1990, Lucero *et al.* 2000, Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2001, Bolognesi 2003, Ergene *et al.* 2007).

En países en desarrollo se presenta más del 50 % de las intoxicaciones, aun cuando los plaguicidas se utilizan en menor cantidad. Es de resaltar que el mayor número de muertes por

agroquímicos ocurre en el continente americano: en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, México y en el sureste de Estados Unidos, principalmente, donde se encuentran trabajando millones de inmigrantes (muchos de ellos mexicanos) que sufren y se envenenan con plaguicidas por carecer o no usar equipo de protección (Restrepo 1988).

Los principales países exportadores de plaguicidas, entre los que se cuentan Alemania, Inglaterra, Suiza, Francia, Japón, Israel e Italia distribuyen la mayor parte de su producción en los países en desarrollo, en donde multitud de empresas transnacionales se han establecido para producir y distribuir plaguicidas prohibidos o rigurosamente restringidos en su lugar de origen. Las barreras establecidas para proteger a los usuarios y ecosistemas en los países industrializados no se encuentran en el tercer mundo, donde los agroquímicos más peligrosos son aplicados de forma anárquica e irracional (Buoguerra 1986, López *et al.* 1987, Restrepo 1988, Albert 2005).

III. 2 LOS PLAGUICIDAS EN MEXICO

En México inició el uso de plaguicidas con fines agrícolas desde fines del siglo XIX, en 1938 ya se utilizaban 38 compuestos químicos, entre ellos arseniato de plomo, arsénico blanco, ácido cianhídrico, aceto-arsenito de cobre (verde de París), ácido carbólico, ácido fénico y sulfato de cobre con cal viva (mezcla de Burdeos). La aplicación intensa de plaguicidas sintéticos se inició en el país hacia 1946 tanto en salud pública como en la agricultura, con la introducción del DDT y, posteriormente, de otros plaguicidas organoclorados. Después se agregaron diversos organofosforados, carbamatos y gran variedad de herbicidas y fungicidas, todo lo cual estuvo relacionando con la llegada de la Revolución Verde, que México fue uno de los primeros países en adoptar y que tenía como uno de sus principios el uso intenso de plaguicidas sintéticos y fertilizantes (Restrepo 1988, Albert 2005).

La producción de ingredientes activos se desarrolla en el país a partir de 1947, cuando se elaboran los primeros insecticidas inorgánicos, como el arseniato de cobre. En 1959 se comienzan a fabricar agroquímicos sintéticos (DDT, hexacloruro de benceno), fungicidas a base de tiocarbamatos y algunos otros productos inorgánicos, para 1968 se incluye el toxafeno y en la década de los setenta se producen 25 ingredientes activos, sobresaliendo paratión metílico, malatión, paraquat, captan, benomil, entre otros (López *et al.* 1987, Restrepo 1988); en 1990 son fabricados 36 principios activos entre los que se encuentra el endrin (Alpuche 1991). Paralelamente a la elaboración de plaguicidas, las importaciones de éstos también aumentan, de forma que en 1994 México ya es el principal importador de plaguicidas en América Latina, en tanto que la producción, distribución y comercialización interna, en diversos niveles está

permeada por compañías multinacionales que dominan más del 80% del mercado, en especial, de productos tecnológicamente complejos o relativamente recientes (Albert 2005). Mientras en los países industrializados empiezan a prohibirse distintos plaguicidas debido a su toxicidad, en México se siguen produciendo, convirtiéndose en uno de los productores más importantes de plaguicidas organoclorados en América Latina (Restrepo 1988), con una amplia participación de empresas transnacionales.

El Catálogo Oficial de Plaguicidas publicado por la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), contiene la lista y las especificaciones de uso de los plaguicidas autorizados y su categoría toxicológica, así como los prohibidos o restringidos (SEMARNAP 1996). El catálogo de CICOPLAFEST (2004) incluye un total de 423 plaguicidas: 103 herbicidas, 155 insecticidas y acaricidas, 122 fungicidas, 13 atrayentes y feromonas, 7 fumigantes, 1 molusquicida, 4 nematicidas, 1 protector de semillas, 2 repelentes y 15 rodenticidas (Márquez 2004).

La cantidad de plaguicidas empleados en México ha ido aumentando paulatinamente. En 1978 se utilizaron 9,798 toneladas de ingrediente activo de diversos plaguicidas (Alpuche 1991), para 1986 se vendieron alrededor de 60,000 toneladas (Restrepo 1988) distribuidas en alrededor de 900 principios activos de plaguicidas formulados en aproximadamente 60,000 preparaciones (Alpuche 1991). Según la Asociación Mexicana de la Industria de los Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC 1995) el volumen de plaguicidas utilizados fue de 54,678.96 toneladas.

Los plaguicidas de mayor empleo son los insecticidas, seguidos de los herbicidas y los fungicidas, destacando paraquat, glifosato, paratión metílico, metamidofos, malatión, mancozeb y clorotalonil. Los estados con mayor aplicación de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit, Colima, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca. Se calcula que en ellos se aplica el 80 % del total de plaguicidas utilizados en el país. En las zonas noroeste y centro (Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco) se consumen cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y gran variedad de hortalizas de exportación (Albert 2005).

La población dedicada a la agricultura en México es de alrededor de 7 millones de personas y se calcula en 25.4 % de la población de México la que más directamente puede estar expuesta a los plaguicidas. En diversos estudios se han detectado gran cantidad de intoxicaciones y muertes debido a exposición directa o como resultado de contaminación. Entre las causas que generan esta situación, se encuentran: instalaciones inadecuadas, obsoletas o en mal estado; falta de equipo de protección adecuado, de condiciones y medidas de seguridad en los lugares de trabajo e información acerca de los riesgos en el manejo de los plaguicidas en trabajadores directamente expuestos (vaciadores, envasadores, mezcladores y pesadores), transportistas, trabajadores agrícolas, entre otros; fugas y derrames de residuos en suelo, agua, drenajes y emisión de sustancias a la atmósfera; uso anárquico y elevado de plaguicidas en los cultivos; contaminación de alimentos; utilización de envases vacíos para almacenar agua, alimentos, enseres domésticos o que llegan a ser empleados por los niños como juguetes; uso inadecuado en casas, escuelas, mercados; fumigación aérea que afecta a animales, plantas, poblaciones cercanas y ambiente. También contribuyen el analfabetismo, la carencia de servicios de salud públicos y accesibles, la falta de información acerca de los síntomas que pueden ser críticos y requieren de atención

inmediata, la aparición de afecciones como anemia aplástica, cáncer, problemas cardiacos o de sistema nervioso, incluso decesos, que no son vinculados directamente como resultado de la exposición crónica a estas sustancias. A todo esto ahora hay que agregar el uso para el suicidio y el homicidio que en México alcanza actualmente cifras significativas (López *et al.* 1987, Restrepo 1988, Stellman y Daum 1973, Albert 2005, Villena *et al.* 2007)

III.3 PLAGUICIDAS: CARACTERÍSTICAS, MODO DE ACCIÓN Y EFECTO.

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de ellas que se destina a controlar cualquier plaga incluidos los vectores que transportan enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, los que provoquen daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como los que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales (CICOPLAFEST 1998).

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas formas: de acuerdo con los organismos que controlan (insecticidas y acaricidas, raticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, molusquicidas, aficidas); por su mecanismo de acción (ingestión, inhalación o contacto); por su toxicidad (desde relativamente inocuo hasta muy tóxico) la cual es determinada en animales de laboratorio por estimación de la *dosis letal 50 (DL50)*; por su persistencia (que puede ser baja a muy alta) o por su estructura química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, bipirilos, ditiocarbamatos, etc.) de la que dependen los mecanismos de acción de los mismos (Chow 1987, CICOPLAFEST 1998, García y Toalá 2003, WHO 2004).

La peligrosidad de un plaguicida está en función de sus propiedades físicas y químicas, resaltando aquellas que le permiten dispersarse a través del aire, agua y suelo, de forma que se puede distribuir ampliamente; su persistencia en el ambiente, pudiendo conservar casi intactas sus propiedades tóxicas o incluso potenciándolas, como resultado de degradación influenciada

por microorganismos, actividad química, pH, clima, etc.; su capacidad para penetrar a través de las membranas celulares y almacenarse dentro de las células reaccionando con diferentes sustancias intercelulares (enzimas, hormonas, material genético) o generando respuestas de desintoxicación cuyo resultado puede ser la producción de sustancias genotóxicas. Todas estas propiedades hacen de los plaguicidas compuestos sumamente peligrosos, que están en todo el planeta e incluso han generado sus propios ciclos biogeoquímicos al ser transferidos del ambiente a los seres vivos y entre éstos se transfieren a través de las cadenas alimenticias, bioconcentrándose (algunos de ellos), generando serios problemas de salud a seres humanos, animales y alterando los ecosistemas (López *et al.* 1987, Alpuche 1991, INE 2005).

Los plaguicidas brindan beneficio a la sociedad porque le permiten mejorar la producción agrícola, pecuaria y forestal, controlar enfermedades epidémicas, evitar el deterioro de diversos elementos de fabricación o procesamiento industrial (papel, madera, pinturas, telas, alimentos, etc.) y de uso doméstico (jabones, desodorantes, insecticidas, productos de jardinería, pegamentos, etc.), mismos que son o contienen plaguicidas; sin embargo la utilización desmedida e irracional de ellos y sobre todo, la selección de productos muy tóxicos por encima de otros menos nocivos y el dejar de lado las técnicas tradicionales y alternativas, ensombrece los beneficios por la gravedad de los efectos tóxicos. Algunos aspectos negativos que su mal uso conlleva son: eliminación de predadores naturales de las plagas; desarrollo de resistencia en los organismos que son objeto de la lucha química; alteración del equilibrio ecológico al eliminar eslabones de la cadena trófica; aparición de nuevas plagas por ausencia de predadores o competidores; acumulación de plaguicidas en el suelo o en las aguas; envenenamiento de especies provocando reducción en la diversidad y graves problemas de salud al hombre,

generados por la continua exposición de toda la población a los mismos (Bouguerra 1986, López *et al.* 1987, Pastor *et al.* 2001).

Los daños que pueden causar los plaguicidas pueden ser por toxicidad aguda que produce efectos adversos en menos de 24 horas después de la exposición y causar síntomas que pueden incluso pasar inadvertidos como náuseas y mareos, lesiones en ojos y piel, neurológicas, hepáticas, renales, pulmonares y la muerte inmediata. Los daños se manifiestan en los sistemas inmune, nervioso, endocrino y reproductor y en el ADN (García y Toalá 2003, Costa *et al.* 2006); toxicidad subcrónica se observa tras la absorción de repetidas dosis en un periodo de aproximadamente 1 a 3 meses y toxicidad crónica como resultado de exposición continua a bajas dosis de plaguicidas durante largos periodos de tiempo, se produce en exposición ocupacional o cuando los plaguicidas se dispersan en el ambiente y toda una comunidad puede ser afectada. Los efectos pueden incluir gran variedad de alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas que terminan dañando todos los aparatos y sistemas del organismo. Los efectos más importantes se ubican en los sistemas nervioso central, reproductor, inmunológico, así como la aparición de cáncer, mutaciones y malformaciones congénitas (SEMARNAP 1996). La manifestación específica de éstos y la gravedad dependen del tipo de plaguicida, de su concentración, del tiempo de exposición y de la susceptibilidad individual.

La exposición ocupacional a plaguicidas ha sido asociada con distintas enfermedades neoplásicas causadas por su efecto mutagénico en el material genético. Un aumento significativo de casos de cáncer fue encontrado en la incidencia de leucemia, de múltiples mielomas, linfomas no Hodgkin, linfomas Hodgkin, sarcoma de tejido blando, cáncer de pulmón, estómago, hígado y

vejiga (Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2001, Grover *et al.* 2003, Costa *et al.* 2006) Se ha asociado a atrazina, 2,4-D, glifosato y diazinon (herbicidas e insecticidas autorizados en México) con un incremento en el riesgo de contraer cáncer de ovario, seno, cerebral, leucemia y linfoma no-Hodgkin. Entre los plaguicidas probados en animales de laboratorio se ha encontrado que son carcinogénicos el aldrin, captano, tetracloruro de carbono, clorambeno, clordano, clorobencilato, DDT, dialato, dibromocloropropano, dieldrin, heptacloro, nitrofenol, tetraclorovinilos, toxafeno, entre otros y teratógenicos el aldrin, azinfosmetilo, captafol, captano, carbaril, diazinona, diclorvos, dicroptofos, dieldrina, dimetoato, endrin, folpet, maneb, paration, fosmet, 2,4,5-T, tiram, triclorfon y tritron (López *et al.* 1987).

En el medio laboral la principal forma de entrada de éstas sustancias al organismo es por la piel, seguida del pulmón. Por difusión pasiva los plaguicidas atraviesan el estrato córneo o el epitelio alveolar, distribuyéndose en el organismo por vía sanguínea. Los compuestos liposolubles se unen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltos en la sangre y según su afinidad se fijan en órganos o tejidos específicos como hígado, riñones, tejido adiposo, sistema nervioso. Al entrar a las células son metabolizados transformándose en sustancias químicamente inactivas o de reducida toxicidad que pueden ser hidrosolubles y eliminarse por la orina o ser transformados en metabolitos tóxicamente más activos que el compuesto original, con cierta afinidad por el ADN y con capacidad mutagénica importante (Ramírez y Lacasaña 2001).

Los principios activos de los plaguicidas organoclorados o sus metabolitos actúan sobre el sistema nervioso central alterando las propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas neuronales, provocando alteración en la cinética del flujo de Na^+ y K^+ a través de la

membrana de la célula nerviosa (Narahashi *et al.* 1992), resultando en la propagación de potenciales de acción múltiples para cada estímulo (Ferrer 2003), causando síntomas como convulsiones y en intoxicaciones agudas la muerte por paro respiratorio (Tordoir y Van Sittert 1994). Se bioconcentran en el tejido graso, transfiriéndose a través de las cadenas alimenticias y de la leche materna (García y Toalá 2003).

Los insecticidas organofosforados son neurotoxinas que inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa, lo que provoca la acumulación de grandes cantidades de acetilcolina en las sinapsis nerviosas, resultando que las células que están en sinapsis no se separan y el estímulo nervioso se mantiene como si estuvieran mandando mensajes constantemente. Esto causa excitación del sistema nervioso, parálisis o la muerte. Estas sustancias se pueden transformar en metabolitos más tóxicos por oxidación del plaguicida en las células hepáticas aumentando su potencial toxicidad (López *et al.* 1987, Stellman y Daum 1973, WHO 2004). También inducen estrés oxidante y generan especies de oxígeno reactivo *in vivo* e *in vitro*, se ha descrito que tienen propiedades alquilantes sobre las bases nitrogenadas del ADN; ambos mecanismos pueden causar daño genotóxico (Fest y Schmidt 1973, Bagchi *et al.* 1995) y teratogénico (WHO 2004).

Los carbamatos inactivan a la acetilcolinesterasa a través de la carbamitación de la enzima mediante la unión covalente de los grupos electrofílicos carbamoilo en los sitios estéricos de la enzima (Moutchen-Dahmen *et al.* 1984). Los síntomas de intoxicación son los mismos que para los organofosforados, pero la inactivación enzimática se revierte en menos de una hora con lo que la recuperación se hace más rápida.

La piretrina, compuesto activo de los piretroides, afecta el sistema nervioso central e induce neurotoxicidad por modificación en la dinámica de los canales de sodio de la membrana de la célula nerviosa, provocando el incremento de su tiempo de apertura y prolongando la corriente de sodio a través de la membrana, proceso asociado con la producción de potenciales de acción en los nervios, pudiendo conducir a hiperexcitación neuronal. Los piretroides también inhiben a la ATPasa Na^+/K^+ en la membrana neuronal perturbando los gradientes de sodio y afectando la liberación de otros neurotransmisores (He 1994, Kakko *et al.* 2003).

Los plaguicidas organofosforados (derivados de agentes neurotóxicos desarrollados durante la Segunda Guerra Mundial) junto con los carbamatos y piretroides, son los más utilizados en la actualidad. Son poco persistentes, no tienden a acumularse en los tejidos grasos y se pueden eliminar por la orina, sin embargo son más tóxicos que los organoclorados. En los países industrializados, los piretroides sintéticos se utilizan ampliamente en lugar de los organofosforados, sin embargo, son más caros por lo que los compradores de países en desarrollo con frecuencia prefieren adquirir los organofosforados u organoclorados por ser más baratos, aunque sean más peligrosos (Ramírez y Lacasaña 2001, WHO 2004).

III. 4 PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE DAÑO GENÉTICO

ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS Y ENSAYO COMETA

Para la detección de daño genético se hace uso de los biomarcadores que son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o indicador de la exposición a un agente tóxico; evalúan la magnitud de respuesta del organismo frente al mismo y más o menos cuantifican específicamente la exposición, el efecto biológico temprano y la susceptibilidad (Garte y Bonassi 2005, Moller 2006).

La importancia del resultado en los estudios de biomarcadores es su utilidad al indicar el daño provocado por algún agente tóxico, las probables consecuencias de la exposición y el riesgo de adquirir enfermedades producto de la misma, con lo que se generan elementos para fundamentar decisiones de intervención a nivel individual e incluso ambiental y cuyo alcance puede involucrar a distintas esferas de la sociedad. En este sentido, se clasifican en biomarcadores de exposición (miden el daño causado por algún agente que afecte la salud), de efecto (indican el riesgo de adquirir alguna enfermedad como resultado de la exposición a alguna sustancia genotóxica) y de susceptibilidad (detectan genotipos responsables de variación interindividual que determinan las diferencias en la habilidad de los individuos para activar o desintoxicar agentes genotóxicos) (Albertini *et al.* 2000, Moller 2006, Heuser *et al.* 2007).

ANÁLISIS DE MICRONÚCLEOS

El análisis de micronúcleos es uno de los biomarcadores de genotoxicidad más frecuentemente empleado en mamíferos y en la actualidad se utiliza para la evaluación de exposiciones ocupacionales a mutágenos (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007). Es un biomarcador de efecto que puede reflejar exposición a agentes con modo de acción clastogénico o aneugénico (Albertini *et al.* 2000) y es considerado una medida cuantitativa de daño cromosómico correlacionada con la incidencia de cáncer en poblaciones humanas (Tolbert *et al.* 1992).

