



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Facultat de Ciències  
Departament de Genètica i de Microbiologia  
Grup de Mutagènesi**

**BIOMONITORIZACIÓN CITOGENÉTICA  
DE CUATRO POBLACIONES AGRÍCOLAS EUROPEAS,  
EXPUESTAS A PLAGUICIDAS,  
MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Susana Pastor Benito**

**2002**

# BIOMONITORIZACIÓN CITOGENÉTICA DE CUATRO POBLACIONES AGRÍCOLAS EUROPEAS, EXPUESTAS A PLAGUICIDAS, MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

Memoria presentada por Susana Pastor Benito,  
para optar al grado de DOCTORA en  
BIOLOGÍA.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès),  
Octubre de 2002.

Susana Pastor Benito

Vº Bº  
Los directores de la Tesis

Dr. Amadeu Creus Capdevila  
Profesor Titular de Genética  
UAB

Dr. Ricard Marcos Dauder  
Catedrático de Genética  
UAB

*Jamás se descubriría nada si nos  
considerásemos satisfechos con las cosas  
descubiertas.*

*Séneca*

## *Agradecimientos*

*La elaboración de una Tesis es un proceso arduo, que requiere mucho tiempo y esfuerzo, no sólo de quien la realiza sino de la gente que le rodea. Es por esto y mucho más que quiero hacer un especial agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante estos años y gracias a las cuales este trabajo ha sido posible.*

*Mi agradecimiento a los directores de esta Tesis por la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, por su dedicación y su apoyo.*

*Mi agradecimiento a todos los profesionales que han colaborado y participado en la elaboración de los artículos, parte básica de esta Tesis.*

*Agradecer también, la colaboración de todos los profesores del Grup de Mutagènesi como del resto de miembros del Departament de Genètica i de Microbiologia.*

*Miles de gracias a mis compañeras/os de laboratorio: Glòria, Anna, Mariajo, Silvia, Mérida, Jorge, Eli, Laura, Elsa, MJ, Emma, Mostapha, Leiliane, Valeria, Elk, Lourdes, Teresa, Alba, Aida, Feli, Leila, Marià, Sara, Giselle, Cristina, Marta, Sílvia C., Sanaà, ... y a todos aquellos con quienes algún día compartí espacio y buenos ratos. A todos vosotras/os gracias por vuestra amistad, por vuestro apoyo incondicional, por conseguir que los momentos más difíciles se hicieran amenos y divertidos, por enseñarme culturas, costumbres y recetas diferentes, otra vez más, gracias.*

*Y mi familia, que puedo decir de ella, después de todo es gracias a vosotros que estoy aquí. Gracias a mis padres y a mi hermano por soportar mi mal humor después de un mal día de trabajo, por apoyarme todos estos años y por darme todo a cambio de nada. Y al Thor, porque es un encanto. Gracias Ferran por hacerme sonreír y por estar a mi lado.*

*Parte de este trabajo se ha realizado gracias a la beca pre-doctoral de formación de investigadores propia de departamento, otorgada por el Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.*

*A mis padres*

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	i
Prólogo .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PLAGUICIDAS, UNA GRAN FAMILIA</b>	
1.1.1. TERMINOLOGÍA.....	3
1.1.2. ¿QUÉ PODEMOS CONSIDERAR PLAGUICIDA? .....	4
1.1.3. ANTECEDENTES .....	5
1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS .....	8
1.1.5. MOVIMIENTO DE LOS PLAGUICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE .....	15
1.1.6. METABOLISMO Y DEGRADACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS .....	16
<b>1.2. EFECTOS ADVERSOS DE LOS PLAGUICIDAS</b>	
1.2.1. RESISTENCIA .....	20
1.2.2. BIOMAGNIFICACIÓN .....	21
1.2.3. SALUD AMBIENTAL.....	21
1.2.3.1. Problemática ecológica: disruptores endocrinos.....	22
1.2.4. EFECTOS DIRECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA .....	23
1.2.4.1. Intoxicaciones.....	24
1.2.4.2. Mortalidad ocupacional agrícola.....	25
1.2.4.3. Alimentos.....	25
1.2.4.4. Efectos inmunológicos.....	27
1.2.4.5. Efectos neurotóxicos .....	27
1.2.4.6. Efectos endocrinos.....	28
1.2.4.7. Toxicidad reproductiva .....	28
1.2.4.8. Carcinogénesis .....	29
1.2.4.9. Efectos genéticos .....	30
<b>1.3. TOXICOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
1.3.1. DEFINICIÓN DE TOXICIDAD.....	31
1.3.2. TOXICIDAD AGUDA Y TOXICIDAD CRÓNICA .....	32
1.3.3. ÍNDICES DE TOXICIDAD .....	33
1.3.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOXICIDAD .....	35
1.3.5. TOXICOLOGÍA GENÉTICA .....	39
1.3.5.1. Los inicios de la toxicología genética.....	39
<b>1.4. PROCESO DE EVALUACIÓN DEL RIESGO GENÉTICO .....</b>	<b>40</b>
1.4.1. INDICADORES DE RIESGO GENÉTICO .....	46
1.4.2. BIOMONITORIZACIÓN DE POBLACIONES HUMANAS EXPUESTAS A AGENTES GENOTÓXICOS .....	47

1.5. BIOMARCADORES COMO INDICADORES DE RIESGO GENÉTICO .....	48
1.5.1. ALTERACIONES CITOGENÉTICAS COMO BIOMARCADORES DE EFECTO .....	52
1.5.1.1. El ensayo de micronúcleos: aspectos generales .....	52
1.5.1.1.1. Origen y desarrollo del ensayo de MN .....	55
1.5.1.1.2. MN en linfocitos de sangre periférica .....	56
1.5.1.1.3. MN en células epiteliales de la mucosa bucal.....	58
 2. OBJETIVOS.....	 61
 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 63
3.1. SELECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS .....	63
3.2. ENCUESTA.....	64
3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	65
3.3.1. CULTIVOS DE LINFOCITOS Y ANÁLISIS DE MN.....	65
3.3.1.1. CBPI -índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis-.....	66
3.3.1.2. ANÁLISIS DE MN EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL ..	66
3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	67
3.5. ANÁLISIS DE LOS GENOTIPOS.....	68
3.6. ESTUDIO LONGITUDINAL: análisis citogenéticos, bioquímicos y hematológicos de la población almeriense.....	69

## 4. ARTÍCULOS

### **Artículo 1:**

*Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells.*

Mutation Research, 464 (2000) 255-262 ..... 71

### **Artículo2:**

*Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides.*

Mutation Research, 495 (2001) 147-156 ..... 79

### **Artículo 3:**

*Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells.*

Mutagenesis, 16 (2001) 539-545 ..... 89

### **Artículo 4:**

*Occupational Exposure to Pesticides and Cytogenetic Damage: Results of a Hungarian Population Study Using the Micronucleus Assay in Lymphocytes and Buccal Cells.*

Environmental and Molecular Mutagenesis, 40 (2002) 101-109 ..... 97

**Artículo 5:**

*Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: Use of micronuclei as biomarkers.*

Mutagenesis (en prensa) ..... 107

**Artículo 6:**

*A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides.*

Mutagenesis, 17 (2002) 79-82 ..... 131

**5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 135****5.1. EVALUACIÓN CITOGÉNICA DE LOS AGRICULTORES EXPUESTOS A PLAGUICIDAS vs LOS CONTROLES**

5.1.1. BNMN EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA ..... 138

5.1.2. MN EN CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DE LA MUCOSA BUCAL ..... 143

5.1.3. COMENTARIO GENERAL SOBRE LA EVALUACIÓN CITOGÉNICA..... 145

5.2. DAÑO CITOTÓXICO Y EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ..... 148

5.3. FACTORES DE CONFUSIÓN..... 150

5.3.1. EDAD ..... 150

5.3.2. PAÍS-SEXO ..... 152

5.3.3. HOMBRE-MUJER..... 153

5.3.4. TABACO ..... 155

5.3.5. ALCOHOL..... 157

5.3.6. DIETA ..... 158

5.3.7. RAYOS X..... 160

5.3.8. ABORTOS ESPONTÁNEOS ..... 160

5.4. GSTs COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL..... 161

5.5. ESTUDIO LONGITUDINAL..... 163

**6. CONCLUSIONES..... 165****7. BIBLIOGRAFÍA ..... 167**

ANEXO 1 ..... 197

ANEXO 2 ..... 211

## ABREVIATURAS

♂, hombre

♀, mujer

2,4,5-T, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACGIH, *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

AchE, acetilcolin esterasa

ADI, ingesta diaria aceptada

ALT, alanino aminotransferasa

AST, aspartato aminotransferasa

ATP, adenosín trifosfato

BEI, índice biológico de exposición

BNMN, linfocitos binucleados con micronúcleos

CA, aberraciones cromosómicas

CBMN, células bucales con micronúcleo

CBPI, índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis

CL<sub>50</sub>, concentración letal media

cr., cromosoma

cyt-B, citocalasina-B

DBCP, 1,2-dibromo-3-cloropropano

DDD, diclorodifenil dicloroetano

DDE, diclorodifenil dicloroetileno

DDT, 1,1,1, tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano o p,p'-diclorodifenil tricloroetano

DL<sub>50</sub>, dosis letal media

DNA, ácido desoxirribonucleico

DNOC, dinitro-orto-cresol

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

EE, error estándar

EEUU, Estados Unidos

EPA, Agencia de Protección Ambiental (EEUU)

F8, hemofilia A

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

GGT, glucoronil glucotransferasa

gl, grados de libertad

GLZ, modelo lineal generalizado

*gpa*, glicoforina A

GSH, grupo glutatión reducido

GSTs, glutatión S-transferasas

GSTM1, glutatión S-transferasa M1

GSTT1, glutatión S-transferasa M1

HCB, hexaclorobenzeno

HCH, hexaclorohehexano

HDL, lipoproteínas de alta densidad

hprt, hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa

IARC, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

LDL, lipoproteínas de baja densidad

LOAEL, nivel mínimo de efectos adversos observados

LSP, linfocitos de sangre periférica

MCPA, 4-ácido cloro-2-metilfenoxiacético

MN, micronúcleo

MNCB, número total de MN en células bucales

MNL, número total de MN en linfocitos

m.o., microscópio óptico

*N*, media

ng, nanogramos

NOAEL, nivel máximo sin efectos adversos detectados

OCs, organoclorados

OFM, oxidasas de función mixta

OPs, organofosforados

p. ej., por ejemplo

pb, pares de bases

PCBs, bifenilos policlorados

PCP, pentaclorofenol

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

*pkr*, anemia hemolítica

*PON*, paraoxonasas

RX, rayos X

SCE, intercambios entre cromátidas hermanas

SCGE, electroforesis en gel de células individualizadas (ensayo del cometa)

rpm, revoluciones por minuto

TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TLV, valores límites umbral

TLV-C, valores techo

TLV-STEL, límites de exposición para periodos cortos de tiempo (15 minutos)