Los agentes clastogénicos causan alteraciones cromosómicas de tipo estructural, provocando lesiones a los cromosomas que dan como resultado (a) anillos o fragmentos cromosómicos sin centrómero (acéntricos) que en la anafase no interactúan con las fibras del huso mitótico y por lo tanto en la telofase no se incorporan a los núcleos de las células hijas; (b) anillos o fragmentos con centrómero (céntricos) en los que éste se encuentra dañado, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, lo que provoca retraso en la migración de estos fragmentos hacia los polos del huso mitótico quedando fuera de los núcleos hijos. Estas dos situaciones también se presentan con cromosomas completos, en los que el daño es causado por agentes aneugénicos, presentándose aberraciones cromosómicas de tipo numérico causadas por pérdida del centrómero o afectación del mismo (con o sin disyunción), dando como resultado cromosomas céntricos que, por las mismas razones que en el caso de los fragmentos, tampoco se pueden incorporar a los núcleos de las células hijas. En todos los casos, el material genético no incluido en los núcleos de las células hijas, queda en el citoplasma y una porción de éstos se rodean de membrana nuclear y aparecen en la interfase como pequeños núcleos que por ser de menor tamaño que el núcleo se

les llama micronúcleos. En general los de menor dimensión son resultado de la acción de clastógenos y los grandes de aneuploidógenos, sin embargo puede haber cromosomas completos pequeños que, por tanto, produzcan micronúcleos de tamaño reducido (Zalacain *et al.* 2005, Celik y Kanik 2006, Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007).

Los micronúcleos con ADN fragmentado pueden originarse por otros procesos, entre los que se incluyen ruptura de puentes anafásicos, expulsión de brotes nucleares, replicación sobre una plantilla de ADN dañada, baja condensación en regiones de la heterocromatina debido a hipometilación del ADN, desespirilación de ADN satelital, hipermetilación de regiones génicas vinculadas con arresto del ciclo celular o del huso mitótico, silenciamiento o pérdida de función de genes involucrados en reparación de ADN; los micronúcleos con cromosomas completos también se pueden formar como resultado de fallas en el huso mitótico, cinetocoro u otras partes del aparato mitótico, alteraciones en la fisiología celular y desorganización mecánica del aparato mitótico (Albertini *et al.* 2000, Fenech 2007).

El ensayo es práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por los agentes genotóxicos (Zalacain *et al.* 2005) fácil, rápido y de bajo costo. Se puede usar para estudios *in vitro* e *in vivo*, en diversas especies (animales y vegetales) y tejidos (sanguíneo, epiteliales, germinales, entre otros) obteniendo las muestras por métodos no invasivos (Fenech 2000, Nersesyan *et al.* 2006).

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis es la técnica más frecuentemente usada, se aplica a cultivos de células, por ejemplo linfocitos, los que se siembran en presencia de un

mitógeno y cuando han completado una división nuclear son bloqueados antes de la citocinesis con citocalasina-B (inhibidor de la polimerización de actina), posteriormente se lleva a cabo la cosecha celular, durante la que se puede someter a las células a un choque hipotónico favoreciendo que se hinchen los citoplasmas, posteriormente son distribuidas directamente o centrifugadas en los portaobjetos, fijadas con metanol-ácido acético, teñidas (con colorantes específicos para ADN como tinción de Fielgen, naranja de acridina, DAPI o yoduro de propidio o con una tinción no específica como Giemsa, May-Grünwald-Giemsa u orceína) y por último se visualizan al microscopio para ser evaluadas. Cuando se colectan células en crecimiento, como las de mucosa bucal, el cultivo no es requerido, las células colectadas por raspado o centrifugación (en el caso de la orina) son distribuidas directamente en los portaobjetos, o suspendidas en amortiguador, centrifugadas y colocadas en portaobjetos, posteriormente, en ambos casos son fijadas (antes o después de ser colocadas en los portaobjetos), teñidas y observadas. Sólo en el primer caso las células son identificadas por ser binucleadas. En general se cuentan de 1,000 a 2,000 células en linfocitos y de 3,000 a 5,000 en células epiteliales (Albertini *et al.* 2000, Fenech 2000, Zalacain *et al.* 2005, Celik y Kanik 2006, Nersesyan *et al.* 2006).

Para el análisis de los micronúcleos y de otras alteraciones celulares observadas con este ensayo, hay criterios establecidos por Tolbert *et al.* (1992) y Sarto *et al.* (1987). Puede ser considerada únicamente la presencia de los micronúcleos (biomarcador de daño cromosómico y/o pérdida de cromosomas completos) o también podría hacerse el registro de la presencia de células binucleadas que en tejidos de descamación se considera biomarcador de toxicidad, cariólisis y cariorresis son biomarcadores de apoptosis, el efecto de huevo roto es un marcador de genotoxicidad y muerte celular bajo la forma de necrosis o apoptosis (ambas se manifiestan

como picnosis, cromatina condensada cariolisis o cariorrexis) (Fenech 2000, Zalacain *et al.* 2005, Celik y Kanik 2006, Nersesyan *et al.* 2006).

Los factores que pueden alterar la frecuencia de micronúcleos son edad, sexo, en las mujeres la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis (Landi *et al.* 2000), adicción al tabaco, déficit de folato y de vitamina B12, suplementar la dieta con agentes antioxidantes como vitamina E, vitamina C, caroteno, ginseng e incluso infusiones de té (Lee *et al.* 1998), además del manejo adecuado de la técnica y de las muestras.

Muchos investigadores contribuyeron al desarrollo del ensayo de análisis de micronúcleos. Fue propuesto independientemente por Heddle (1973) y Schmid (1975) la medición de micronúcleos en poblaciones en división celular para determinar daño cromosómico *in vivo* (Fenech 2000) y como un sistema para evaluar el riesgo potencial de la exposición a agentes genotóxicos. En 1976, Countryman y Heddle proponen el uso de la técnica como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos (Zalacain *et al.* 2005). Stich *et al.* (1983) desarrollaron un protocolo para el ensayo de micronúcleos con células de exfoliación de mucosa oral.

Más tarde el ensayo es mejorado por Fenech y Morley (1985), quienes desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis con citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular.

Miller *et al.* (1998) ponen a consideración sustituir el ensayo de aberraciones cromosómicas por el de micronúcleos, al haber encontrado en un estudio realizado por ellos, resultados consistentes para ambas pruebas (Basso y Russo 2000).

Posteriormente se introduce una serie de modificaciones para determinación de daño más específico, por ejemplo la utilización de inmunofluorescencia para la localización de regiones centroméricas en los micronúcleos, lo que permite discriminar entre agentes químicos clastogénicos y aneugénicos (Basso y Russo 2000); la síntesis de ADN *in situ* con cebadores (PRINS) propuesta por Koch *et al.* (1989) y Gosden *et al.* (1991) utilizada para la localización citogenética de secuencias de ADN, para diferenciar tres tipos de micronúcleos: (a) los que son inducidos por rupturas cromosómicas, (b) los que provienen de una mala segregación de las cromátidas completas (c) los que son resultado de mala segregación de cromosomas completos (Basso y Russo 2000), entre otras.

El ensayo de micronúcleos es validado a nivel mundial en 1999 y considerado biomarcador efectivo de daño en el ADN a través del programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi (Zalacain *et al.* 2005, Moller 2006).

El análisis de micronúcleos ha evolucionado en un robusto ensayo para daño genético con aplicaciones en ecotoxicología, nutrición, pruebas de sensibilidad a radiaciones y de determinación para riesgo de contraer cáncer, optimización de radioterapia, biomonitoreo de poblaciones humanas y prioritariamente para pruebas de nuevos fármacos y otros agentes

químicos como disolventes orgánicos, metales pesados, plaguicidas, entre otros (Celik y Kanik 2006, Heuser *et al.* 2007)

ENSAYO COMETA

El ensayo de electroforesis alcalina en gel de célula única o ensayo cometa es un método para detección de daño genotóxico a partir de la migración del ADN alterado por los agentes genotóxicos. Es considerado un biomarcador de exposición debido a que el efecto detectado puede ser reparable aunque se están haciendo esfuerzos para desarrollarla como una herramienta para medir riesgo, es decir como biomarcador de efecto (Moller 2006, Heuser *et al.* 2007).

Es un método relativamente simple en su desarrollo (Olive y Banáth 2006) y económico en el uso de materiales con respecto a otras técnicas (Rojas *et al.* 1999), se le considera de alta sensibilidad para detectar daño al ADN a nivel de células individuales (Mañas *et al.* 2006).

Su realización es rápida, requiere pequeñas muestras de células que pueden ser obtenidas de diversos tejidos por procedimientos no invasivos, es posible aplicarla a una variedad muy amplia de organismos y de tipos celulares para estudios *in vivo* o *in vitro*. Las células pueden ser proliferantes o no proliferantes somáticas o reproductoras (Rojas *et al.* 1999, Speit *et al.* 2008). Se ha aplicado en distintas especies tanto vegetales como animales (Avishai *et al.* 2003, Olive y Banáth 2006).

El ensayo cometa alcalino consiste en obtener una suspensión de células que son embebidas en agarosa sobre un portaobjetos esmerilado y lisadas por detergentes y una alta concentración de sales con lo que el contenido celular es removido originándose “nucleoides”, en los que el ADN liberado permanece altamente superenrollado. Posteriormente los portaobjetos son tratados en condiciones alcalinas, lo que permite que el ADN se desenrede desde los sitios de ruptura de las cadenas y en la electroforesis a pH alto los fragmentos de ADN, inducidos por los agentes genotóxicos, migren al ánodo de la cámara. Subsecuentemente los portaobjetos son lavados con una solución neutralizante y teñidos con un colorante fluorescente (como el bromuro de etidio) que se une al ADN. Al visualizar bajo un microscopio de fluorescencia, las células que presentan daño en el material genético dan la apariencia de un cometa con una cabeza fluorescente brillante y una cauda cuyo largo e intensidad de fluorescencia está relacionada con la cantidad de rupturas inducidas en el ADN por los agentes genotóxicos. Las caudas consisten de una serie de fragmentos retenidos por una estructura altamente ordenada. Estos probablemente permanecen conectados por regiones de cadena sencilla. Las células no dañadas aparecen como núcleos intactos (cabezas de cometa) sin caudas. Entre más rupturas hay y más grandes sean, más intensa es la fluorescencia en el ADN de la cauda (Collins *et al.* 1993, McKelvey-Martin *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999, Faust *et al.* 2004).

Con este ensayo es posible detectar un amplio espectro de lesiones primarias al ADN tales como rupturas de cadena sencilla, rupturas de cadena doble, uniones cruzadas ADN-ADN/ADN-proteína, bases dañadas por oxidación, sitios alcalino lábiles y sitios de reparación de ADN retardada o incompleta. Ha sido también empleado para visualizar degradación de ADN debido a necrosis y apoptosis (Singh 2000, Hartman *et al.* 2001, Rundell *et al.* 2003, Speit *et al.* 2008, Collins *et al.* 2008), la detección de diferencias intercelulares en daño y reparación de ADN en

virtualmente cualquier población de células eucariontes, así como también identifica subpoblaciones resistentes o sensibles a agentes dañinos para el ADN cuando se observan resultados diferenciales en una población homogénea o heterogénea de células del mismo tejido (McKelvey-Martin *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999, Albertini *et al.* 2000).

La evaluación del daño puede hacerse de forma visual o computarizada y hay muchas formas para reportar efecto en el ADN por el ensayo cometa: nivel de daño en frecuencia de células con cometa o categorizado en escala por gradiente, longitud de la cauda, porcentaje de ADN en la cauda, momento de la cauda y momento olive de la cauda, se encuentran entre los más utilizados (Ashby *et al.* 1995, Angelis *et al.* 1999, Rojas *et al.* 1999, Albertini *et al.* 2000, Faust *et al.* 2004). Actualmente se está proponiendo cuantificar el número de lesiones por célula (Moller 2006).

El ensayo cometa después de 20 años está en fase de crecimiento con muchos nuevos usos cada año (Collins *et al.* 2008). Se ha aplicado en biomonitoreo humano ambiental y ocupacional, en estudios sobre genotoxicidad por exposición a agentes potencialmente mutagénicos, a nivel clínico (en pacientes con cataratas, cánceres, diabetes), efecto del estilo de vida, en la interacción entre dieta y consumo de antioxidantes sobre la carcinogénesis, análisis de alimentos irradiados en ecotoxicología, biología de la radiación, genotoxicidad ambiental y toxicología genética (McKelvey-Martin *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999, Avishai *et al.* 2003, Wasson *et al.* 2008).

A pesar de las amplias aplicaciones e incremento en la popularidad del ensayo cometa, el principal problema que enfrenta como una herramienta para estudios de biomonitoreo es la

carencia de una metodología de prueba estandarizada (Faust *et al.* 2004), sin embargo muchos investigadores están haciendo esfuerzos para resolverlo.

La cuantificación de rupturas de cadena por daño al ADN de células individuales fue inicialmente desarrollada por Rydberg y Johanson (1978). Lisaron y embebieron células individuales en agarosa sobre portaobjetos en condiciones alcalinas ($\text{pH} \geq 12$) para lograr el parcial desenrollamiento del ADN, neutralizaron y tiñeron con naranja de acridina y cuantificaron el grado de daño del ADN midiendo el radio de fluorescencia de verde (indica rupturas de doble cadena enrollada de ADN) a rojo (rupturas de cadena sencilla enrollada de ADN) usando un fotómetro (McKelvey-Martin *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999).

Posteriormente Östling y Johanson (1984) desarrollaron una microelectroforesis en microgel con el objetivo de mejorar la sensibilidad de detección del ADN dañado en células aisladas. Fue la primera versión de la técnica neutra (McKelvey-Martin *et al.* 1993, Rojas *et al.* 1999). En 1988 Singh y sus colaboradores desarrollaron una versión modificada. La idea fue combinar electroforesis de ADN en gel con microscopía de fluorescencia para visualizar la migración de las cadenas de ADN de células individuales embebidas en agarosa. La técnica aplicada fue más efectiva en la eliminación de las proteínas celulares y en el desenrollamiento del ADN, lo que permitió que en la electroforesis se evidenciaran además de las rupturas de doble cadena, las de cadena sencilla, sitios alcalino lábiles, sitios de reparación retardada, necrosis y apoptosis (Rojas *et al.* 1999).

Olive y sus colegas (1990) desarrollaron versiones de la técnica neutra e introdujeron el concepto de momento de la cauda para medir la cantidad de ADN migrado. Su técnica es idéntica en principios y similares en la práctica a la de Singh (1988), pero es menos sensible (Rojas *et al.* 1999, Olive y Banáth 2006). Posteriormente Gedik *et al.* (1992) describieron la versión modificada del ensayo cometa utilizando enzimas para detección de daño basal (Moller 2006).

Como última modificación, Santos *et al.* (1997) describen el método que combina el ensayo cometa con la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para detectar sobre todo daño en regiones específicas de ADN y reparación en células individuales, aunque ésta técnica fue simultáneamente desarrollada en otros dos laboratorios por McKelvey-Martin *et al.* (1998) y Bock *et al.* (1999).

El daño en el ADN es un evento relativamente común en la vida de una célula. Frecuentemente el material genético es alterado por cambios que surgen espontáneamente (errores en la replicación), endógenamente (metabolitos reactivos) o exógenamente, después de la exposición a mutágenos ambientales o luz ultravioleta (Gillet y Schärer 2006). Estas alteraciones pueden causar modificaciones simples de bases o cambios más complejos incluyendo deleciones, fusiones, translocaciones o aneuploidías que pueden conducir a mutaciones, cáncer, cambios degenerativos, envejecimiento de los organismos multicelulares y muerte de la célula o del organismo (Sancar *et al.* 2004).

Los cambios en el ADN inducen diversas respuestas que activan a la célula para eliminar o soportar el daño o desencadenan un proceso de muerte celular programada con el que

presumiblemente se eliminan las células con mutaciones potencialmente catastróficas. Las reacciones de respuesta al daño en el ADN incluyen: (a) restauración de la continuidad de la cadena doble de ADN por conjuntos de enzimas que reconocen y anulan el daño; (b) activación de un punto de control del ADN dañado, con detención de la progresión del ciclo celular para permitir la reparación y prevenir la transmisión de cromosomas dañados o incompletamente replicados; (c) respuesta transcripcional, la cual causa cambios en el perfil de la transcripción que pueden ser benéficos a la célula; y (d) apoptosis, con la que se elimina a las células excesivamente dañadas o seriamente desreguladas. Los mecanismos de reparación del ADN incluyen inversión directa del daño, reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos, reparación por apareamiento desigual (“mismatch”), reparación de uniones cruzadas y reparación de rupturas de cadena doble (Sancar *et al.* 2004).

El daño causado por radiaciones ionizantes, productos químicos, radicales libres, agentes reductores, alquilantes u oxidantes o como resultado de procesos metabólicos celulares entre los que se pueden encontrar replicación y recombinación anómalas, estrés oxidante, estructuras intermediarias de los procesos de reparación o metabolitos secundarios que se forman en las células como respuesta del organismo ante la entrada de alguna sustancia tóxica, pueden oxidar, reducir o fragmentar a las bases nitrogenadas formando fotoproductos, dímeros, aductos o inducir la formación de sitios abásicos (AP); romper las cadenas del ADN, formar uniones intra e intercatenarias de ADN/ADN ó de ADN/proteínas (Sancar *et al.* 2004, Gillet y Schärer 2006).

Todas estas lesiones son fácilmente reparadas por las células en minutos o en horas (Faust *et al.* 2004, Olive y Banáth 2006, Gleib *et al.* 2008), por lo que algunos investigadores como Wasson *et*

al. (2008) cuestionan su importancia al no relacionarse con una lesión significativamente letal o mutagénica.