TLV-TWA, medidas ponderadas en el tiempo, exposición media durante 8 h

UAB, Universitat Autònoma de Barcelona

UV, ultravioleta

## PRÓLOGO

### ¿Por qué este estudio?

El interés por conocer los efectos que los plaguicidas tienen sobre la salud, sobre todo en aquellas poblaciones más directamente expuestas, llevó a la comisión científica de la Unión Europea a conceder un proyecto (INCO-COPERNICUS CT96-0300) al consorcio liderado por el Dr. Stylianos Piperakis (Centro Nacional para la Investigación Científica, Instituto Demokritos, Atenas, Grecia) para desarrollar un trabajo de investigación que llevaba por título "*Effects of pesticides on humans*" y cuyo énfasis radicaba en evaluar el riesgo genético asociado a su uso y exposición laboral. En este consorcio figuraban, además, los grupos dirigidos por la Dra. Antonina Cebulska-Wasilewska (Departamento de Radiación y Biología Ambiental, Cracovia, Polonia), por el Dr. Csaba Siffel (Departamento de Genética Humana y Teratología, Budapest, Hungría) y por el Dr. Ricard Marcos (Grupo de Mutagénesis, Departamento de Genética y de Microbiología, UAB, Barcelona, España).

El planteamiento inicial consistía en llevar a cabo un estudio citogenético completo, utilizando cuatro biomarcadores diferentes, en cuatro poblaciones de diferentes países europeos (Grecia, España, Polonia y Hungría). Los colectivos estudiados fueron agricultores en contacto directo y continuo con plaguicidas.

A cada uno de los respectivos laboratorios se le encomendó el análisis de un biomarcador, de acuerdo con su experiencia y capacidad. Así, el grupo griego bajo la coordinación del Dr. S. Piperakis, junto con los investigadores polacos, dirigidos por la Dra. A. Cebulska-Wasilewska, se encargaron de analizar el daño genético mediante el ensayo del cometa; los húngaros, liderados por el Dr. C. Siffel, estudiaron las aberraciones cromosómicas (CA) y los intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y, finalmente, el grupo de Mutagénesis de la UAB, coordinado por el Dr. R. Marcos, se encargó del análisis completo de los micronúcleos (MN).

El Grupo de Mutagénesis tiene una larga experiencia en estudios de biomonitorización. Así, desde 1989, en que se empezó a evaluar los efectos citogenéticos de los plaguicidas con grupos de trabajadores agrícolas (Carbonell y col.), se han realizado numerosos estudios (Carbonell y col., 1993; Gutiérrez y col., 1995; Pitarque y col., 1996). Asimismo, el grupo presenta una larga trayectoria en la utilización y evaluación del ensayo de MN, tanto *in vitro* (Puig y col., 1989; Surrallés y col., 1990,1995a) como *in vivo* (Gutiérrez y col., 1995; Pitarque y col.,1996; Ramírez y col., 1997a).

Debido a que mi incorporación al Grupo de Mutagénesis coincidió con la concesión del proyecto, me vi involucrada en el desarrollo del mismo desde sus inicios.

Los resultados obtenidos relativos al ensayo de MN se han ido publicando en una serie de artículos, que están incluidos en esta memoria.

La evaluación global de todos los resultados con los cuatro biomarcadores seleccionados todavía no se ha terminado y esperamos que, al analizarlos conjuntamente, podamos llegar a alguna conclusión más definitiva sobre el riesgo de la exposición laboral a los plaguicidas.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

# 1. INTRODUCCIÓN

Todo empezó en la prehistoria, hace unos 12.000 años, con la domesticación de las primeras especies vegetales y animales. El hombre se hizo agricultor para garantizarse la obtención regular de alimentos y, sin duda alguna, ya desde las primeras prácticas agrícolas los primeros agricultores conocieron, sufrieron, lucharon y superaron a los terribles adversarios naturales que atacaban sus cultivos, **las plagas**. Esta batalla se inició con la primera siembra, y sigue hasta nuestros días.

El hombre depende de los frutos de la tierra para su supervivencia, y esa necesidad desemboca en una incesante lucha para proteger lo básico y necesario, la tierra y sus productos. La protección de los cultivos es inherente a la propia agricultura. Esta nos tiene que proporcionar alimentos y otros productos de uso comercial e industrial en cantidad y calidad adecuadas y, además, el agricultor ha de poder tener un beneficio económico. Estos objetivos no se podrían lograr sin una continua protección de los cultivos dentro de la cual, el empleo de productos fitosanitarios, basados sobre todo en los productos químicos, constituye la parte más importante.

No se debe olvidar que, antes de la revolución industrial, la actividad agrícola ha sido el centro de la economía durante miles de años. Pero su importancia no decae ni con la aparición de la actividad industrial, ni con la era digital. Después de todo, se trata de producir alimentos, y sin alimentos no hay vida.

Debido a la gran cantidad y variedad de plaguicidas que se utilizan en la actualidad para proteger las cosechas, existe mucha controversia sobre los posibles efectos negativos o perjudiciales de estos productos en relación con sus beneficios. Si bien se han citado efectos adversos para la salud humana, el medio ambiente y el resto de animales, debido generalmente a su uso incorrecto e inapropiado, también existen claras evidencias de sus beneficios.

Según datos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, Junio 2002. Informe de la cumbre mundial sobre la alimentación), alrededor de 800 millones de personas padecen hambre crónica en el mundo (aproximadamente un 15% de la población mundial). Este número se ha reducido entre 40 y 100 millones desde principios de los años 90, en los países en vías de desarrollo y más desarrollados, respectivamente. Aunque también existen países menos favorecidos en los que el número de personas

hambrientas ha aumentado drásticamente. A este ritmo (según la FAO), más de 600 millones de personas en los países en vías de desarrollo todavía pasarán hambre en el 2015.