Con el ensayo cometa se detectan las lesiones que pueden ser reparadas, pero también las que no son reparadas y que pueden conducir al desarrollo de anomalías en los cromosomas como una consecuencia directa y manifestación del daño al ADN, por ejemplo, fragmentos de cromosomas pueden resultar de rupturas de doble cadena no reparadas y rearrreglos cromosómicos de rompimientos de cadena de ADN mal reparadas. La pérdida y no disyunción de cromosomas probablemente son causados por defectos en el huso, en el centrómero o como una consecuencia de baja condensación de la estructura cromosómica antes de la metafase (Fenech 2000). La expresión de estos daños puede observarse bajo la forma de presencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, necrosis o apoptosis.

Es de resaltar que no toda la gente expuesta a agentes genotóxicos responde de la misma forma. Mientras que unas personas pueden presentar procesos de carcinogénesis, otras son resistentes a la actividad de la sustancia dañina. Esto es resultado de la gran variabilidad interindividual que radica en la capacidad para activar o inactivar compuestos potencialmente genotóxicos y carcinogénicos, la que está probablemente influenciada por los polimorfismos de los genes que codifican las enzimas del metabolismo xenobiótico (Heuser *et al.* 2007) de fase I (activación) y de fase II (inactivación), además de que influyen en la capacidad de respuesta del sistema de escisión reparación de nucleótidos (Gilet y Schärer 2006). En distintos estudios se ha logrado identificar genotipos asociados con incremento en riesgo de cáncer por exposición a agentes genotóxicos (Costa *et al.* 2006).

IV. OBJETIVO

Estimar el posible daño genotóxico causado por exposición crónica a mezclas complejas de plaguicidas en trabajadores agrícolas del Municipio de Tlapehuala, Estado de Guerrero, a través del análisis de micronúcleos y de la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, utilizando células de mucosa oral y comparar la efectividad de uso de esas dos técnicas..

V. HIPÓTESIS

Los plaguicidas son considerados agentes químicos mutagénicos potenciales que generan en los individuos expuestos alteraciones a nivel génico o cromosómico (Bolognesi 2003) por lo que se espera que la exposición crónica a mezclas complejas de plaguicidas muestre altos niveles de daño genético que podrán ser detectados con el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos.

VI. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo forma parte de una investigación realizada por la profesora de la Universidad Autónoma de Guerrero, Yolanda Carbajal López bajo la dirección de la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, en la que se evaluó la exposición crónica a mezclas complejas de pesticidas en tres municipios de la región de Tierra Caliente, estado de Guerrero: Arcelia, Ajuchitlán y Tlapehuala.

El estudio global involucró a 161 personas divididas en dos grupos. El primero constituido por 62 trabajadores agrícolas del municipio de Arcelia, 13 de Ajuchitlán y 36 de Tlapehuala que han estado expuestos a diversos plaguicidas. El grupo no expuesto, formado por 50 personas, fue seleccionado de pobladores del mismo estado de la región más cercana y lo más similar posible a las poblaciones expuestas a los plaguicidas con la diferencia de que no tenían contacto con este tipo de agroquímicos o a alguna otra sustancia o factor genotóxico que pudiera afectar los resultados.

Para la selección de los individuos que formaron parte de los grupos de estudio se realizó un análisis minucioso con los diferentes datos que fueron recabados en las localidades y, con el propósito de obtener la información más detallada posible de los grupos objeto de estudio acerca de su actividad laboral y características personales, se les aplicó un cuestionario confidencial, sobre demografía, estado de salud, hábitos de consumo, exposiciones peligrosas, ocupación, productos utilizados y medidas de protección empleadas en la manipulación y aplicación de estos agroquímicos (anexo 1). Los individuos fueron seleccionados con base en las características de exposición a plaguicidas y debido a que estas zonas no han sido estudiadas.

A todas las personas que participaron en el estudio se les informó de los objetivos del mismo y se les solicitó autorización por escrito para el análisis de las muestras biológicas. La información de los resultados obtenidos fue transmitida a los médicos que les hicieron su historial y estos fueron los responsables de informar a los pacientes acerca de su situación y, en su caso, recomendar medidas que puedan prevenir daños mayores, como modificación de su dieta, hábitos, medidas de protección e higiene personal vinculada con el manejo de los plaguicidas. Las muestras de epitelio bucal que se obtuvieron fueron tomadas, trabajadas y analizadas de enero del 2007 a julio del 2008.

Mi participación en este estudio (en tanto la opción de Titulación es actividad de apoyo a la investigación) fue trabajar con las muestras de mucosa oral colectadas por la profesora Carbajal en el municipio de Tlapehuala, realizando el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos de 36 trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas del municipio de Tlapehuala y 20 testigos de la región. Del total de muestras colectadas para el ensayo cometa, sólo trabajé una parte, debido a que la profesora Carbajal había avanzado en la revisión de las mismas; el análisis de micronúcleos se realizó en todas las muestras.

Una vez adquiridos los procedimientos básicos, desde preparación del material, de las sustancias, manejo de los aparatos, de las técnicas, lectura de las laminillas para ambas técnicas e interpretación de los resultados, se inició la observación de las muestras colectadas en Tlapehuala, mismas que habían sido elaboradas y sólo hacía falta, en el caso del ensayo cometa, teñir y leer las laminillas y en el caso de los micronúcleos observar al microscopio las células

fijadas y teñidas para obtener los resultados. El trabajo de laboratorio fue realizado del 20 de febrero al 11 de julio de 2008, cubriendo un total de 416 horas.

Ubicación del área de estudio

El municipio de Tlapehuala esta ubicado en la región de Tierra Caliente, Estado de Guerrero, a 240 metros sobre el nivel del mar, entre los paralelos 18° 13' y 18 19' de latitud norte y los 100° 171' y 100° 34' de longitud oeste con referencia al meridiano de Greenwich (Figura 1).

Tiene una extensión de 266.70 kilómetros cuadrados (0.42 % de la superficie estatal), de la que el río Balsas es el principal recurso hidrológico, su clima es cálido-subhúmedo seco, con temperaturas de 25 °C y 32 °C siendo el mes de mayo el más caluroso y diciembre y enero los más fríos. La mayor parte de su extensión la componen zonas planas ocupando el 55 % del territorio municipal, que comprenden extensos valles con alturas que oscilan entre los 250 y 300 metros sobre el nivel del mar en la cual se encuentra su principal actividad económica que es la agricultura. Entre sus principales cultivos destaca la producción de maíz, sandía, sorgo forrajero, ajonjolí, jitomate, chile, mango, plátano, limón y papaya. Cuenta con 33 localidades, siendo la más importante Tlapehuala por ser la cabecera municipal (Gobierno del Estado de Guerrero 2001). Datos del XII Censo General de Población y Vivienda de 2000 realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), señalan que la población de este municipio fue de 22,645 habitantes, de los cuales 10,802 son hombres y 11,843 mujeres, que significa el 0.73 % del total de habitantes del estado, con una población indígena que constituye el 1.72 % con respecto a la población total de esta región (INEGI, 2001).

En las labores de cultivo, mantenimiento y cosecha se utilizan diversos plaguicidas. Los testimonios proporcionados mediante comunicación personal por los trabajadores agrícolas a través del cuestionario aplicado, indican que los plaguicidas de uso en la región son: el mata todo, faena, coloso (glifosato), tordón (picloram), esterón, hierbamina, banvel (2,4-D), gramoxone, dragón (paraquat), malathion (malatión), gesaprim (atrazina), tamarón (metamidofos), fusilade (fluazifop-p-butil), karate (lambda cyalotrina), sansón (nicosulfurón), furadan (carbofurán), paratión metílico, lannate (metomilo), tecto 60 (tiabendazol) y cipermetrina (cipermetrina).

Análisis del daño genotóxico evaluado por el ensayo cometa

Toma de muestra y preparación de laminillas. Se cubrieron dos portaobjetos esmerilados por cada persona con NMA (agarosa de punto de fusión normal) al 1 %, de manera que se formara una película delgada y uniforme y se etiquetaron. Las muestras de epitelio bucal fueron colectadas durante el día de trabajo, previo enjuague bucal con agua, realizando un raspado de cada mejilla con cucharillas estériles. Las células se resuspendieron en 50 μ L de solución fisiológica (PBS) y fueron adicionadas a una alícuota de 50 μ L de LMPA (agarosa de bajo punto de fusión) al 0.5 % mantenida en baño de agua a 37 °C. Se mezcló todo suave y rápido y la muestra fue transferida por goteo a un cubreobjetos, sobre el que fue colocado el portaobjetos esmerilado con la monocapa de agarosa NMA. Las laminillas se pusieron en lámina fría durante 5 minutos para que solidificara la agarosa, se deslizó suavemente el cubreobjetos para retirarlo y se introdujeron las muestras en una caja Koplin oscura con solución de lisis final durante toda la noche a 8 °C. La solución de lisis fue preparada con cloruro de sodio (NaCl) 2.5 M, ácido etilendiamintetracético con dihidrato de sodio ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mM, hidroximetil-amino-

metano [TRIS (Base)] 10 mM e hidróxido de sodio (NaOH) 200 mM disueltos en un volumen determinado de agua desionizada y ajustados a pH de 10; media hora antes de usar fue adicionado 1 % de Tritón – X y 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO).

Electroforesis unicelular alcalina. Las laminillas fueron sumergidas en solución amortiguadora alcalina a 4 °C, preparada con NaOH 300 mM y EDTA 1 mM y ajustada a pH 13, durante 20 minutos para permitir el desenrollamiento de las cadenas de ADN. Posteriormente se hizo el corrimiento de las muestras en una cámara electroforética horizontal durante 20 minutos a 25 V ajustados a 300 mA y trabajando con luz amarilla.

Neutralización y fijación. Se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con amortiguador neutralizante conteniendo TRIS 0.4 M a pH de 7.5. Las laminillas fueron fijadas con metanol absoluto frío durante 5 minutos a 8 °C, secadas a temperatura ambiente y guardadas en una caja de plástico oscura con ranuras. Todo este procedimiento se hizo con luz amarilla.

Tinción. Se realizó en presencia de luz amarilla para evitar que el fluorocromo utilizado sea inactivado y con sumo cuidado dada la toxicidad del colorante. Se tiñó cada laminilla con 75 µL de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.2 mg/ml, se colocaron en cámara húmeda oscura para evitar su desecación y poder trasladarlas sin alterar al material genético.

Evaluación del daño al ADN. Las observaciones se realizaron en oscuridad en el microscopio de fluorescencia Axiostar Plus Zeiss equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro

de barrera de 590 nm a 16X y 40X contando los primeros 50 núcleos y cometas que aparecieron en cada preparación. En total se contabilizaron 100 células por persona. Los parámetros evaluados fueron: frecuencia y porcentaje de células dañadas/células sin daño; longitud de la cauda del cometa determinado a través del promedio de la migración del ADN de las células hasta los últimos restos de ADN fragmentado; nivel de daño al ADN clasificado hasta 4 niveles donde el criterio utilizado fue el tamaño de la cauda de los cometas: nivel 0 corresponde al daño basal, nivel 1 de cometas que miden desde 1 hasta 99.99 μm , nivel 2 de 100 a 199.99 μm , nivel 3 de 200 a 299.99 μm y nivel 4 de 300 μm en adelante. Las “nubes” (cometas sin cabeza) no fueron consideradas.

Análisis del daño genotóxico evaluado por el análisis de micronúcleos.

Toma de muestra. Las células de epitelio bucal fueron colectadas con un abatelenguas húmedo raspando la parte interna de las mejillas, usando uno para cada lado. El tejido fue distribuido de forma homogénea en portaobjetos limpios y previamente desinfectados con etanol. Los frotis se dejaron secar al aire y se etiquetaron.

Fijación. A cada laminilla se le agregaron de tres a cinco gotas del fijador frío (metanol-ácido acético en proporción volumen a volumen de 3:1) y se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Hidrólisis. Las preparaciones fueron sumergidas durante 10 minutos y de manera consecutiva en cada una de las siguientes soluciones: agua desionizada, ácido clorhídrico 1N (ambos a

temperatura ambiente) y ácido clorhídrico 1N a 60 °C mantenido en baño de agua. Posteriormente se lavaron con agua destilada durante unos segundos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción. Este procedimiento debe realizarse en completa oscuridad y en campana de flujo laminar para evitar que el reactivo sea inactivado por la luz y el contacto con los vapores por ser tóxicos. Las laminillas fueron teñidas con la técnica de Fielgen, siendo sumergidas en reactivo de Schiff (preparado con fucsina básica, HCl 1N, metabisulfito de sodio PM 190.10 y carbón activado) durante 90 minutos, enjuagadas con agua corriente, secadas al aire y guardadas.

Análisis de micronúcleos. Las muestras fueron observadas en microscopio fotónico a 40X. Se contaron 1,500 células por laminilla (3,000 por individuo) y la evaluación del daño estuvo basada en la clasificación de Tolbert et al. (1992). Se cuantificaron las células con estructura cromosómica con membrana propia, micronúcleos, células binucleadas, efecto de huevo roto, picnosis, cariólisis, cariorresis, cromatina condensada y puentes nucleoplásmicos. Picnosis, cariólisis, cariorresis y cromatina condensada fueron consideradas como indicadoras de apoptosis y necrosis. Los micronúcleos debían ser de menos de 1/3 del diámetro del núcleo principal, estar en el mismo plano de enfoque del núcleo, claramente separado de éste, tener una estructura cromatínica similar a la del núcleo principal y una forma lisa oval o redondeada. Las células con dos núcleos fueron contadas como binucleadas, los núcleos que aparecen apretados con una banda Fielgen negativa fueron considerados con efecto de huevo roto, los núcleos comprimidos fueron evidencia de picnosis, la cariólisis se determinó como disolución nuclear en la cual una reacción negativa de Fielgen mostró fantasmas de núcleos remanentes, los núcleos

fragmentados en piezas irregulares se contaron como cariorresis, la cromatina nuclear agregada se contabilizó en células con cromatina condensada y el puente nucleoplásmico se observó como una conexión continua de nucleoplasma entre dos núcleos de una célula binucleada.

Cada vez que se tomaban las muestras se aplicaban ambas técnicas, primero la del ensayo cometa hasta poner las laminillas en la solución de lisis y posteriormente se obtenía la muestra para el análisis de micronúcleos y se procesaba el material hasta la tinción, al día siguiente se terminaban de realizar las preparaciones para el ensayo cometa.

Las laminillas para ambos ensayos se guardaron en cajas para preparaciones biológicas, fueron codificadas y analizadas en el Laboratorio de Citogenética del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM. Las del ensayo cometa se guardaron después de la fijación y en el laboratorio fueron teñidas y evaluado el daño genotóxico; en el caso de las de micronúcleos se guardaron teñidas hasta su observación.

Análisis estadístico de los datos. Fue calculado el promedio, la desviación estándar y el error estándar para cada biomarcador. Se aplicó la prueba de t de Student para obtener la significancia de las diferencias al comparar los valores promedio de los diferentes parámetros del grupo expuesto a los plaguicidas con el no expuesto. El nivel de significancia fue tomado como $P < 0.05$ para el análisis de micronúcleos y del ensayo cometa, utilizando el programa Statistical. Las tablas de frecuencia de los datos colectados, así como las gráficas fueron generadas usando el programa Microsoft Office Excel 2003.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las personas del grupo expuesto son jornaleros del sexo masculino, que se contratan por temporadas (la mayoría trabaja los dos ciclos agrícolas), en distintos campos de cultivo, en los que están expuestos a mezclas complejas de plaguicidas y lo que resta del año trabajan sus tierras, si es que son propietarios, realizando labores de cultivo, mantenimiento y cosecha, para las que también utilizan diversos agroquímicos.

Las características individuales (Tablas 1 y 2) y generales de la población estudiada (Tabla 3) muestran que el promedio de exposición a los plaguicidas fue de 9.94 ± 11.58 (rango 1-57) años, teniendo una edad promedio de 33.39 ± 20.73 (rango 13-83) años. Ninguno de ellos fue considerado fumador, ya que retomando el criterio de Grover *et al.* (2003) y Heuser *et al.* (2007), es que fumen más de 5 cigarrillos por día. En cuanto al hábito de beber alcohol, Castillo-Cadena *et al.* (2006) consideraron como criterio el consumo diario de alcohol y ninguna persona bebe de esa manera, por lo que no fueron considerados bebedores consuetudinarios. En general su situación socioeconómica es parecida, no han estado expuestos en el último año a rayos X ni a medicamentos que puedan alterar los resultados y las medidas de higiene y seguridad que toman para prevenir intoxicaciones o daño genotóxico no son adecuadas, ya que carecen de equipo de protección, aunque manifiestan, en su mayoría, que se cambian de ropa después de la aspersión, dejándola en los campos agrícolas o fuera de su vivienda y señalan, que se lavan las manos antes de consumir alimentos. En cuanto a su historial se detectaron 4 casos de aborto en 3 esposas de trabajadores, lo que representa el 8.3 %. Los campesinos que cuentan con tierras de cultivo, tienen almacenados plaguicidas, aunque los tienen fuera de sus viviendas.

Para el grupo no expuesto, fueron seleccionadas 20 personas del sexo masculino, de forma que coincidiera este aspecto con el grupo anterior. Los participantes en el estudio no eran de la misma localidad, y en la selección de estas personas se priorizó el que no hubieran estado expuestas a agentes genotóxicos al menos en el último año y que tampoco hubieran estado expuestas a plaguicidas. La edad promedio fue de 38.5 ± 14.23 (rango 15-65) años (Tabla 3), sólo una persona resultó ser fumador, pero por ser estadísticamente irrelevante, se consideró que no había fumadores en la población y ninguno de los bebedores fue consuetudinario.

Los plaguicidas a los que se expusieron los trabajadores son 20 productos diferentes, los que de acuerdo a su principio activo se clasifican en organofosforados (27 %), piretroides (12 %), carbamatos (12 %), piridinas (7 %), bipirilos (7 %), triazinas (7 %), sulfonilureas (7%), arilfenoxipropionatos (7 %), ácidos fenoxicarboxílicos (7 %) y metilbenzimidazol carbamatos (7 %); de éstos son herbicidas el 46.5 %, insecticidas y acaricidas el 46.5 % y fungicidas el 7 %. Los organoclorados han sido sustituidos por organofosforados, piretroides y carbamatos, que son los de mayor uso actualmente, pero que han sido reportados en diversos estudios como positivos para efecto genotóxico en células de mamíferos (Bolognesi 2003). Así, si bien se están usando plaguicidas menos persistentes, esto ha sido en detrimento de la salud de los trabajadores ocupacionalmente expuestos, por ser más tóxicos. El nivel de toxicidad de los plaguicidas es 7 % del nivel I, del II y III es 26.5 % para cada uno y del nivel IV es 40 %, sin embargo es necesario señalar que algunos plaguicidas están ubicados por CICOPALAFEST en una categoría diferente con respecto al criterio de la Agencia de Protección Ambiental (EPA en inglés), por ejemplo la toxicidad del metamidofos está ubicada en el nivel II en México (CICOPALAFEST 1998) y en Estados Unidos de América en el I (Pastor *et al.* 2001). No sólo los principios activos pueden

causar alteraciones genéticas, también pueden estar involucrados los disolventes orgánicos utilizados en su preparación (Joksic *et al.* 1997).