En la falta de alimentos intervienen muchos factores ajenos a la agricultura (política, guerras, desastres naturales), aunque también muchas de las pérdidas de cultivos se deben a las diversas plagas que contaminan, envenenan y destruyen las cosechas y el ganado. Se pueden citar diversos ejemplos de destrucción masiva de cultivos, como el que tuvo lugar en Irlanda entre 1845 y 1850, debido al hongo “tizón de la patata”, que provocó la pérdida general de las cosechas de patata, producto que constituía el alimento básico de la población, dando como resultado una epidemia de hambre que provocó la muerte de más de un millón de personas y obligó a emigrar a otras tantas. O las langostas del desierto, presentes actualmente en 25 países y que pueden acabar con la vegetación de amplias zonas en pocas horas, como sucedió en los brotes ocurridos entre 1987 y 1989 y que acabaron con pérdidas arrasadoras condenando al hambre a miles de personas; el gigantesco enjambre (una parte pequeña de la nube puede albergar alrededor de una tonelada de langostas) es capaz de consumir en un día la misma cantidad de alimento que 2500 personas. Quizás no hubiera ocurrido lo mismo si se hubiese dispuesto de los plaguicidas adecuados para cada ocasión.

Otro ejemplo de la necesidad de los productos plaguicidas viene representado por la lucha contra la malaria. Actualmente unos 300 millones de personas sufren malaria cada año y el parásito portado por el mosquito anofeles, mata a más de dos millones de africanos cada año. Esta enfermedad fué erradicada en los países desarrollados, y disminuyó en un elevado porcentaje su incidencia en el resto de países hace medio siglo, en gran parte debido al uso del insecticida DDT (p,p'-diclorofenil tricloroetano). Actualmente, debido al elevado riesgo ecológico que este producto supone, ha sido prohibido comportando una reaparición a un ritmo acelerado del número de casos de malaria. Hoy por hoy, las alternativas no son tan efectivas, y las ayudas insuficientes.

Igualmente no hay que olvidar el uso de plaguicidas en la protección frente a vectores en los animales de granja. Los costes económicos por las pérdidas debidas a una infestación por garrapatas en 1998 en el ganado vacuno en las granjas de Queensland (Reino Unido) superaron los 4 millones de dólares por año (Jonsson y col., 2001).

Existen más de 80.000 especies de plantas comestibles, y en la historia humana solamente se han utilizado unas 10.000. Hoy en día se cultivan sólo 150 y doce de ellas proporcionan más del 80 por ciento de los alimentos de consumo humano. Sólo nueve cultivos -trigo, arroz, maíz, cebada, sorgo, patata, batata, caña de azúcar y soja- aportan más del 75 por ciento de la energía dietética derivada de las plantas. Esto supone un elevado

riesgo, que ha sido advertido en diversas ocasiones por la FAO, ya que las técnicas agrícolas de monocultivo (amplias superficies con una única variedad de alto rendimiento) favorecen la uniformidad genética, con el consiguiente riesgo de catástrofe, ya que la cosecha queda expuesta a los ataques de las plagas y enfermedades.

Otro dato a tener en cuenta es el crecimiento demográfico, que en el último medio siglo ha sido espectacular; de unos 2.500 millones de personas en 1950 se ha pasado a unos 6.300 millones en la actualidad. Sin la utilización de productos para proteger los cultivos, este ritmo no hubiera sido el mismo. Las previsiones indican que la población va a seguir aumentando en los próximos años y que la malnutrición tiende a reducirse, ¿Cómo prescindir entonces de la lucha química a gran escala contra las posibles plagas?

Se están estudiando otras alternativas menos perjudiciales, pero de momento más costosas. La legislación está teniendo un papel muy importante en el mantenimiento de un cierto equilibrio entre el beneficio y el posible riesgo generado por el uso de los plaguicidas pero, a la vista de todo lo expuesto anteriormente, se seguirán utilizando plaguicidas durante mucho, mucho tiempo.

## **1.1. Plaguicidas, una gran familia**

### **1.1.1. Terminología**

La primera pregunta que nos debemos formular es la siguiente: ¿Es lo mismo un plaguicida que un pesticida? La respuesta es sí, actualmente los dos vocablos están aceptados por la Real Academia de la Lengua Española como sinónimos. La evolución semántica del término ha pasado por diferentes etapas. Desde el nombre inicial de pesticida (aniquilador de “pestes”), cuya mejor traducción es el término plaguicida; pasando por el término “fitosanitario”, “compuesto químico agrícola” o “agroquímico” hasta el más actual de “producto que protege la cosecha”. Los últimos términos han sido promovidos generalmente por la industria química productora, que enfoca el cambio de terminología como una aproximación más amistosa al medio ambiente.

En el presente trabajo se utilizará el término plaguicida, por considerar que es el que mejor se ajusta a la definición.

### 1.1.2. ¿Qué podemos considerar plaguicida?

Se puede definir como aquella sustancia, mezcla de sustancias, o ingredientes activos, cuyo propósito es prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, ya sea debida a insectos, roedores, nemátodos, hongos, algas u otras formas de plantas terrestres o acuáticas, animales, bacterias o virus; además, cabe incluir también, los productos que favorecen o regulan la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la corrección de suelos.

A veces, de manera incorrecta, el término plaguicida se utiliza para referirse únicamente a insecticidas, sin tener en cuenta que también incluye a los herbicidas, fungicidas, molusquicidas y otras sustancias para el control de plagas.

No se consideran plaguicidas los fármacos utilizados para el control de enfermedades animales o humanas; los fertilizantes, nutrientes u otras sustancias utilizadas para promover la supervivencia y la salud de las plantas, excluyendo los reguladores del crecimiento; los agentes de control biológico, exceptuando algunos microorganismos; y los productos con ingredientes de bajo riesgo, como el aceite de menta o ajo.