En distintos estudios se ha encontrado una asociación entre exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas y la presencia de aberraciones cromosómicas como un hecho que incrementa el riesgo de cáncer; se ha visto aumento en la proporción de intercambio de cromátidas hermanas, de micronúcleos, de mutaciones cromosómicas y génicas y con el ensayo cometa se ha encontrado, igualmente, daño en el material genético (Joksic *et al.* 1997, Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2001, Grover *et al.* 2003, Faust *et al.* 2004, Castillo-Cadena *et al.* 2006, Costa *et al.* 2006, Sailaja *et al.* 2006, Ergene *et al.* 2007). En diversas investigaciones sobre exposición a plaguicidas o a mezclas de éste tipo de agroquímicos se menciona al 80 % de los plaguicidas a los que están expuestos los trabajadores agrícolas de Tlapehuala encontrándose resultados positivos para daño genético con los ensayos cometa, de análisis de micronúcleos y/o aberraciones cromosómicas (Tabla 4), del 20 % restante (picloram, fluasifop-p-butil y nicosulfurón) no se encontró información en este sentido.

Los abortos reportados en las esposas de los trabajadores se explican con esta información, ya que están siendo expuestas a agentes teratogénicos y mutagénicos a causa de contaminación llevada al hogar, por los plaguicidas almacenados en el mismo o por otras causas. En otras investigaciones se ha encontrado incremento significativo de abortos (García 1998, Pastor *et al.* 2001) y se ha planteado que pueden jugar un papel importante en la inducción de malformaciones congénitas (Márquez *et al.* 2005). Este es un elemento que podría mostrar que

existe daño genético y por tanto que estos plaguicidas, en lo particular y/o en conjunto, son genotóxicos.

El presente estudio se realizó con células de mucosa oral por ser un método de muestreo no invasivo (y por ello más fácilmente aceptado por los trabajadores y personas no expuestas para la toma de muestra), apto para la aplicación del ensayo cometa y del análisis de micronúcleos (Albertini *et al.* 2000), puede proveer de información acerca de alteraciones en el núcleo para detectar morfología anormal. Puede ser particularmente útil para monitoreo de poblaciones humanas expuestas a agentes dañinos (Celik y Kanik 2006).

Las células del epitelio de la mucosa oral están constantemente expuestas a gran cantidad de sustancias potencialmente genotóxicas (Suhas *et al.* 2004). Para el caso de los trabajadores de Tlapehuala (dado que no utilizan equipo de protección) los plaguicidas durante la aspersión, pueden ingresar al organismo por vías digestiva, respiratoria o ser absorbidos por la piel y a través de los sistemas de distribución de sustancias del cuerpo, llegar a la boca los ingredientes activos o sus metabolitos, causando daño genético en cualquier tipo de célula epitelial. Cuando son afectadas las células de la capa basal, pueden generarse lesiones en el ADN que son transformadas a micronúcleos durante la división celular (Speit y Schmid 2006), los que se heredan a las células hijas, algunas de las que se van diferenciando y originando a los estratos espinoso y plano (Eliséiev *et al.* 1985), durando este proceso de 7 a 16 días para emerger a la superficie y exfoliarse (Speit y Schmid 2006). También puede causarse citotoxicidad manifestándose bajo la forma de necrosis ó apoptosis. Muchos de los plaguicidas son mutágenos

vinculados al desarrollo de cánceres (Ergene *et al.* 2007) y se ha observado que el 92 % de éstos son de origen epitelial (Sailaja *et al.* 2006).

Como biomarcador de exposición a los plaguicidas, se usó el ensayo cometa por ser un método confiable, con alta sensibilidad para la detección de daño en el ADN (Moller 2006); como biomarcador de efecto se utilizó el ensayo de micronúcleos, por ser éstos un indicador de ruptura y/o pérdida de cromosomas (Albertini *et al.* 2000, Fenech 2000) además de ser considerados una medida cuantitativa de daño cromosómico correlacionado con la incidencia de cáncer en poblaciones humanas (Celik y Kanik 2006). La aplicación de dos métodos es congruente con la sugerencia de Olive y Banáth (2006) que señalan la necesidad de comparar las mediciones del ensayo cometa con otro tipo de biomarcador para interpretar la relevancia biológica del daño.

Para el ensayo cometa se evaluaron 100 células por persona. Los resultados obtenidos con este estudio, a nivel individual (Tablas 5 y 6) muestran que hubo un mayor daño genético en los trabajadores expuestos que en los no expuestos. Aplicando la prueba de t de Student a estos datos, se encontró que el valor de la t de tablas (2.02) es menor que el calculado (5.011) para los grupos de estudio, por lo que se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa en el sentido de que las medias son diferentes. La probabilidad para que sea significativo fue de 0.000022, con un intervalo de confianza de 0.05. La gráfica de cajas y bigotes, de histograma y de puntos (Figuras 2 y 3) dan una visión completa de las distintas medias entre el grupo expuesto y el no expuesto. En la gráfica de puntos se observa que el nivel de daño en el grupo expuesto está muy por arriba del no expuesto. La diferencia en las medias, por tanto es posible al efecto de los plaguicidas sobre el grupo expuesto.

La relación entre los grupos expuesto y no expuesto con respecto a frecuencia y niveles de daño (figura 4) muestra que el número total de células alteradas en el grupo expuesto es significativamente mayor que en el no expuesto, encontrándose una diferencia de 68 %. Con respecto al daño agrupado por niveles, en el grupo no expuesto el daño total (10.1 %), se encuentra distribuido en un 38 % en el nivel 1 y 62 % en el 2, no habiendo ninguna célula con daño en los niveles 3 y 4. En el grupo expuesto la mayor proporción de células alteradas se encontró en el nivel 2 (72 %), seguido del nivel 3 (14 %), éste del 1 (11 %) y el 3 % correspondió al cuarto nivel. Estos datos evidencian que el nivel de daño en el grupo expuesto es muy grande con respecto al no expuesto, siendo significativos los datos, excepto para el nivel 4, tal vez debido a que sólo 7 personas expuestas tuvieron daño en esa magnitud (en la Figura 5 se muestran microfotografías de los cometas observados).

La detección del daño con el ensayo cometa se realizó a través del incremento en la longitud de la cauda, considerando que la migración del ADN es dependiente de la cantidad de lesiones producidas en el nucleoide (Rundell *et al.* 2003). Así, el incremento en la longitud de la cauda de los cometas encontrados en los trabajadores agrícolas expuestos, es resultado del daño causado por los plaguicidas o sus metabolitos sobre el ADN, provocado posiblemente por rupturas de cadena sencilla o de cadena doble, formación de aductos, uniones cruzadas ADN-ADN/ADN-proteína, bases dañadas por oxidación, sitios alcalino lábiles y sitios de reparación de ADN retardada o incompleta (Rojas *et al.* 1999, Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2001, Grover *et al.* 2003, Faust *et al.* 2004). También puede producirse daño de tipo clastogénico que cause aberraciones cromosómicas, base para la formación de micronúcleos. Las lesiones producidas se pudieron manifestar al desenrollarse el ADN a pH 13 y extenderse durante la electroforesis realizada en las mismas condiciones alcalinas, mostrándose el daño en la longitud de la cauda del cometa.

Este tipo de alteraciones también pueden encontrarse en el grupo no expuesto por causas intrínsecas (sexo, edad, envejecimiento) o extrínsecas por agentes dañinos de exposición cotidiana como contaminantes en aire, agua y alimentos, dieta, ejercicio excesivo, hábitos de vida, entre otros (Rojas *et al.* 1999, Faust *et al.* 2004, Moller 2006, Wasson *et al.* 2008).

Es de considerarse que la mayor parte del daño detectado con el ensayo cometa es reparable en los primeros minutos u horas de producido, se han realizado estudios en los que después de algunos meses de terminada la exposición, el daño detectado es menor debido a los procesos de reparación o de apoptosis como un proceso que elimina las células gravemente dañadas (McKelvey-Martin *et al.* 1993, Faust *et al.* 2004, Sancar *et al.* 2004, Moller 2006, Collins *et al.* 2008, Gleib *et al.* 2008), sin embargo a pesar de que muchas de las lesiones son reparadas, son un indicador de la magnitud del daño causado, en este caso por los plaguicidas. No todas las lesiones son reparables, hay mutaciones que en su carácter de permanentes, pueden causar serias enfermedades o incluso procesos de carcinogénesis, por lo que es importante el biomonitorio como una herramienta que permita la detección temprana de este tipo de afectación para la toma de conciencia acerca del daño generado y la toma de decisiones para la aplicación de medidas preventivas.

Para el ensayo de micronúcleos se analizaron 3,000 células por persona. Los resultados en lo individual (Tablas 7 y 8) muestran un mayor daño genético en el grupo expuesto con respecto al no expuesto, considerando que el promedio de la frecuencia de micronúcleos fue 3.24 veces más alta por persona. Aplicando la prueba de t de Student a estos datos, se encontró que el valor de la t de tablas (2.02) es menor que el calculado (3.276) para los grupos de estudio, por lo que se

puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa en el sentido de que las medias son diferentes. La probabilidad para que sea significativo fue de 0.0022, con un intervalo de confianza de 0.05. La gráfica de cajas y bigotes, de histograma y de puntos (Figuras 6 y 7) proporcionan una visión completa de las distintas medias entre el grupo expuesto y el no expuesto. En la gráfica de puntos se observa que varias personas expuestas tuvieron mayor frecuencia de micronúcleos comparado con los no expuestos, aún cuando el 27.8 % de los expuestos careció de ellos. En el histograma es más clara esta diferencia, se observa un número mayor de células sin micronúcleos en el grupo no expuesto y en el expuesto es mayor la cantidad de micronúcleos por persona. La diferencia en los promedios es significativa, lo que permite suponer que es debida al efecto tóxico de los plaguicidas que causa daño a las células (en la Figura 8 se muestran microfotografías de las células observadas).

Se han realizado diversas investigaciones en trabajadores expuestos a plaguicidas aplicando el ensayo de micronúcleos, los resultados de este estudio se pueden ubicar dentro del rango de micronúcleos encontrados por otros autores. Lucero *et al.* (2000), Suhas *et al.* (2004), Sailaja *et al.* (2006), Ergene *et al.* (2007), Heuser *et al.* (2007) utilizaron células de mucosa oral y tiñeron las preparaciones con colorantes específicos para ADN (tinción de Fielgen, DAPI) encontrando que en los grupos no expuestos los valores van de 0.2 a 2.0 micronúcleos y en los expuestos de 0.5 a 2.57, resultados que coinciden con este estudio. Es importante señalar que cuando se utilizan colorantes no específicos para ADN (Giemsa ó May-Gruenw) en células de origen epitelial se obtienen valores 4 ó 5 veces más altos debido a que se tiñen, posiblemente, cuerpos de queratina u otros artefactos que pueden ser malinterpretados como micronúcleos, conduciendo a resultados falsos positivos o a una sobreestimación en la frecuencia de micronúcleos (Pastor *et al.* 2001, Celik y Kanik 2006, Nersesyan *et al.* 2006).

La frecuencia de células con picnosis fue significativa, lo que puede ser síntoma de daño citotóxico causado por los plaguicidas en el grupo expuesto, en tanto que es parte de los procesos involucrados en necrosis y apoptosis (Nersesyan *et al.* 2006). En cuanto a las demás alteraciones el nivel de daño encontrado comparado con el grupo no expuesto fue muy pequeño, cariólisis, cromatina condensada y cariorresis no fueron significativas, sin embargo cuando a éstas tres alteraciones se les suman las células con picnosis, considerando que todos éstos procesos se presentan en células con necrosis o apoptosis, se obtiene un índice alto en los expuestos con respecto a los no expuestos (2.36 ± 2.19 DE versus 0.70 ± 1.08 DE), que resultó ser significativo, lo que sería indicio de probable daño citotóxico causado por los plaguicidas a los trabajadores expuestos (Fenech 2000, Rundell *et al.* 2003, Zalacain *et al.* 2005, Celik y Kanik 2006, Nersesyan *et al.* 2006).

Con respecto a la frecuencia de células binucleadas -que en células de descamación se considera biomarcador de toxicidad- (Celik y Kanik 2006) y de células con efecto de huevo roto, el análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa entre ambos grupos, debido tal vez en el primer caso, al efecto de los plaguicidas en el grupo expuesto y en los no expuestos a la influencia de factores como dieta, déficit de folato y vitamina B 12, hábitos de estilo de vida, etc. o de envejecimiento celular (Zalacain *et al.* 2005) y en el segundo caso a que sea un proceso involucrado en la diferenciación del tejido (Celik y Kanik 2006).

El aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos podría ser debido, principalmente al efecto acumulativo de los plaguicidas con efecto clastogénico, aunque es probable que también se manifieste actividad de otros con efecto aneugénico. Algunos plaguicidas a los que están

expuestos los trabajadores de Tlapehuala han sido reportados como mutagénicos (Tabla 4), por lo que pueden alterar el material genético causando desde simples modificaciones de bases hasta cambios complejos que al no haber sido reparados pudieron degenerar en aberraciones cromosómicas estructurales. Los agentes aneugénicos pueden dañar el aparato mitótico ocasionando la formación de micronúcleos con cromosomas completos; los agentes clastogénicos al romper el ADN causan deleciones, translocaciones, fusiones que pueden contribuir a la inducción de micronúcleos con restos de cromosomas acéntricos (Fenech 2000; Faust *et al.* 2004; Glej *et al.* 2008). Se observó que los trabajadores con más de 20 años de exposición a las mezclas de plaguicidas en Tlapehuala (Tabla 9) presentan altos niveles de células binucleadas, con micronúcleos y células en necrosis y apoptosis (medidas como la sumatoria de células con picnosis, cariólisis, cromatina condensada y cariorresis) con respecto a los que han estado expuestos hasta 20 años. Esto puede ser efecto del daño acumulativo causado al ADN por los plaguicidas de tipo clastogénico, ya que se ha reportado que la exposición continua a mezclas de plaguicidas puede resultar en un incremento acumulativo de daño cromosómico causado, aparentemente, por este tipo de agentes (Bolognesi 2003, Márquez *et al.* 2005, Costa *et al.* 2006).

Los micronúcleos son resultado de aberraciones cromosómicas, por ello son considerados biomarcadores de efecto, su presencia indica la posibilidad de emergencia de enfermedades, envejecimiento y sobre todo carcinogénesis (Fenech 2000, Faust *et al.* 2004, Glej *et al.* 2008), también pueden indicar un decremento en la eficiencia de reparación del ADN y un incremento en la inestabilidad del genoma (Wojda *et al.* 2007), por ello resulta importante hacer uso de éste biomarcador.

Un factor que contribuye a incrementar el daño genético es la carencia de ropa de trabajo protectora. En algunos estudios se han obtenido resultados negativos aplicando distintas pruebas de genotoxicidad y se atribuyen estos hallazgos al uso de equipo de protección (Bolognesi 2003, Grover *et al.* 2003, Márquez *et al.* 2005, Bull *et al.* 2006). En el caso de los trabajadores agrícolas de Tlapehuala éste es un elemento que puede estar determinando los niveles de daño encontrados, ya que no tienen acceso a este tipo de equipo.

En diferentes investigaciones en las que se han aplicado estos ensayos, se ha descrito concordancia en los resultados del ensayo cometa y en el análisis de micronúcleos (Faust *et al.* 2004). En este estudio, se encontró que el daño causado por los plaguicidas se manifestó en el ensayo cometa en un alto número de rupturas, considerando que los distintos niveles de daño observados corresponden proporcionalmente a mayor efecto. Este resultado es congruente con el aumento en la cantidad de micronúcleos en el grupo expuesto. Estos hallazgos indican que los plaguicidas causaron multitud de lesiones en el ADN, que pudieron ser rupturas de cadena sencilla, rupturas de cadena doble, sitios alcalino lábiles (que generan rupturas de cadena sencilla al estar en presencia de un pH alcalino), sitios de reparación retardada; muchas de ellas se reparan, pero por los resultados del ensayo de micronúcleos, se puede afirmar que hay daño no reparado que ha degenerado en aberraciones que propiciaron la aparición de micronúcleos o la muerte de las células muy dañadas bajo la forma de apoptosis o necrosis.

No se puede determinar el daño causado por cada plaguicida dado que la exposición es a mezclas complejas. Cada agente tóxico puede diferir en el tipo y número de lesiones inducidas al ADN y en el efecto biológico que ellas causen. Cada droga, también posee sus mecanismos de acción,

que al interactuar con otras pueden tener un efecto sinérgico, aditivo (acumulativo) o incluso antagónico (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo 2007). Lo que se puede afirmar es que, estas sustancias producen daño genotóxico y citotóxico, que es detectado con el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos, indicador –éste último- de riesgo carcinogénico. No se puede decir que las personas con altos niveles de daño en ADN ó con una cierta cantidad de micronúcleos van a desarrollar cáncer, lo que se puede afirmar es que están en riesgo de adquirirlo, de no modificar la forma en la que se exponen a los plaguicidas.

VIII. CONCLUSIONES

Los trabajadores agrícolas del municipio de Tlapehuala, Guerrero expuestos a plaguicidas, mostraron aumento significativo en el daño ocasionado al ADN con respecto a las personas no expuestas, evaluado con el ensayo cometa y el análisis de micronúcleos, a través del aumento en la longitud de la cauda de los cometas formados y en la frecuencia de micronúcleos.