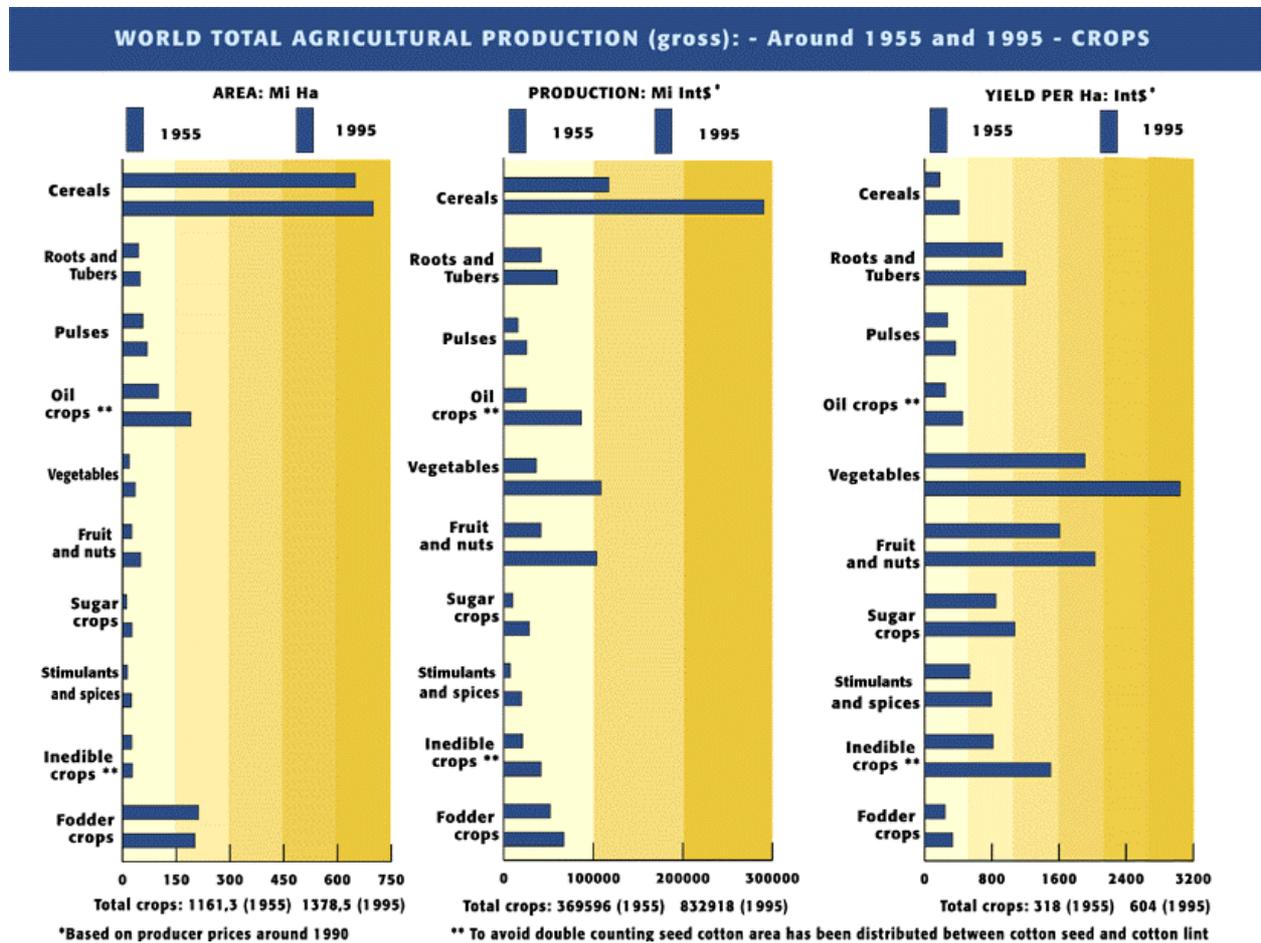
Los plaguicidas no quedan restringidos exclusivamente a un uso agrícola o industrial, sino que también son importantes en sanidad, en la lucha contra los vectores de enfermedades transmisibles y para combatir las especies que interfieren en cualquier forma de producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y derivados, entre otros. Sin ir mas lejos, muchos productos cotidianos del hogar son plaguicidas: aerosoles y polvos para cucarachas y hormigas, repelentes de insectos de uso personal, rodenticidas, matamoscas, collares antiparasitarios, detergentes desinfectantes del baño, ropa y cocina, productos para saneamiento de piscinas, etc. También se incluyen en la fabricación de pinturas, cosméticos, pegamentos y productos textiles, entre otros.

### 1.1.3. Antecedentes

La primera constancia escrita que se tiene sobre el uso de plaguicidas, se remonta hacia el 1550 a.C., y se refiere a una serie de preparaciones para repeler las moscas del interior de las viviendas (en Hayes y col., 1991 p. 20). Homero, en la Odisea, ya hace mención de la utilización del sulfuro para fumigar. En el s. XVI, los chinos utilizaban cantidades moderadas de arsénico como insecticida y poco después se utilizaba la nicotina del tabaco con el mismo fin. Hacia 1800, con la aparición de los primeros jardines botánicos con flores exóticas, no adaptadas y fácilmente atacadas por plagas, se vuelve a utilizar el azufre como fungicida. A finales del s. XIX y principios del s. XX, la escasez de alimentos en suelos europeos lleva a una serie de descubrimientos científicos y tecnológicos. Los plaguicidas se empiezan a desarrollar en esta época, al combinar diferentes productos para combatir las plagas. Así, en 1882 se hizo famoso el caldo bordelés, mezcla de sustancias con la que los agricultores de la región de Burdeos (Francia) rociaban las viñas afectadas por el mildiu de la viña (*Plasmopara viticola*), para evitar su recolección. Resultó que las viñas no infectadas tratadas con este caldo no eran atacadas, descubriéndose así la acción protectora del caldo bordelés, debida fundamentalmente a la acción del cobre. En 1901 se descubre el *Bacillus thuringiensis*, que se comercializaría en 1938 por su actividad insecticida. Pero el periodo de mayor expansión se produjo durante los años 40 y se debió al gran número de productos químicos que se desarrollaron para la protección de los cultivos. Así en 1942, durante la Segunda Guerra Mundial, en Suiza, el investigador Paul Hermann Muller (galardonado con el premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1948), descubrió las propiedades insecticidas de un compuesto orgánico sintético, el famoso organoclorado DDT (p,p'-diclorodifenil tricloroetano), sintetizado por primera vez en 1874. A la vez, en Alemania se empezaron a fabricar insecticidas organofosforados. En 1945, investigadores ingleses descubrieron los carbamatos, mientras que las investigaciones en organoclorados conducían a la obtención de nuevos productos. A partir de 1950, hay un crecimiento exponencial en el uso de insecticidas, herbicidas y fungicidas (Hayes y col., 1991), incrementándose los campos de cultivos y las cosechas, así como las variedades. En la figura 1, se pueden apreciar que la producción aumentó de manera espectacular, sin apenas aumentar la superficie cultivada.

Sin embargo, durante los años 60 empezó a notarse el efecto negativo que tenía el uso de plaguicidas. Empezaron a observarse efectos sobre la salud humana, sobre los animales y

sobre el medio ambiente, apareciendo las primeras plagas resistentes a los plaguicidas, lo que provocó restringir y legislar el uso de estos productos.



**Figura 1.** Producción agrícola mundial, entre 1955 y 1995. [Datos de: *FAO statistics division. 50 years of agricultural statistics by FAO 1950-1999*].

En 1962, la publicación del libro de Rachel Carson "La primavera silenciosa", evidenció la persistencia en la cadena alimentaria de los plaguicidas organoclorados y los graves efectos ecológicos que estaban provocando en los EEUU, unido al conocimiento de su toxicidad reproductiva en algunas especies animales (especialmente aves), atrajo la atención pública sobre estos compuestos, hasta entonces considerados inocuos. Se supo que algunas especies animales habían acumulado grandes cantidades de DDT y derivados, y que presentaban graves alteraciones reproductivas. Esto condujo a la prohibición del DDT en

EEUU en 1972, y a la creación de la agencia de protección ambiental (EPA). A partir de ese momento, se empezó a legislar el uso de plaguicidas y aparecieron los primeros reglamentos.

Desde entonces se han ido introduciendo numerosos productos en el mercado. Los nuevos grupos de plaguicidas sintéticos menos estables, como los piretroides, sintetizados a partir de modelos de sustancias naturales e introducidos en el mercado a partir de los años 70, presentan un menor impacto ambiental. En la década de los 90, comenzó una nueva etapa contra la lucha de las plagas creando plantas resistentes que no necesitan la aplicación de sustancias químicas. Las primeras pruebas con estas plantas transgénicas fueron con la planta del algodón a la que se le habían introducido genes tóxicos de *Bacillus thuringiensis*, produciendo la proteína tóxica para determinados insectos. Desde entonces, ha habido un incremento sustancial de cultivos mejorados genéticamente. En 1996, a escala mundial (excluida China) se cultivaron 1,7 millones de hectáreas con plantas genéticamente modificadas; en 1997 fueron ya 11 millones, pasando a 27,8 millones hectáreas en 1998.

Referente a la legislación, desde los años 70 los gobiernos se centraron principalmente en la elaboración de instrumentos para evaluar los riesgos y determinar la seguridad de los productos químicos. No fue hasta 1992, en que se reunieron en Río de Janeiro y aprobaron el Programa 21, que incluye un capítulo relativo a la gestión ecológica racional de los productos químicos tóxicos. En 1994 se establece el Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química, que desde entonces ha proporcionado orientaciones políticas y estratégicas para la evaluación de riesgos y la clasificación de los productos químicos, la reducción de riesgos, la gestión de residuos, etc.

En junio de 1998 más de 100 gobiernos se reunieron en Montreal para reducir las emisiones de contaminantes orgánicos persistentes (DDT y PCB-bifenilos policlorados), constituyéndose la primera reunión del comité intergubernamental de negociación sobre contaminantes orgánicos persistentes. Desde entonces han sido numerosas las reuniones entre diferentes países en la preocupación por los efectos perjudiciales de los plaguicidas, tanto sobre la salud como sobre el medio ambiente y poco a poco se han ido prohibiendo aquellos considerados más peligrosos.

### 1.1.4. Clasificación de los plaguicidas

Hablar de una clasificación de los plaguicidas actuales es bastante complicado debido a que son un grupo de compuestos muy heterogéneo. Hoy en día se cuenta con aproximadamente seiscientos ingredientes activos de los plaguicidas sintéticos, que se combinan entre sí y con los llamados ingredientes inertes para dar una amplia oferta de mezclas comerciales con muy diferentes usos y aplicaciones. (Informe agricultura y salud, Nicolás Olea. 29/4/01 [ww.aldealrural.com/alpujarra/\\_disc1/0000000a.htm](http://www.aldealrural.com/alpujarra/_disc1/0000000a.htm)).

Actualmente en el mercado europeo existen 834 sustancias activas contra diferentes plagas, 90 de las cuales son las sustancias más utilizadas, seguidas de 149 organofosforados y carbamatos no incluidos en la primera lista; 402 sustancias consideradas plaguicidas, menos utilizadas que las anteriores y 193 sustancias de bajo interés (microbiales, rodenticidas, etc...) algunas de las cuales podrían salir del mercado después de la revisión de sustancias que se está llevando a cabo por la comisión europea y se prevee esté terminada hacia mitad del año 2003 (*Report from the Commission to the European Parliament and the Council, 2001. Evaluation of the active substances of plant, SANCO 822/2001rev.3*).