Los plaguicidas a los que están expuestos, mostraron tener efecto genotóxico al provocar múltiples rupturas en el material genético, cuantificadas como un aumento en la migración del ADN, medida a través de la longitud de la cauda de los cometas formados; también se evidenció la actividad de plaguicidas con efecto clastógeno y aneuploidógeno que pudieron inducir la formación de los micronúcleos, como resultado de rupturas de cadena doble no reparadas, de daño al centrómero, cinetocoro o fibras del huso acromático.

No se puede determinar el efecto de cada plaguicida, los daños pueden ser respuesta a actividad individual o a una acción sinérgica o aditiva de las mezclas de plaguicidas.

El daño al ADN evaluado con el ensayo cometa identifica peligro de exposición, al mostrarse lesiones que pueden ser reparadas, pero que son clara expresión de la magnitud de las alteraciones, que en este caso resultaron ser significativas; con el análisis de micronúcleos se manifiesta la posibilidad de que se puedan generar enfermedades, envejecimiento celular prematuro o procesos de carcinogénesis por ser un biomarcador de efecto, utilizado incluso

como prueba de inestabilidad genética e intermediarios en el proceso de carcinogénesis (Tolbert *et al.* 1992, Zalacain *et al.* 2005).

Se mostró que las células epiteliales de la mucosa oral son útiles en estudios de biomonitorio por presentar mucha sensibilidad para la detección de exposición a agentes tanto genotóxicos como clastógenos y aneuploidógenos, propiedad que puede ser atribuida a su potencial para expresar una variedad de enzimas de activación carcinógena (Faust *et al.* 2004).

El ensayo cometa como biomarcador de exposición es un indicador importante de daño al ADN, y debido a sus características es una herramienta útil para estimar el riesgo genético de una exposición integrada para mezclas complejas de agentes químicos (Bolognesi 2003). Por otro lado, utilizar una prueba adicional como el análisis de micronúcleos, por ser un biomarcador de efecto, confiable como indicador de rupturas y pérdida de cromosomas mostró ser adecuado, ya que permite evaluar la magnitud y la relevancia biológica de los daños causados por las sustancias genotóxicas.

La trascendencia de éstos estudios radica en la posibilidad de brindar información acerca del riesgo al que se exponen las personas en contacto con éstas sustancias, de forma que los trabajadores y la sociedad tomen conciencia del problema y generen las formas en la que se ha de resolver. En primera instancia utilizar equipo adecuado de protección, ya que se ha demostrado que los trabajadores expuestos a plaguicidas de forma protegida, presentan menos daño en el ADN (Pastor *et al.* 2001, Bolognesi 2003); presionar para la prohibición de plaguicidas muy tóxicos, como ha sucedido en otros países; establecer normas y medidas reales

de control hacia fabricantes, distribuidores y usuarios; desarrollar programas de concientización para el uso y manejo de éstas sustancias; generar las condiciones para la reintroducción de técnicas tradicionales y alternativas para el control de plagas, pudiéndose combinar con la aspersión de plaguicidas benévolos.

IX. REFERENCIAS

- Albert L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. Rev. Toxicol. en Línea (retel), 1-17 <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf> . Consultada el 6/VII/2008.
- Albertini R., Anderson D., Douglas G., Hagman L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A., Norppa H., Shuker D., Tice R., Waters M. y Aitio A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutat. Res. 463, 111-172.
- Alpuche G. (1991). Plaguicidas organoclorados y medio ambiente. Ciencia y Desarrollo 96, 20-31.
- AMIPFAC (1995). Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes. Los plaguicidas en México, monografía. <http://www.monografias.com/trabajos14/losplaguicidas.shtml#que>. Consultada el 10/VIII/2008.
- Angelis K., Dusinská M. y Collins A. (1999). Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. Electrophoresis 20, 2133-2138.
- Ashby J., Tinwell H., Lefevre P. y Browne M. (1995). The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. Mutagenesis 10, 85-90.
- Au W., Sierra-Torres C., Cajas-Salazar N., Shipp B. y Legator M. (1999). Citogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. Environ. Health Perspect. 107, 501-505.
- Avishai N., Rabinowitz C. y Rinkevich B. (2003). Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity. Comparisons between visual and image analyses. Environ. Mol. Mutagen. 42, 155-165.
- Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E. y Stohs S. (1995). *In vivo* and *in vitro* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenasa leakage by selected pesticides. Toxicology 104, 29-40.
- Basso K. y Russo A. (2000). Detection and characterization of micronuclei in a murine liver epithelial cell line, by application of the *in vitro* cytokinesis block MN assay and PRINS. Mutagenesis 15, 349-356.
- Bock C., Rapp A., Dittmar H., Monajembashi K. y Greulich K. (1999). Localization of specific sequences and DNA single strand breaks in individual UV-A irradiated human lymphocytes by comet FISH. Prog. Biomed. Optics. 3568, 207-217.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. Mutat. Res. 543, 251-272.
- Bouguerra M. (1986). Los plaguicidas y el tercer mundo. Mundo Científico 59, 696 – 706.

- Bull S., Fletcher K., Boobis A. y Battershill J. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21, 93-103.
- Castillo-Cadena J., Tenorio-Vieyra L., Quintana-Carabia A., García-Fabila M., Ramírez-San Juan E. y Madrigal-Bujaidar E. (2006). Determination of DNA damage in floriculturist exposed to mixtures of pesticides. *J. Biomed. Biotechnol.* DOI 10.1155/JBB/2006/97896.
- Celik A. y Kanik A. (2006). Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 693-698.
- Chow P. (1987). *Petroquímica y sociedad*. Colec. La ciencia desde México. 39. FCE. México. 192 p.
- CICOPLAFEST. (1998). *Catálogo Oficial de Plaguicidas*. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR Y SSA México D.F.
- Countryman P. y Heddle J. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.
- Collins A., Duthie S. y Dobson V. (1993). Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
- Collins A., Azqueta O., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. y Stetina R. (2008). Review. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* DOI 10.1093/mutage/gem051.
- Costa C., Teixeira J., Silva S., Roma-Torres J., Coelho P., Gaspar J., Alves M., Laffon B., Rueff J. y Mayan O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 21, 343-350.
- Cremlyn R. (1986). *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Limusa. México. 11-26.
- Dimitrov B., Gadeva P., Benova D. y Bineva M. (2006). Comparative genotoxicity of the herbicides roundup, stomp and reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis* 21, 375-382.
- Eliséiev V., Afanásiev Y. y Yúrina N. (1985). *Histología*. Mir. URSS. 580 p.
- Ergene S., Celik A., Cavas T. y Kaya F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ. Int.* 33, 877 – 885.
- Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R., Mann M. y Mersch-Sundermann V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 566, 209-229.
- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81 – 95.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis – block micronucleus cytome assay. *Nat. Prot.* 2, 1084-1104.

- Fenech M. y Morley A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29-36.
- Ferrer A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Toxicol. Clin.* 26, 1-5.
- Fest C. y Schmidt K. (1973). *The chemistry of organophosphorus pesticides.* Springer-Verlag. Nueva York 122-135.
- García C. y Toalá H. (2003). Evaluación de la contaminación de residuos de plaguicidas organoclorados en el cultivo de melón (*Cucumis melo L.*), en localidades de la Comarca Lagunera. <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/cuencas/cucumis.pdf>. Consultada el 7/IX/2008.
- García G. (1998). Efectos teratógenos de la exposición a pesticidas. *Act. III Cong. Soc. Esp. Agric. Ecol.* 381-389.
- Garte S. y Bonassi S. (2005) Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutat. Res.* 592, 3-5.
- Gedik C., Ewen S. y Collins A. (1992). Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 313-320.
- Gillet L. y Schärer O. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106, 253-276.
- Glei M., Hovhannisyan G. y Pool-Zobel B. (2008). Use of comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutat. Res.* DOI 10.1016/j.mrrev.2008.01.006.
- Gobierno del Estado de Guerrero (2001). Secretaría de Gobernación: Centro Nacional de Desarrollo Municipal, Sistema Nacional de Información Municipal, disco compacto.
- Gosden J., Hanratty D., Starling J., Fantes J., Mitchell A. y Porteous D. (1991). Oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. *Cytogenet. Cell. Genet.* 57, 100-104.
- Grover P., Danadevi K., Mahboob M., Rozati R., Salena B. y Rahman M. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis* 18, 201-205.
- Hartmann A., Kiskinis E., Fjällman A. y Suter W. (2001). Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 497, 199-212.
- He F. (1994). Synthetic pyrethroids. *Toxicology* 91, 43-49.
- Heddle J. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutat. Res.* 18, 187-192.
- Heuser V., Erdtmann B., Kvitko K., Rohr P. y da Silva J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect and susceptibility. *Toxicology* 232, 235-247.

- INE (2005). Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. <http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/>. Consultada el 18/11/2008.
- INEGI (2001). Gobierno del Estado de Guerrero. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Anuario estadístico del Estado de Guerrero año 2000.
- Joksic G., Vidakovic A. y Spasojevic-Tisma V. (1997). Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ. Res.* 75, 113-118.
- Kakko I., Toimela T. y Taahti H. (2003). The synaptosomal membrane bound ATOasa as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosfera* 51, 475-480.
- Koch J., Kolvraa S., Petersen K., Gregersen N. y Bolund L. (1989) Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma* 98, 259-265.
- Landi S., Iazzolino E. y Barale R. (2000). Are baseline frequencies of SCEs, CAs and MN in human lymphocytes related to haematological values?. *Mutat. Res.* 469, 159-166.
- Lee B., Lee S. y Kim H. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonil contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 132, 219-227.
- López A., González de L. y Moreno S. (1987). La salud ambiental en México. S. XXI. México. 244 p.
- Lucero L., Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T., Creus A. y Marcos R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides. micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.* 464, 255-262.
- Mañas T., González C. y García O. (2006). La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoría.* 15, 53-60. <http://omega.fdomay.ubiobio.d/th/v/v15-2/a5.pdf>. Consultada el 10/VII/2008.
- Márquez C., Villalobos C., Poblete S., Villalobos E., García M. y Duk S. (2005). Cytogenetic damage in female chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 1-7.
- Márquez G. (2004). Actualización de la base de datos de plaguicidas. <http://www.semarnap.gob.mx/>. Consultada el 23/VIII/2008.
- Martínez-Valenzuela C. y Gómez-Arroyo S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Cont. Ambient.* 23, 185-200.
- McKelvey-Martin V., Green M., Schmezer P., Pool-Zobel B., De Méo M. y Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.* 288, 47-63.

- McKelvey-Martin V., Ho E., McKeown S., Jonston S., McCarthy P., Rajab N. y Downes C. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutagenesis* 13, 1-8.
- Miller B., Pötter-Locher F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D. y Madle S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutat. Res.* 410, 81-116.
- Moller P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 336-345.
- Moutchen-Dahmen J., Moutchen-Dahmen H. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants* (M. Kirsch-Volders, ED.). Plenum Press, Nueva York 127-203.
- Narahashi T., Frey J., Ginsburg K. y Roy M. (1992). Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.* 64/65, 420-436.
- Nersesyan A., Kundi M., Atefie K., Schulte-Hermann R. y Knasmüller S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assay with exfoliated oral mucosa cells. *Can. Epidemiol. Biomark. Prev.* 15, 1835-1840.
- Olive P., Banáth J. y Durand R. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86-94.
- Olive P. y Banáth J. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Protocol. Nat. Prot.* 1, 23 – 29.
- OMS (1990). Plaguicidas. Informe técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Ostling O. y Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Cebulska-Wasilewska A. y Marcos R. (2001). Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 495, 147-156.
- Patel S., Bajpayee M., Kumar P., Parmar D. y Dhawan A. (2007). *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol. Vit.* 21, 1409-1418.
- Ramírez J. y Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición. *Arch. Prev. Riesg. Lab.* 4, 67-75.
- Restrepo I. (1988). *Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México.* Andrómeda. México. 236 p.

- Rydberg B. y Johanson K. (1978). Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in: P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg, C. F. Fox (Eds.), DNA repair mechanisms. Academic Press. New York 465 p.
- Rojas E., López M. y Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. Review. J. Chromat. 722, 225-254.
- Rundell M., Wagner D. y Plewa M. (2003). The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation. Environ. Mol. Mutagen. 42, 61-67.
- Sailaja N., Chandrasekhar M., Rekhadevi P., Mahboob M., Rahman M., Vuyyuri S., Danadevi K., Hussain S. y Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutat. Res. 609, 74 – 80.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L., Ünsal-Kacmaz K. y Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. An. Rev. Biochem. 73, 39-85.
- Santos S., Singh N. y Natarajan A. (1997). Fluorescent in situ hybridization with comets. Exp. Cell. Res. 232, 407-411.
- Sarto F., Finnetto S., Giacomelli L., Mazotti D., Tomanin R. y Levis A. (1987). Micronucleus assay in exfoliated cells of human buccal mucosa. Mutagenesis 2, 11-17.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. Mutat. Res. 31, 9-15.
- SEMARNAP (1996). Lo que usted debe saber sobre la gestión de los plaguicidas en México. Serie plaguicidas núm, 4. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, México.
- Singh N., McCoy M., Tice R. y Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res. 175, 184-191.
- Singh N. (2000). Microgel for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutat. Res. 455, 111-127.
- Speit G. y Schmid O. (2006). Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. Mutat. Res. 613, 1-9.
- Speit G., Vasquez M. y Hartmann A. (2008). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutat. Res. DOI 10.1016/j.mrrev.2008.03.005.
- Stellman J. y Daum S. (1973). El trabajo es peligroso para la salud. S. XXI. México. 452 p.
- Stich H., San R. y Rosin M. (1983). Adaptation of the DNA repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cell. Ann. N. Y. Acad. Sci. 407, 93-105.
- Suhas S., Ganapathy K. y Gayatri Devi A. (2004). Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. Mutat. Res. 561, 15-21.

- Tolbert P., Shy C. y Allen J. (1992). Micronulei and other nuclear abnormalities in buccal smears: Methods and development. *Mutat. Res.* 271, 69-77.
- Tordoir W. y Van Sittert N. (1994). Organochlorines. *Toxicology* 91, 51-57.
- Villena J., Córdoba A. y Peñaloza de Terán M. (2007). Intoxicaciones con Plaguicidas en San Miguel de Tucumán durante el período 2001- 2002. *Rev. Toxicol. en Línea (retel)* 1-15.
- Wasson G., McKelvey-Martin V. y Downes C. (2008) The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* DOI 10.1093/mutage/gen003.
- WHO (2004). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, World Health Organization, Ginebra.
- Wojda A., Zietkiewicz E. y Witt M. (2007). Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 22, 195-200.
- Zalacain M., Sierrasesúмага L. y Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28, 227 – 236.
- Zeljezik D. y 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.

ANEXOS

Anexo 1.

Cuestionario aplicado a los trabajadores agrícolas de Tlapehuala, Guerrero.

1. ¿En su familia han tenido problemas de infertilidad, defectos de nacimiento o cáncer? _____
2. ¿Cuántos abortos, muertos antes de nacer, partos prematuros o hijos con bajo peso al nacer ha tenido su esposa? _____
3. ¿Ha padecido alguno de los siguientes problemas: circulatorios _____
renales _____ respiratorios _____ digestivos _____ dérmicos _____ infecciones?
4. ¿Ha presentado en los últimos seis meses algunos de los siguientes síntomas:
Visión borrosa _____ náuseas _____ vómito _____ dolor abdominal _____
diarrea _____ dolores de cabeza _____?
5. ¿Ha tomado antibióticos en los últimos meses? Si No ¿cuál? _____
6. ¿Manipula directamente algún plaguicida? _____ ¿cuales? _____
7. ¿Aplica plaguicidas? _____ ¿cuales? _____
8. ¿Con que frecuencia? un ciclo _____ todo el año _____
9. ¿Hace cuanto tiempo tiene contacto con plaguicidas? _____
10. ¿Los guarda en su vivienda? _____
11. ¿Consume alimentos después de aplicarlos? _____
12. ¿Utiliza la misma ropa después de la aplicación? _____
13. ¿Está en contacto con otro tipo de compuestos? _____
14. ¿Le han tomado radiografías recientemente? _____
15. ¿Fuma cigarros? _____ ¿cuantos al día? _____
16. ¿Consume alcohol? _____ ¿con que frecuencia? _____
17. ¿Toma té o café? _____ ¿cuantas tazas al día? _____
18. ¿Consume alguna droga? _____ ¿cuál? _____
19. ¿Consume carnes? _____ ¿cuántas veces a la semana? _____
20. ¿Consume vegetales? _____ ¿Cuántas veces a la semana? _____

TABLAS

Tabla 1

Características individuales de la población expuesta a plaguicidas

Número de individuo	Edad (años)	Tiempo de exposición (años)	Fumador (cigarros/día)	Bebedor (veces/mes)
1	14	3	0	0
2	13	4	0	0
3	29	19	0	0
4	15	2	0	0
5	53	15	1	0
6	16	1	0	0
7	45	20	0	1
8	16	1	0	0
9	18	1	0	0
10	17	2	0	0
11	25	1	0.29	4
12	19	5	0	0
13	50	1	0.29	1
14	20	10	0	4
15	24	6	0	1
16	29	13	0	0
17	20	5	0	0
18	83	10	0	0
19	39	20	0	1
20	40	12	0	1
21	54	40	0	0
22	66	57	0	0
23	58	20	0	1
24	20	6	0	0
25	16	3	0	0
26	14	2	0	0
27	58	11	0	4
28	38	15	0.29	0
29	41	11	0	1
30	21	2	2	4
31	14	2	0	0
32	17	2	0	0
33	14	1	0	0
34	77	7	0	4
35	31	12	0	0
36	76	16	0	0

Tabla 2

Características individuales de la población no expuesta a plaguicidas

Número de individuo	Edad (años)	Fumador (cigarros/día)	Bebedor (veces/mes)
1	65	0	0
2	53	0	Ocasional
3	60	0	0
4	30	0	Ocasional
5	30	0	0
6	49	6	Ocasional
7	35	0	Ocasional
8	41	0	Ocasional
9	64	0	0
10	37	0	0
11	49	0	0
12	37	0	Ocasional
13	19	0	0
14	30	0	0
15	38	0	0
16	37	0	2
17	31	0	2
18	15	0	0
19	27	0	0
20	23	0	0

Tabla 3

Características de la población estudiada con respecto a edad, tiempo de exposición y hábitos (fumadores y bebedores)

PARÁMETROS:	GRUPO NO EXPUESTO (N=20)	GRUPO EXPUESTO (N=36)
Edad (años):		
Rango	15 – 65	13 – 83
Promedio ± DE	38.5 ± 14.23	33.39 ± 20.73
Tiempo de exposición (años):		
Rango	0	1 – 57
Promedio ± DE	0	9.94 ± 11.58
Fumadores n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)
No fumadores n (%)	20 (100 %)	36 (100 %)
Bebedores n (%)	0 (0 %)	0 (0 %)
No bebedores n (%)	20 (100 %)	36 (100 %)

Tabla 4

Plaguicidas utilizados por los trabajadores agrícolas de Tlapehuala, Guerrero y daño reportado en diversas investigaciones

Principio activo	Aberraciones cromosómicas	Micronúcleos	Daño con ensayo cometa	Daño específico reportado	Referencias
Atrazina	+	+	+	Clastogénico	5, 7
Carbofurán			+		8
Cipermetrina	+	+		Citotóxico, carcinogénico	6, 11, 12, 13
Glifosato	+	+	+	Probable genotóxico	9, 10
Lambda cyalotrina	+	+		Probable carcinogénico	4, 9, 12
Malatión	+	+	+	Clastogénico y aneugénico	5, 12
Metamidofos	+	+	+		7, 8, 12
Metomilo	+	+	+		8, 9
Paraquat		+		Teratogénico, carcinogénico	2, 7
Paratión metílico	+	+	+	Clastogénico	8, 12
Tiabendazol	+				3
2, 4 – D	+	+	+	Clastogénico, teratogénico	1, 2, 5

Únicamente se señalan los datos positivos encontrados.