Los plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos. Según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- a) Plaguicidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal y control de vegetales.
- b) Plaguicidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- c) Plaguicidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la alimentación.
- d) Plaguicidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- e) Plaguicidas de uso en higiene personal: preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
- f) Plaguicidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para ser aplicado, por personas no especialmente cualificadas, en viviendas o locales habitados.

Las formulaciones o preparados pueden clasificarse según el estado de presentación o sistema utilizado en su aplicación, características que determinan en buena medida la facilidad

de penetración en el organismo del individuo expuesto. Según este criterio se pueden considerar los grupos:

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| 1. Gases o gases licuados                  | 4. Líquidos                          |
| 2. Fumigantes y aerosoles                  | 5. Cebos y tabletas                  |
| 3. Polvos con diámetro inferior a 50 $\mu$ | 6. Sólidos, excepto cebos y tabletas |

Desde el punto de vista de su constitución química, los plaguicidas se pueden clasificar en diversos grupos, siendo los más importantes:

Arsenicales	Derivados de urea	Organofosforados	Tiocarbamatos
Carbamatos	Dinitrocompuestos	Organometálicos	Triazinas
Derivados de cumarina	Organoclorados	Piretroides	

Algunos de estos grupos engloban varias estructuras diferenciadas por lo que se pueden subdividir.

Si dividimos a los plaguicidas según la acción específica del producto, obtenemos la clasificación que se detalla a continuación. Se debe tener en cuenta que hay diversos subgrupos dentro de cada grupo y que aquí solamente se citan algunos de los productos activos más conocidos. No es extraño encontrar que el mismo producto esté en diversos grupos, pues algunos tienen un amplio espectro de acción.

**Acaricidas**, utilizados para matar ácaros que se alimentan de plantas o animales. En general los acaricidas son parecidos a los insecticidas, aunque como grupo son menos tóxicos. Se pueden clasificar en:

- Antibióticos: abamectina, ivermectina.
- Compuestos con azufre: aramite, tedión.
- Carbamatos: aldicarb, benomilo.
- Derivados nitrogenados: amitraz (presente en collares antigarratapas de perros y gatos).
- Dinitrofenoles: dinocap, DNOC.
- Organoclorados (análogos del DDT): endosulfan, lindano.
- Organofosforados: clorpirifos, diazinon, diclorvos, malation, metamidofos, paration.
- Piretroides: acrinatrín, cipermetrín, fenvalerato.

**Activadores de plantas**, nueva clase de compuestos que protege a las plantas activando sus mecanismos de defensa (p. ej., acibenzolar).

**Agentes limpiadores**, que matan o repelen organismos que atacan las superficies sumergidas, como los cascos de los barcos.

**Alguicidas**, para el control de algas en lagos, canales, piscinas y depósitos de agua. Como ejemplos podemos mencionar el sulfato de cobre y el endotal.

**Atrayentes**, las sustancias que conducen a un insecto o un roedor a una trampa. Sin embargo, los alimentos no son considerados como plaguicidas cuando se utilizan como atrayentes. Como ejemplo podemos citar el eugenol, un derivado del clavo aromático.

**Bactericidas**, entre los más utilizados podemos citar los siguientes: ácido oxolínico, estreptomicina, formaldehído, hidróxido de cobre y kasugamicina.

**Desinfectantes**, matan o inactivan microorganismos productores de enfermedades u objetos inanimados (utilizados en quirófanos, laboratorios, etc.). Por ejemplo, el bromuro de metilo, el formaldehído, el fosfuro de magnesio y el isopropanol.

**Disruptores del apareamiento**, interfieren en los mecanismos de apareamiento, evitando la reproducción, como el dispartlure o el gossyplure.

**Fumigantes**, producen gas o vapor con la intención de destruir insectos, hongos, bacterias o roedores. Generalmente son utilizados para desinfectar interiores de edificios y suelos, antes de la siembra (acroleína, cloroformo, naftaleno, óxido de etileno, etc.).

**Fungicidas**, también conocidos como agentes anticriptogámicos. Controlan los hongos, muchos de los cuales pueden infectar y causar enfermedades en plantas y animales, como por ejemplo: oxidaciones, mildiu, infecciones y mohos. Los fungicidas pueden ser erradicantes y protectores. Para combatir los hongos, gracias a su gran diferencia del resto de organismos (plantas y animales), no se necesitan grandes dosis de producto para obtener un resultado exitoso y, además, mucho más seguro. Entre los tipos principales se pueden encontrar:

-Alifáticos nitrogenados: butilamina, cimoxanilo.

-Anilidas: mepronil, oxadixil.

-Antibióticos: muchos de ellos no sólo se utilizan en agricultura, sino también en medicina (estreptomicina, griseofulvina, kasugamicina...).

-Benzimidazoles: benomilo, carbendazim.

-Derivados del ácido ditiocarbámico: mancozeb, maneb, propineb. Son compuestos con actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica y ejercen una acción hipotiroidea. Uno de los riesgos de estos compuestos para los individuos que los manipulan es su interacción con el alcohol, ya que provoca incrementos en la concentración de acetaldehído (Edwards y col., 1991).

-Inorgánicos: compuestos con base de cobre (acetato de cobre, caldo bordelés...), mercurio, polisulfuros y zinc, todos con un amplio rango de toxicidad.