Referencias:

1. Joksic *et al.* 1997.
2. García 1998.
3. Au *et al.* 1999.
4. Pastor *et al.* 2001.
5. Zeljezic y Garaj-Vhrovac 2001.
6. Grover *et al.* 2003.
7. Márquez *et al.* 2005.
8. Castillo-Cadena *et al.* 2006.
9. Costa *et al.* 2006.
10. Mañas *et al.* 2006.
11. Sailaja *et al.* 2006.
12. Ergene *et al.* 2007.
13. Patel *et al.* 2007.

Tabla 5

Evaluación individual del daño genotóxico causado por los plaguicidas en trabajadores agrícolas de Tlapehuala, Guerrero

Número de individuo	Longitud de la cauda del cometa (Promedio \pm DE) (μm)	Daño (Promedio \pm EE) (%)	Frecuencia en el nivel de daño (Número de células)				
			0	1	2	3	4
1	140.36 \pm 35.03	99 \pm 3.50	1	14	81	4	0
2	202.62 \pm 75.39	68 \pm 7.54	32	5	31	23	9
3	156.94 \pm 29.68	92 \pm 2.97	8	0	85	7	0
4	178.83 \pm 50.15	70 \pm 5.01	30	0	51	18	1
5	131.61 \pm 39.92	74 \pm 3.99	26	19	53	2	0
6	128.60 \pm 34.90	48 \pm 3.49	52	11	37	0	0
7	127.71 \pm 37.07	76 \pm 3.71	24	13	59	4	0
8	160.68 \pm 31.63	82 \pm 3.16	18	2	68	12	0
9	140.82 \pm 28.67	65 \pm 2.87	35	5	60	0	0
10	245.65 \pm 54.02	71 \pm 5.40	29	0	12	46	13
11	180.00 \pm 42.49	86 \pm 4.25	14	1	50	35	0
12	161.18 \pm 35.40	83 \pm 3054	17	1	71	11	0
13	175.00 \pm 34.03	59 \pm 3.40	41	0	42	17	0
14	312.46 \pm 48.63	83 \pm 4.86	17	1	1	28	53
15	181.02 \pm 51.47	80 \pm 5.15	20	5	43	31	1
16	164.21 \pm 52.81	93 \pm 5.28	7	9	67	15	2
17	121.69 \pm 29.68	71 \pm 2.97	29	20	51	0	0
18	99.55 \pm 30.47	96 \pm 3.05	4	40	56	0	0
19	123.38 \pm 28.43	54 \pm 2.84	46	11	43	0	0
20	122.01 \pm 24.76	86 \pm 2.48	14	19	67	0	0
21	120.28 \pm 37.58	86 \pm 3.76	14	26	59	1	0
22	126.00 \pm 55.31	28 \pm 5.53	72	12	11	5	0
23	103.54 \pm 22.06	85 \pm 2.21	15	30	55	0	0
24	115.10 \pm 25.45	73 \pm 2.55	27	21	52	0	0
25	154.53 \pm 33.18	95 \pm 3.32	5	2	79	14	0
26	173.63 \pm 38.68	92 \pm 3.87	8	3	61	28	0
27	175.35 \pm 31.65	63 \pm 3.17	37	0	46	17	0
28	136.42 \pm 20.12	70 \pm 2.01	30	2	68	0	0
29	151.17 \pm 21.86	86 \pm 2.19	14	0	86	0	0
30	145.90 \pm 33.79	91 \pm 3.38	9	8	77	6	0
31	198.25 \pm 50.13	91 \pm 5.01	9	1	51	34	5
32	147.46 \pm 33.57	95 \pm 3.36	5	8	85	2	0
33	114.12 \pm 25.14	71 \pm 2.51	29	21	50	0	0
34	163.42 \pm 28.58	88 \pm 2.86	12	3	77	8	0
35	169.46 \pm 38.60	87 \pm 3.86	13	3	59	25	0
36	159.01 \pm 31.10	75 \pm 3.11	25	3	67	5	0
Promedio \pm DE	155.78 \pm 40.62	78.11 \pm 15.13	21.8 \pm 15.13	8.86 \pm 9.91	55.86 \pm 20.24	11.06 \pm 12.66	2.33 \pm 9.09

Tabla 6

Evaluación individual del daño genotóxico en la población no expuesta a plaguicidas

Número de individuo	Longitud de la cauda del cometa (Promedio \pm DE) (μm)	Daño (Promedio \pm EE) (%)	Frecuencia en el nivel de daño (Número de células)				
			0	1	2	3	4
1	108.90 \pm 16.87	8 \pm 1.69	92	3	5	0	0
2	124.96 \pm 15.51	15 \pm 1.55	85	1	14	0	0
3	130.63 \pm 13.28	7 \pm 1.33	93	0	7	0	0
4	118.08 \pm 16.62	10 \pm 1.66	90	1	9	0	0
5	95.52 \pm 20.01	10 \pm 2.00	90	6	4	0	0
6	130.86 \pm 30.30	21 \pm 3.03	79	4	17	0	0
7	115.80 \pm 26.35	21 \pm 2.64	79	6	15	0	0
8	114.13 \pm 30.24	9 \pm 3.02	91	4	5	0	0
9	97.44 \pm 16.60	20 \pm 1.66	80	10	10	0	0
10	120.60 \pm 20.52	8 \pm 2.05	92	1	7	0	0
11	98.06 \pm 26.01	7 \pm 2.60	93	3	4	0	0
12	78.93 \pm 18.88	9 \pm 1.89	91	8	1	0	0
13	116.00 \pm 7.07	6 \pm 0.71	94	0	6	0	0
14	103.20 \pm 13.99	5 \pm 1.40	95	3	2	0	0
15	79.68 \pm 12.86	5 \pm 1.29	95	5	0	0	0
16	94.08 \pm 22.86	5 \pm 2.29	95	3	2	0	0
17	115.20 \pm 20.52	10 \pm 2.05	90	3	7	0	0
18	109.68 \pm 41.14	10 \pm 4.11	90	4	6	0	0
19	99.43 \pm 29.81	7 \pm 2.98	93	4	3	0	0
20	117.60 \pm 20.96	9 \pm 2.10	91	6	3	0	0
Promedio \pm DE	108.44 \pm 14.85	10.1 \pm 5.11	89.8 \pm 5.11	3.75 \pm 2.59	6.25 \pm 4.66	0	0

La significancia obtenida para cada uno de los parámetros medidos al comparar al grupo expuesto y no expuesto fue estadísticamente significativa, excepto para el nivel de daño 4.

Longitud de la cauda del cometa P < 0.000

Daño (%) P < 0.000

Daño en el nivel 0 P < 0.000

Daño en el nivel 1 P < 0.028

Daño en el nivel 2 P < 0.000

Daño en el nivel 3 P < 0.000

Daño en el nivel 4 P < 0.258 No significativo

Tabla 7

Evaluación individual del análisis de micronúcleos en el grupo expuesto

Número de individuo	Células binucleadas	Células con micronúcleos	Células con efecto de huevo roto	Células con cariolisis	Células con cromatina condensada	Células con cariorresis	Células con pincosis
1	10	2	1	1	0	0	2
2	11	5	1	2	1	0	5
3	7	4	0	0	0	0	1
4	9	0	0	0	0	0	0
5	11	0	0	0	0	0	0
6	7	0	0	1	0	0	1
7	16	0	0	0	0	0	2
8	7	1	0	0	0	1	1
9	8	1	0	1	0	0	4
10	10	2	1	0	0	0	5
11	17	3	2	0	0	0	5
12	9	0	0	0	0	0	0
13	16	3	0	0	0	0	1
14	16	5	1	1	0	0	1
15	8	0	0	0	0	0	2
16	9	0	0	0	0	0	0
17	8	0	0	0	0	0	1
18	22	3	0	0	0	0	4
19	7	0	0	0	0	0	1
20	14	0	0	0	0	0	0
21	11	4	0	1	0	0	5
22	23	3	0	0	0	2	0
23	12	7	0	0	1	0	5
24	17	5	0	0	0	0	2
25	9	4	0	0	0	1	1
26	8	2	0	0	0	0	0
27	16	3	0	0	0	0	0
28	10	1	0	0	0	0	0
29	8	2	0	0	0	1	1
30	6	1	0	0	0	0	1
31	11	1	0	0	0	0	3
32	15	4	0	0	0	0	0
33	12	4	2	3	0	0	4
34	9	2	0	0	0	0	3
35	9	2	1	0	1	0	3
36	0	2	0	0	0	0	3
Suma	398	76	9	10	3	5	67
Promedio	11.06	2.11	0.25	0.28	0.08	0.14	1.86
Desv. Est	4.62	1.86	0.55	0.66	0.28	0.42	1.78
Error Est	0.53	0.26	0.22	0.22	0.22	0.22	0.28

Tabla 8

Evaluación individual del análisis de micronúcleos en el grupo no expuesto

Número de individuo	Células binucleadas	Células con micronúcleos	Células con efecto de huevo roto	Células con cariolisis	Células con cromatina condensada	Células con cariorresis	Células con picnosis
1	9	0	0	0	0	0	0
2	11	2	0	0	0	0	0
3	19	1	0	0	0	0	0
4	13	0	0	0	0	0	0
5	12	1	0	1	0	0	1
6	20	0	0	0	0	0	1
7	9	2	0	0	0	0	1
8	11	1	0	0	0	0	2
9	15	2	1	0	1	0	1
10	6	0	0	0	0	0	0
11	5	0	0	0	0	0	0
12	39	0	0	1	0	0	3
13	12	0	1	0	0	0	0
14	6	0	0	0	0	1	0
15	3	0	0	0	0	0	0
16	6	0	0	0	0	0	0
17	9	0	0	0	0	0	0
18	7	0	0	0	1	0	0
19	6	3	0	0	0	0	0
20	7	1	0	0	0	0	0
Suma	225	13	2	2	2	1	9
Promedio	11.25	0.65	0.10	0.10	0.10	0.05	0.45
Desv. Est	7.93	0.93	0.31	0.31	0.31	0.22	0.83
Error Est	0.53	0.26	0.22	0.22	0.22	0.22	0.28

La significancia obtenida para cada uno de los parámetros medidos al comparar al grupo expuesto y no expuesto fue estadísticamente significativa para las células con micronúcleos, con picnosis y en apoptosis o necrosis.

Células binucleadas	P < 0.907	Células con micronúcleos	P < 0.002
Células con efecto de huevo roto	P < 0.269	Células con cariolisis	P < 0.261
Células con cariorresis	P < 0.388	Células con picnosis	P < 0.001
Células en apoptosis o necrosis	P < 0.002		

Tabla 9

Tiempo de exposición a los plaguicidas por rangos de 10 años, mostrando parámetros de daño promedio en el análisis de micronúcleos

Parámetro (promedio \pm DE)	Tiempo de exposición de 1 a 10 años	Tiempo de exposición de 11 a 20 años	Tiempo de exposición con más de 20 años
Células binucleadas	11.14 \pm 4.2	9.92 \pm 4.44	17 \pm 8.49
Células con micronúcleos	2.18 \pm 1.76	1.75 \pm 2.14	3.5 \pm 0.71
Células con efecto de huevo roto	0.76 \pm 0.66	0.08 \pm 0.29	0
Células en necrosis o apoptosis	2.64 \pm 2.24	1.58 \pm 1.93	4 \pm 2.83

FIGURAS

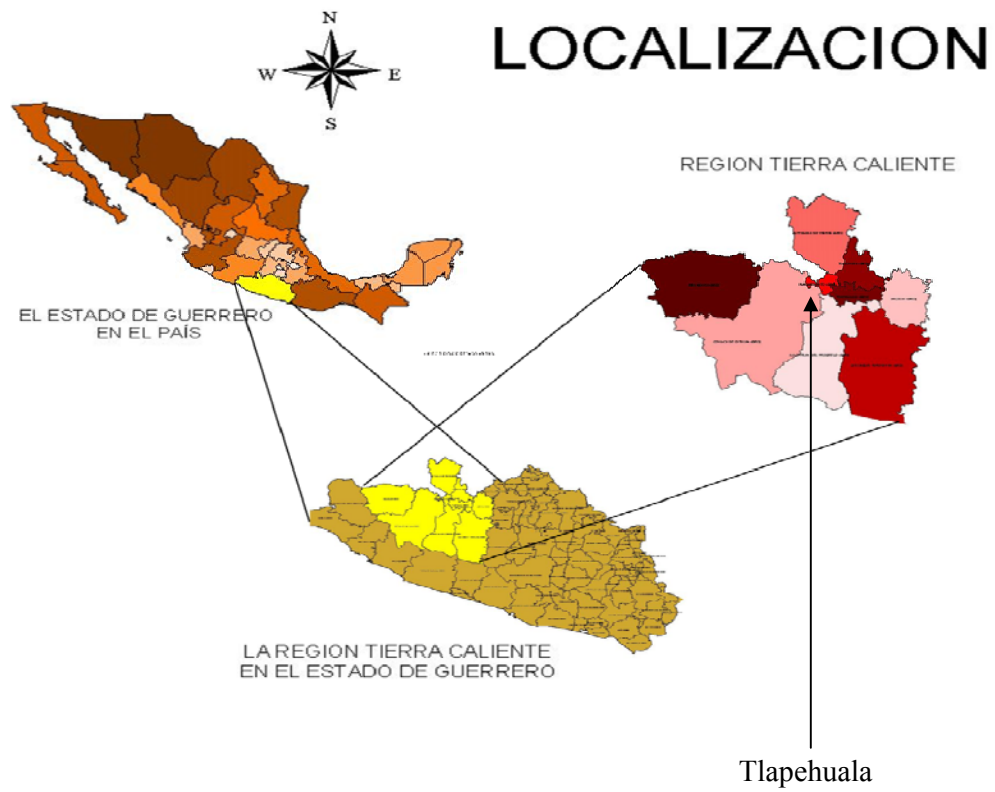


Figura 1. El Municipio de Tlapehuala se localiza en la Región de Tierra Caliente del Estado de Guerrero.

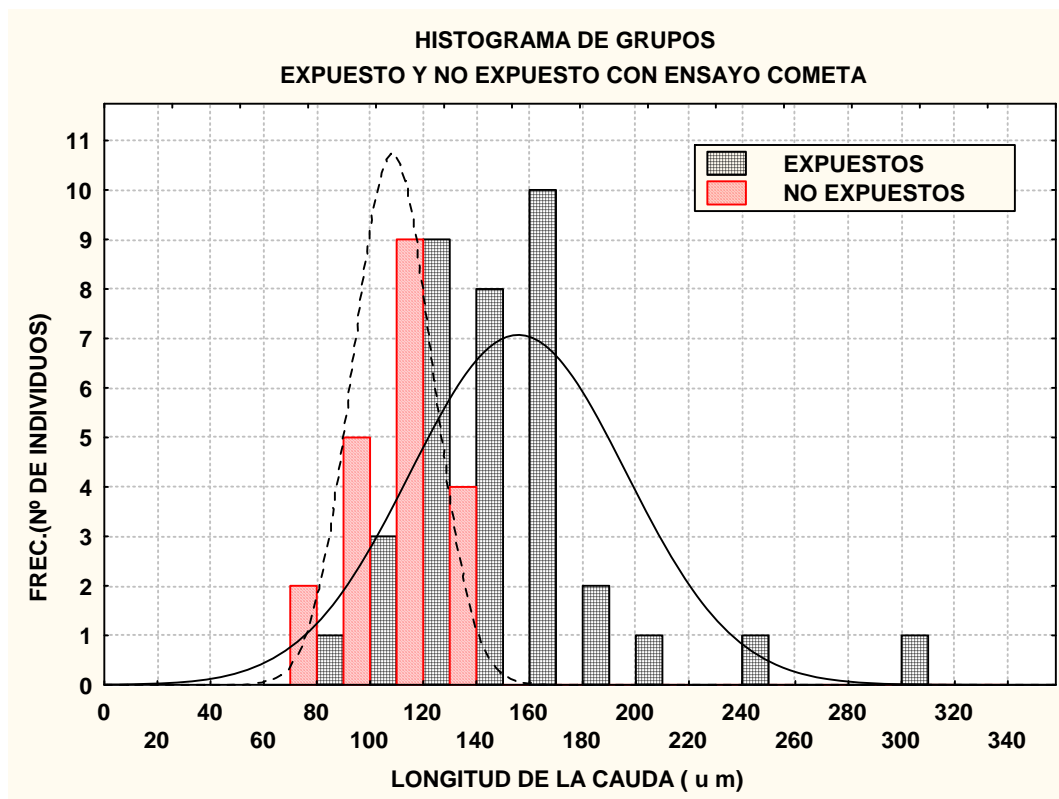
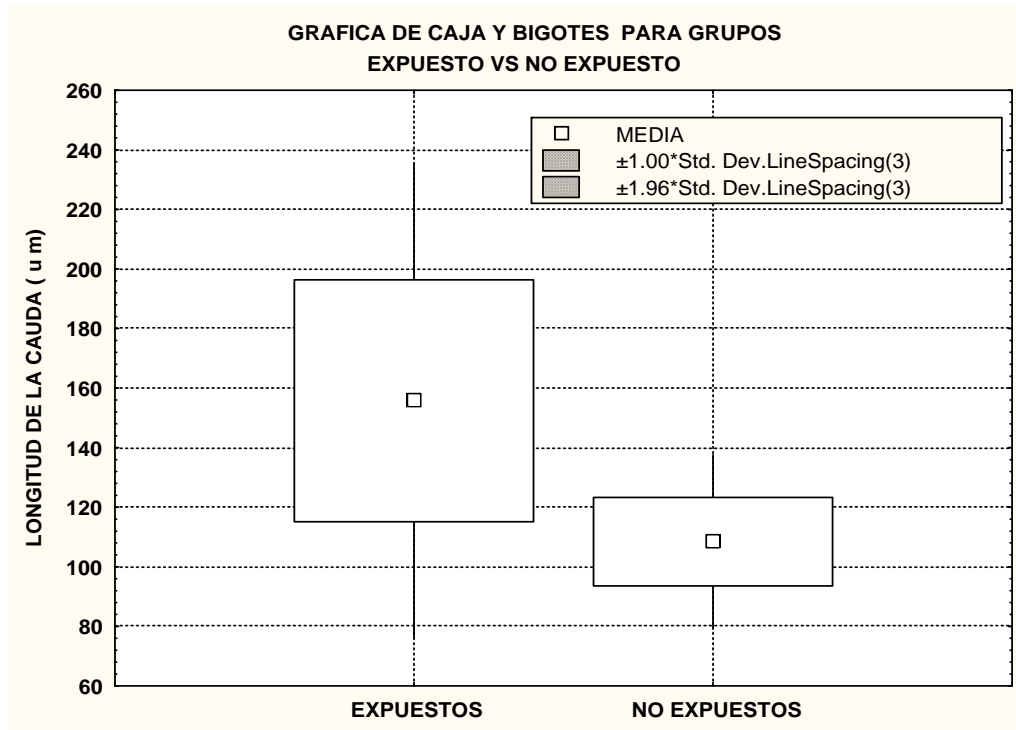


Figura 2. Gráfica de cajas y bigotes e histograma mostrando la comparación entre los promedios del grupo expuesto y no expuesto a plaguicidas con el ensayo cometa

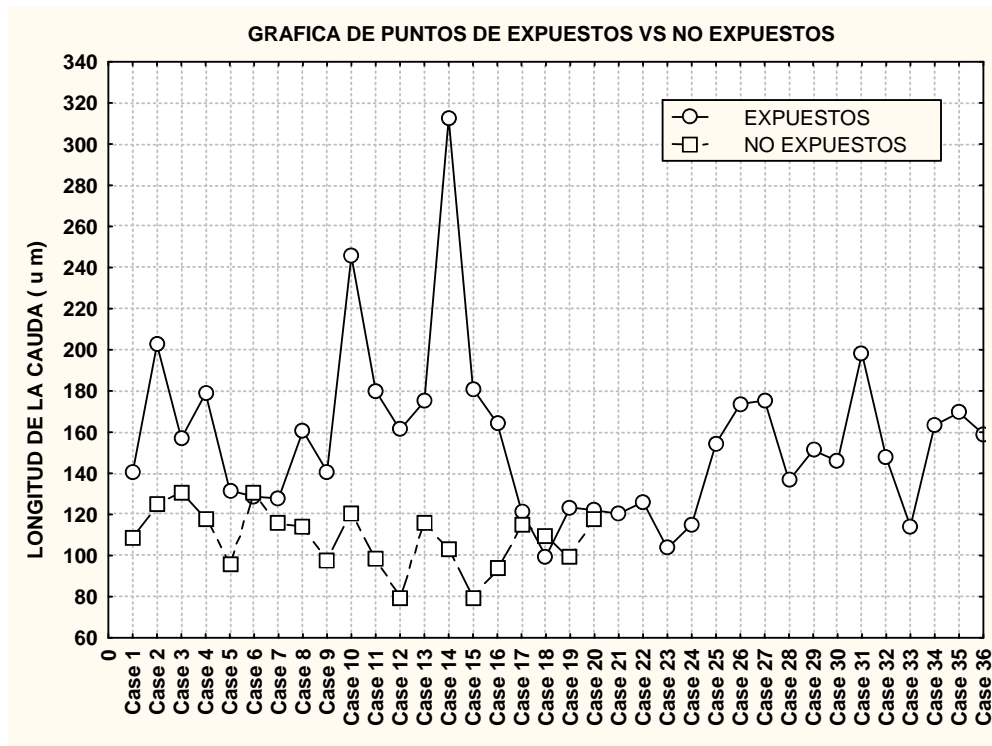


Figura 3. Gráfica de puntos de los grupos expuesto y no expuesto a los plaguicidas mostrando el promedio de la longitud de la cauda de los cometas por persona.

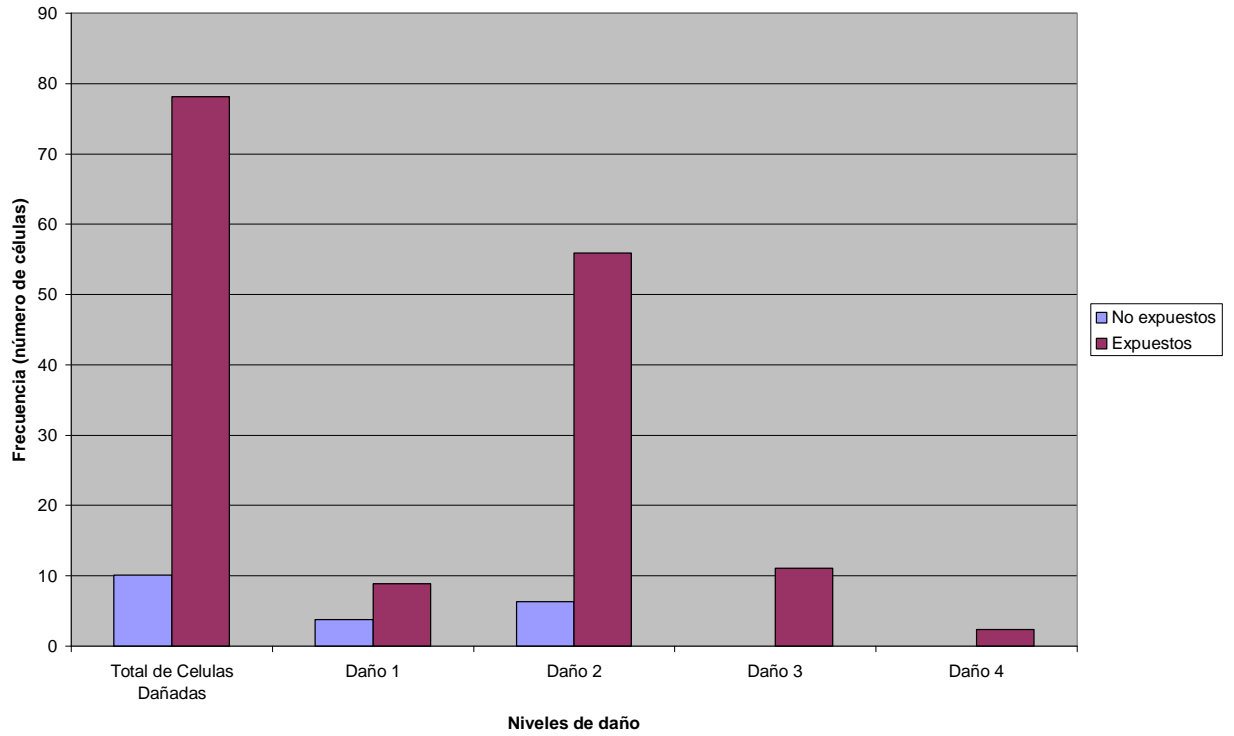


Figura 4. Relación comparativa entre niveles de daño y número de células dañadas en los grupos no expuesto y expuesto a plaguicidas con el ensayo cometa.

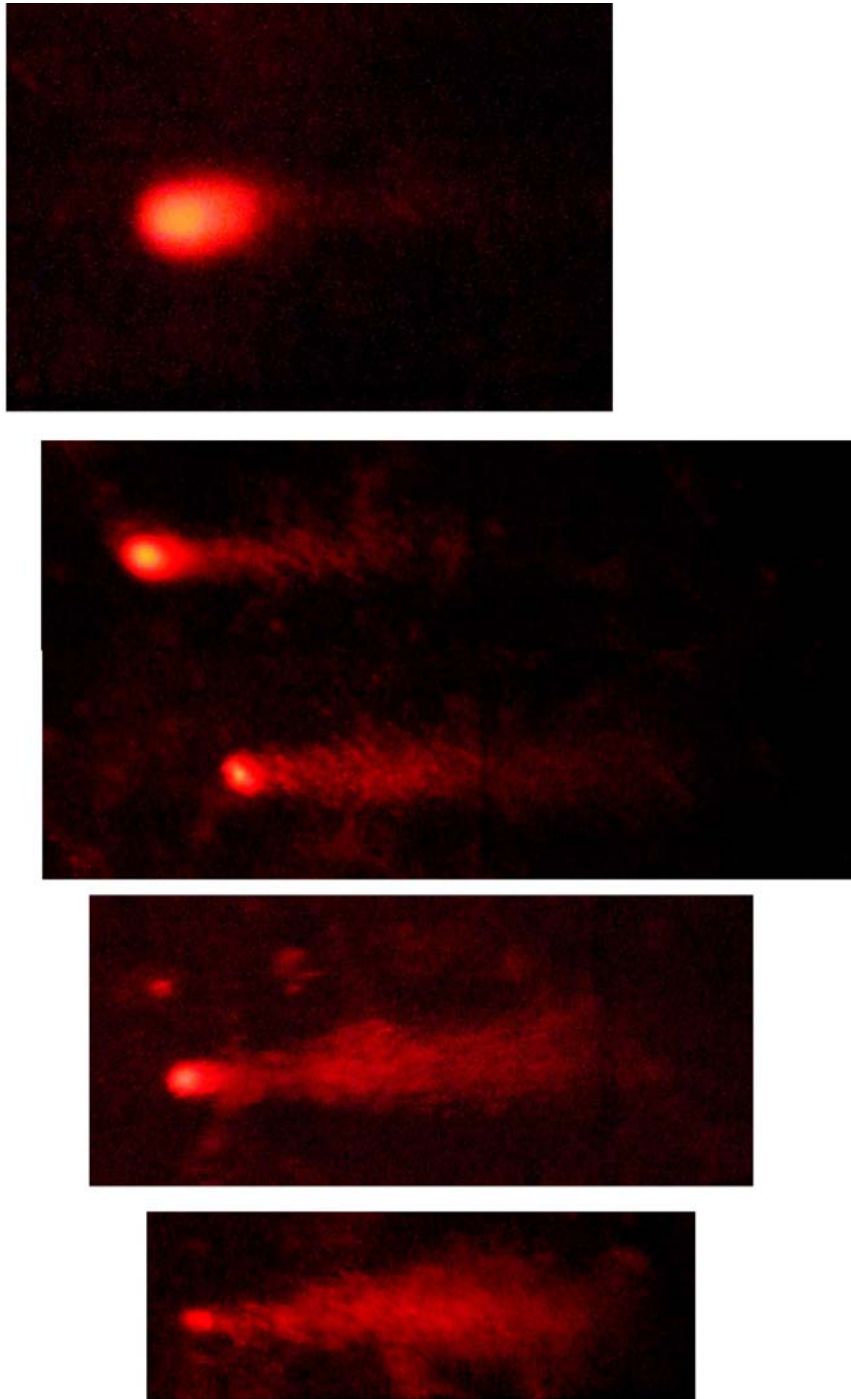


Figura 5. Microfotografías de los cometas observados, ordenados por niveles de daño.

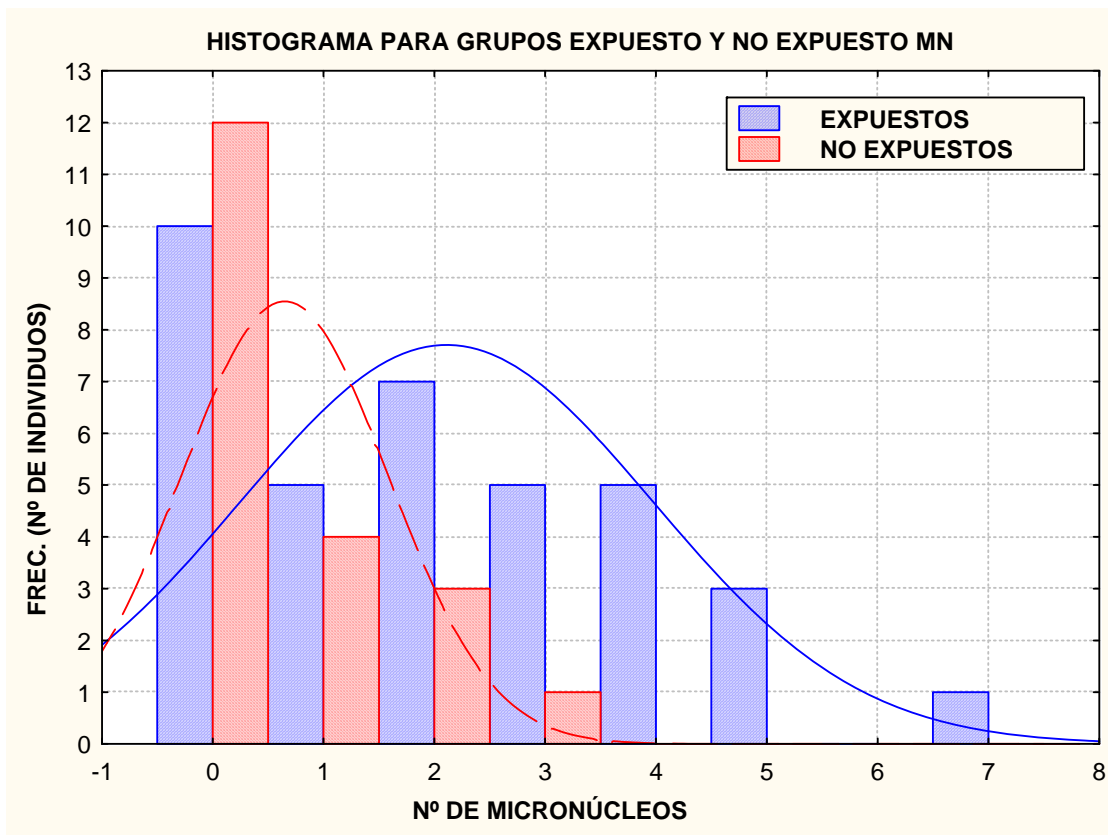
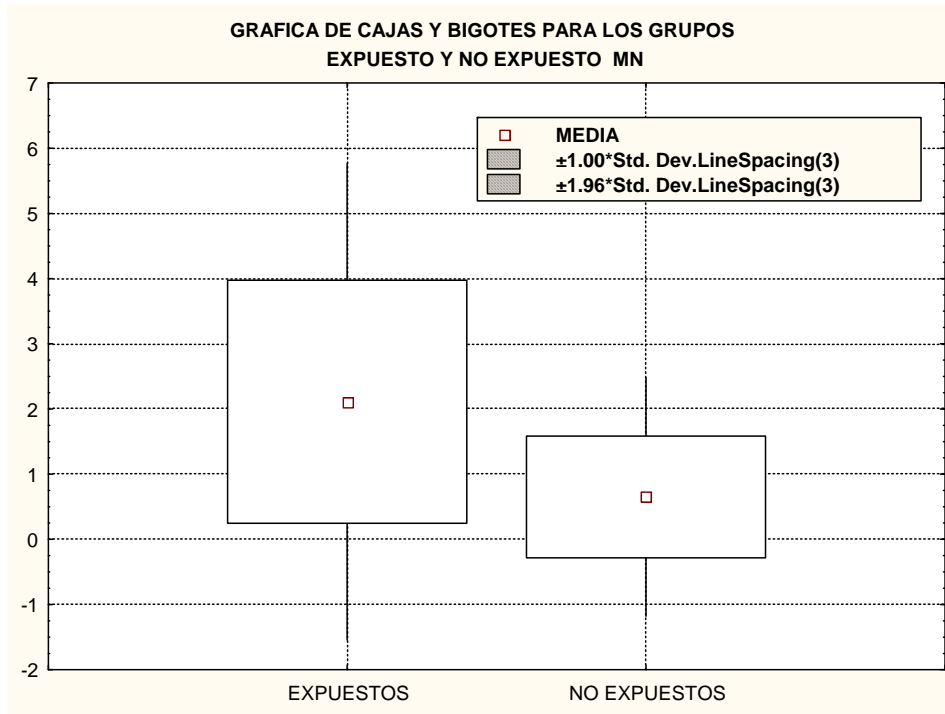


Figura 6. Gráfica de cajas y bigotes e histograma mostrando la comparación entre las medias de los grupos expuesto y no expuesto para el análisis de micronúcleos.

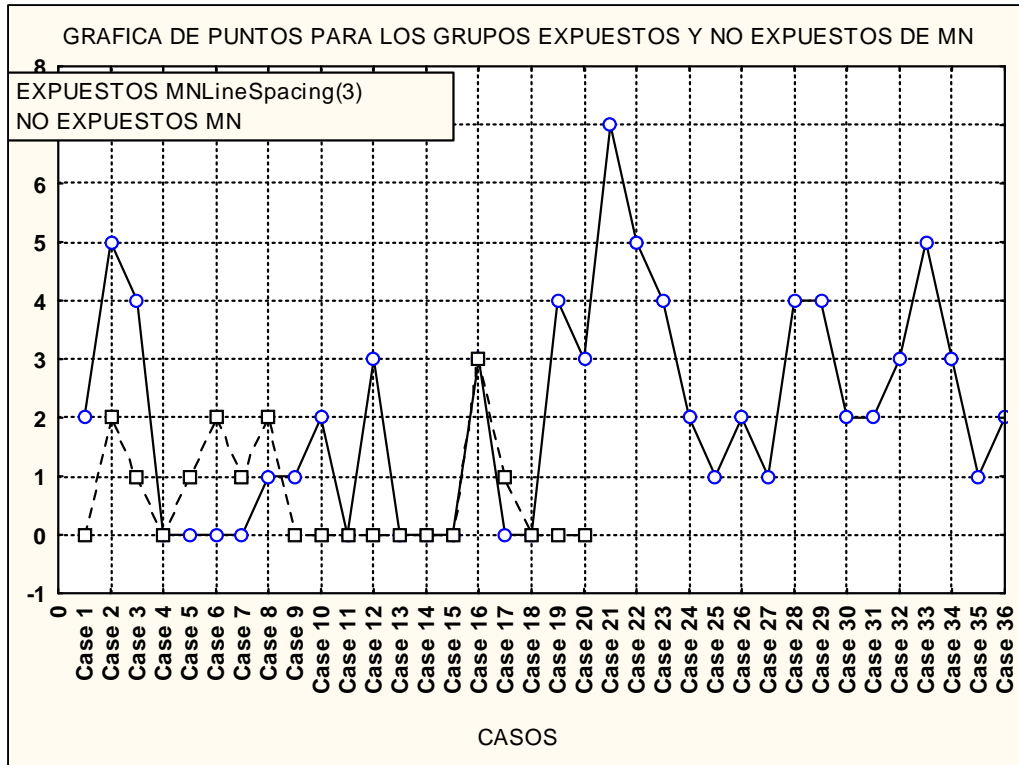
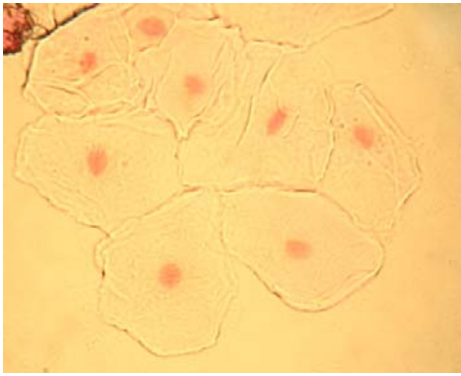
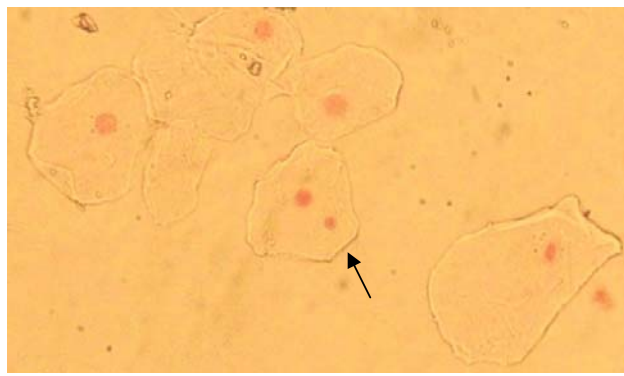


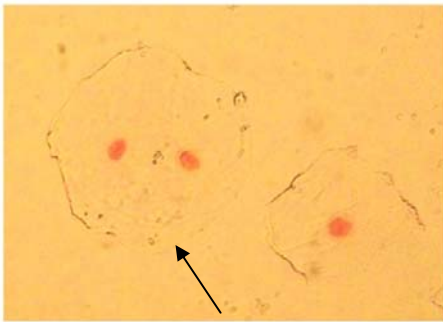
Figura 7. Gráfica de puntos mostrando en los grupos expuesto y no expuesto a plaguicidas el número de micronúcleos por persona.



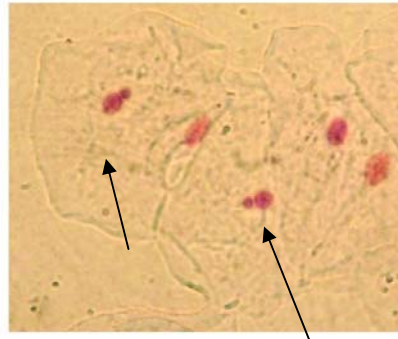
Células sin daño



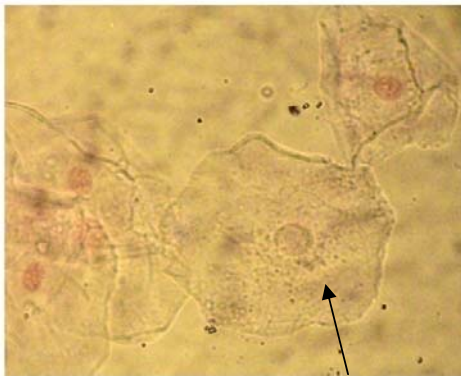
Célula con micronúcleo



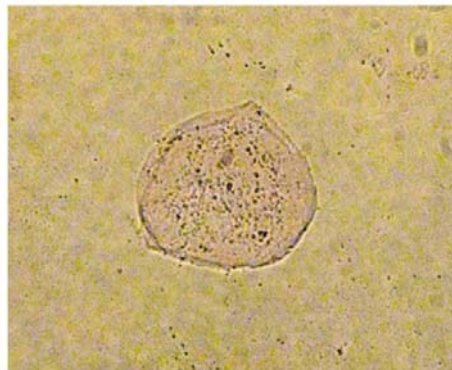
Célula binucleada



Células con efecto de huevo roto



Célula con cariólisis



Célula con picnosis

Figura 8. Microfotografías de las células observadas en el análisis de micronúcleos.

TABLAS ADICIONALES:

Tipo y principio activo	Uso y frecuencia de uso	Modo de acción	Toxicidad	Daño al ADN detectado
Organo-fosforados Glifosato Metamidofos, Malatión, Paratión metílico	Herbicida Insecticidas y acaricidas 27%	Neurotóxicos. Inhiben por fosforilación a la acetilcolinesterasa.	IV II IV I	Todos MN, EC, AC. Genotóxicos, aneugénicos y clastogénicos.
Piretroides Lambda cyaotrtrina Cipermetrina	Insecticidas y acaricidas 12%	Neurotóxicos. Intervienen en el mecanismo de apertura de los canales de sodio y de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ .	III	Los dos AC y MN carcinogénicos, citotóxico.
Carbamatos Carbofurán Metomilo	Insecticidas y acaricidas 12%	Neurotóxicos. Inhiben por carbamilación a la acetilcolinesterasa.	II	EC AC, MN, EC
Piridina Picloram	Herbicida 7%		IV	No se encontraron datos
Bipirilo Paraquat *	Herbicida 7%	Generadores de estrés oxidativo. Forman radicales libres y peroxidación de lípidos.	II	Teratogénico, carcinogénico
Trazina Atrazina	Herbicida 7%	Inhibidores de la fotosíntesis. Forman radicales libres que destruyen la célula y por bloqueo de fotofosforilación cíclica.	IV	AC, MN, EC, Clastogénico
Arilofenoxi-propionato Fluasifop-p-butyl	Herbicida 7%	Inhibidores de la biosíntesis de lípidos de membrana.	IV	No se encontraron datos
Sulfonilurea Nicosulfuron	Herbicida 7%	Inhibidores del crecimiento y desarrollo en plantas.	IV	No se encontraron datos
Acido fenoxi-carboxílico 2, 4 - D	Herbicida 7%	Neurotóxico. Causa acidosis metabólica, débil desacoplador de fosforilación oxidativa.	III	AC; MN, EC, Clastogénico, teratogénico
Metilbenzimidazol Tiabendazol	Fungicida 7%	Al parecer es inhibidor de la biosíntesis del ADN. El metil benzimidazol carbamato es Inhibidor de la mitosis Evita polimerización de la tubulina.	III	AC

AC Aberraciones cromosómicas; EC Ensayo cometa; MN Análisis de micronúcleos

Prohibidos en países industrializados (Uso restringido en México *)

Nombre comercial	Principio activo	Tipo toxicológico	Persistencia	Efectos en caso de intoxicación.
Mata todo, Faena (Monsanto), Coloso (Syngenta, Zeneca Mexicana)	Glifosato: N(fosfonometil) glicina en forma de sal	IV La genotoxicidad en sistemas biológicos puede ser evidente a partir de los 400 mg/Kg, en algunos estudios se ha encontrado daño desde los 300 mg/Kg (Mañas 2006)	1 Vida media: 2 – 174 días; se absorbe fuertemente al suelo, es biodegradable y no hay bioconcentración.	No existe antídoto específico. El contacto con los ojos causa de irritación moderada, temporal o ceguera. En piel provoca irritación moderada, ingerido irritación gastrointestinal, vómito o diarrea. Se han reportado efectos genotóxicos, hormonales y enzimáticos en animales y podría serlo para células de mamíferos En personas expuestas se ha relacionado con un mayor riesgo de producir linfomas no Hodkin. En rata se ha visto afectado el hígado, hay reducción de peso, efectos histopatológicos, disminución de la supervivencia, en el desarrollo del embrión hay pérdida de peso posterior a la implantación y osificación tardía. Sólo se observan efectos sobre la descendencia cuando hay toxicidad materna.
Tordón (Dow Agrosoluciones de México)	Picloram: Sal dietilamino de picloram (ácido amino-3,5,6 tricloropicolínico) y contiene 2,4-D.	IV	3 Moderada, de 3 a 44 semanas	Puede provocar irritación severa, quemaduras ligeras en ojos, en piel irritación o quemaduras moderadas. No hay antídoto específico.
Gramoxone (Syngenta, Zeneca Mexicana), Banvel (Syngenta, Novartis Agro), Dragón	Paraquat	II	4 Altamente persistente, hasta por 3 años; biodegradable	Ingerido es mortal. Daña el pulmón (órgano blanco) produciendo fibrosis pulmonar progresiva y edema pulmonar. Causa inflamación de córnea y conjuntivas, irritación de nariz y garganta, hemorragias nasales, náuseas, vómito, diarrea, cianosis, formación de ampollas, malformaciones en el crecimiento de uñas, daños al miocardio y riñón. Probable cáncer en algunas especies animales de laboratorio.

Gesaprim (Syngenta, Novartis Agro)	Atrazina: 6-cloro-N2- etil-N4- isopropil- 1,3,5- triazina- 2,4- diamina	IV LD 50 oral > de 500 mg/Kg	2 Efecto residual prolongado (2 a 3 meses), dependiendo del tipo de sue- lo, contenido de materia orgánica y condiciones climáticas. Persistencia en suelo por un año.	El contacto puede irritar tracto respiratorio superior, ojos y en la piel puede causar alergia, generando que con exposiciones posteriores a muy bajos niveles aparezca picazón e irritación. La exposición a valores muy altos puede afectar el sistema nervioso central provocando espasmos y rigidez muscular.
Fusilade (Syngenta, Zeneca Mexicana)	Fluasifop- p-butil: butil-2-(4- [[[(5-trifluo- rometil)-2- piridinil]ox i] fenoxi) propanoato	IV	2 Persiste de 4 a 26 semanas; es degradable y en las plantas se acumula.	Causa irritación en la piel expuesta, dolor de cabeza, vómito y debilidad muscular. No hay antídoto específico.
Sanson (Syngenta, Zeneca Mexicana)	Nicosulfu- ron: 2-(4,6-di- metoxypiri- midin-2- ilcarbomoil -sulfamoil)- N,N-dime- tilnicotina- mida	IV	2 Persiste hasta 5 semanas; es biodegradable.	Al ser inhalado puede irritar el tracto respiratorio, ligeramente irritante si cae sobre la piel provocando dermatitis y en los ojos conjuntivitis. La exposición prolongada puede ocasionar irritación en los ojos, molestias, lagrimeo o visión borrosa.
Hierbami- na (Syngenta), Esterón (Dow Agroskien- ces de México)	2, 4 – D: Acido (2,4- diclorofeno xi) acético	III	1 Poco persistente; se biodegrada en meses, baja bioconcentra- ción	Provoca mareos, náusea, vómito, depresión del sistema nervioso central, daño en hígado, dermatitis, debilidad y falla renal. En ojos puede causar quemaduras ligeras, en la piel irritación o quemaduras moderadas.
Tamarón 600 (Bayer de Mexico)	Metamido- fos: O,S-dimetil fósforoami dotioato	II Productos de degradación son menos tóxicos.	1 Vida media hasta de 12 días en suelo y en agua hasta de 300; bajo potencial de bioconcentra- ción.	Produce contracción de las pupilas, vista nublada, mareos, náuseas, diarrea, convulsiones, aumento de secreciones nasales, bronquiales, jadeo, disnea. calambres, vómitos, diarrea, micción, pérdida del equilibrio y del conocimiento, tóxico al contacto con la piel e irritante para los ojos.

<p>Malation (Agroquímicos Versa, Tridente y Rivas; Agricultura Nacional, Agrevo Mexicana, Mezclas y Fertilizantes .</p>	<p>Malatión: O,O-dimetil fosforotioato de dietil mercapto succinato o dietil mercapto-s-éster con O,O dimetil fosforoditioato</p>	<p>IV</p>	<p>1 Persiste hasta una semana, en sistemas terrestres hasta un mes; no se bioconcentra, la mayor parte en animales es metabolizado y eliminado casi por completo en 24 horas.</p>	<p>Se absorben por la piel, pueden ser inhalados o ingeridos. Síntomas de intoxicación: dolor de cabeza, visión borrosa, náuseas, vómito, mareos, diarrea, opresión torácica, tos, dolor abdominal, ansiedad, temblores de lengua y párpados, escalofríos, hiperirritabilidad, hipersensibilidad, contracción de la pupila, salivación, lagrimeo, descarga acuosa nasal, debilidad severa, micción y defecación involuntarias, ambliopia, sudoración profusa, calambres, sensación de asfixia, temblores, pérdida del equilibrio, convulsiones, cianosis, pérdida del equilibrio, bloques cardíacos, paro respiratorio, coma y muerte.</p>
<p>Paratión metílico (Agroquímicos Versa, Química Lucava, Agroquímicos Rivas)</p>	<p>Paratión metílico: O;O dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato</p>	<p>I</p>	<p>1. Persiste de días a meses; es biodegradable, de baja bioconcentración. Los residuos en las plantas desaparecen a los 7 días.</p>	<p>Altera sistema nervioso central provocando dolor de cabeza, fatiga, contracción de las pupilas, sensación de falta de aire, ansiedad, mareo, náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, pulso lento, sudoración, visión borrosa o disminución de la agudeza visual, calambres musculares, dificultad respiratoria, convulsiones, edema pulmonar, pérdida del conocimiento, coma, muerte o lesión cerebral.</p>
<p>Karate (Syngenta, Zeneca Mexicana)</p>	<p>Lambda cyalotrina: α-cyano-3-fenoxiben-cil 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil-1 ciclopropano carboxilato 1:1 de los isómeros (2)-(1R,3 R)-S-éster y (2), (1S-3S)-R-éster)</p>	<p>II Es hasta 200 veces más activo que otros compuestos piretroides</p>	<p>2 Persistencia de hasta 12 semanas; es degradado por peces y otros organismos acuáticos. Vida media en plantas de 40 días.</p>	<p>Bloquea la transmisión del impulso nervioso. Causa reacciones de alergia, dolor de cabeza, náuseas, vómito y colapso. No hay antídoto específico.</p>

<p>Cipermetri-na (Agricultura Nacional, Agroquímicos Rivas, Grozan de México, Química Lucava, Versimex), Baygon</p>	<p>Cipermetrina: (1-RS)-cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS) alfa ciano-3-fenoxibencilo</p>	<p>III Sus metabolitos presentan baja toxicidad.</p>	<p>1 Persiste de 1 a 4 semanas y se biodegrada de 4 a 8; potencial de bioconcentración de moderado a alto. Las plantas al metabolizarlo generan productos intermediarios que se unen a los glucósidos.</p>	<p>Genera más bien efectos agudos; no hay evidencias de daños acumulativos por la exposición a largo plazo. Produce nerviosismo, ansiedad, convulsiones, alergia en la piel, estornudos, rigidez de nariz, sensación de hormigueo en la región periorbital o en todo el cuerpo, ataxia y debilidad de los miembros, diarrea, contracciones musculares, náuseas, vómito, dolor de cabeza, sudoración. No hay antídoto específico.</p>
<p>Furadán (FMC Agroquímica de México).</p>	<p>Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato</p>	<p>II</p>	<p>2 Persistencia máxima en suelos de 3 meses; poca bioacumulación.</p>	<p>Inhibidor reversible de la colinesterasa. Muy irritante para piel, ojos y vías respiratorias. En algunos casos se pueden presentar náuseas, vómito, debilidad, calambres, dolor de cabeza, dilatación de pupila, convulsiones y paro respiratorio. Se han observado reacciones alérgicas y efectos sobre las hormonas. Se cree que producen cáncer o afectan el material genético.</p>
<p>Lannate (DuPont)</p>	<p>Metomilo: S-metil-N-((metilcarbamoil)oxi)tiocetimidato</p>	<p>II</p>	<p>3 Moderadamente persistente, de 27 a 52 semanas; es biodegradado por microorganismos y en peces no se bioconcentra. Vida media en plantas es de 3 a 5 días.</p>	<p>Sus efectos están asociados con la actividad de la enzima acetilcolinesterasa los cuales incluyen: debilidad, visión borrosa, dolor de cabeza, náuseas, cólicos, molestias en el pecho, contracción de las pupilas, sudoración, pulso lento, temblores musculares.</p>
<p>Tecto 60 (Syngenta, Novartis Agro)</p>	<p>Tiabendazol: 2-(4-tiazolil)-benzimidazol.</p>	<p>III</p>	<p>4 Altamente persistente, de 1 a 20 años.</p>	<p>Por ingestión o inhalación, se presentan efectos colaterales gastrointestinales, ocasionales transitoriamente náuseas, vómito, debilidad, somnolencia, vértigo y dolor de cabeza.</p>