-Orgánicos: desacoplan la fosforilación oxidativa, no dejan crear ATP interfiriendo en el paso de electrones; entonces, la energía deriva hacia la formación de calor, provocando fiebre, disnea, sed, debilidad, temblores musculares y cianosis. Se pueden dividir en: aromáticos (clortalonil, hexaclorobenzeno, pentaclorofenol), clorofenoles y nitrofenoles (DNOC, dinoseb). El pentaclorofenol (PCP), prohibido actualmente en 7 países y restringido severamente en al menos 18 países europeos, está considerado altamente tóxico y ha sido usado durante mucho tiempo como protector de la madera. Los nitrofenoles son hepatotóxicos y carcinogénicos, y al igual que los insecticidas organoclorados, se acumulan en el tejido graso y se metabolizan a PCP.

-Organomercuriales y derivados: acetato de etilmercurio, fenilmercurio. Muy tóxicos para todos los organismos.

**Herbicidas**, son compuestos con capacidad de matar plantas que crecen en lugares no deseados. En principio se utilizaron como herbicidas compuestos como el ácido sulfúrico y el arsénico, pero fueron sustituidos progresivamente por otros menos peligrosos y más fitoselectivos (Ecobichon, 1991). Los herbicidas se pueden clasificar por su acción sobre las plantas (total o selectiva), o por el momento de aplicación (presembrado, preemergencia y postemergencia). En las últimas décadas el uso de herbicidas ha crecido muy rápidamente; sin embargo, últimamente se tiende a una estabilización de su producción, buscando que sean cada vez menos dañinos para los mamíferos y más eficientes contra las plantas. Los principales tipos de herbicidas son:

-Amidas: acetocloro, alacloro (probable carcinógeno humano, Stevens y Sumner, 1991), propanil, tebutam. Últimamente son bastante utilizadas.

-Carbamatos y tiocarbamatos: asulam, cicloato, metam. Su utilización está muy difundida ya que poseen la ventaja, respecto de otras clases, de no ser demasiado persistentes en el terreno y de poseer, en general, un bajo nivel de toxicidad para los animales.

-Derivados de fenoles: dinitro-orto-cresol (DNOC), dinoseb, pentaclorofenol (PCP). El PCP, además de tener acción herbicida, también presenta una poderosa acción sobre algunas clases de gusanos filiformes y contra los insectos que perforan la madera de los árboles. Se utilizó mucho en la protección de bosques y en fábricas productoras de celulosa. Como se ha comentado anteriormente, actualmente y al igual que el dinoseb están prohibidos o restringidos en muchos países.

-Dipiridilos: dicuat, paracuat.

-Fenoxiácidos (u hormonales) y derivados: herbicidas hormonales muy eficaces que actúan a través del control del crecimiento de las especies no deseadas, actualmente en desuso. Alteran el crecimiento, la floración o la reproducción de las plantas a través de una acción hormonal con una consecuencia física. Son ejemplos típicos de esta familia el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), el MCPA (4-ácido cloro-2-metilfenoxiacético), etc. Su problema es que pueden convertir plantas no tóxicas en condiciones normales, en plantas tóxicas y alguno de ellos, especialmente el 2,4,5-T, presenta impurezas indeseadas de TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina). Se llevan utilizando en agricultura desde finales de los años cuarenta, y aunque en mamíferos no tienen acción hormonal, pueden elevar el riesgo de sarcomas (Stevens y Sumner, 1991). La combinación del 2,4-D y el 2,4,5-T, conocida como Agente Naranja se utilizó como defoliante durante la guerra del Vietnam. Son productos poco tóxicos, con vida media corta y se eliminan rápidamente, el problema reside en las impurezas de dioxinas que les acompañan (cancerígenas y mutagénicas, con tendencia a biomagnificarse), y eso ha provocado que actualmente estén prohibidos en diversos países.

-Inorgánicos: arseniato sódico, bórax (tetraborato de sodio), cianato potásico, cloruro de mercurio, sulfatos ferroso y cúprico, etc. La mayoría no son selectivos y son irritantes.

-Organofosforados: anilofos, glifosato, glufosinato. Aunque son débiles inhibidores de la acetilcolinesterasa, no hay razón para pensar que su modo de acción sobre mamíferos difiera del de los insecticidas organofosforados.

-Triazinas y triazoles: atrazina, cianazina, amitrol. Son herbicidas de amplio espectro.

-Ureas sustituidas: diuron, fenurón, linurón. La urea puede dar lugar a metabolitos nitrosos cancerígenos, algunos como el linurón pueden causar una respuesta oncogénica (Stevens y Sumner, 1991).

**Insecticidas**, es un grupo muy amplio y diverso. No son muy selectivos, interesa que tengan una acción rápida, por lo que se han creado productos muy tóxicos que generalmente atacan el sistema nervioso. Aunque están diseñados para dañar el sistema nervioso de los insectos, dada la relativa similitud con el sistema nervioso de los vertebrados, pueden actuar sobre un amplio rango de organismos, incluyendo el hombre. La única diferencia es que la concentración efectiva para matar a los insectos es mucho más baja. Resumiendo, podríamos destacar los siguientes:

-Antibióticos: abamectina, ivermectina.

-Bacterianos: *Bacillus thuringiensis*.

- Botánicos: anabasina, derris (rotenona), nicotina.
- Carbamatos: aldicarb, carbaril, carbofuran, metomilo, oxamilo. Con actividad biológica similar a la de los organofosforados. Son de los más utilizados actualmente. Sustituyen a los organoclorados en muchas de sus aplicaciones. Tienen una baja persistencia en el medio, aunque presentan una ligera inhibición de la acetilcolinesterasa.
- Inorgánicos: ácido cianhídrico, arseniatos, derivados fluorados, fósforo de aluminio.
- Nicotinoides: acetamiprid, imidacloprid.
- Piretroides: acrinatrin, cipermetrin, deltametrin, fenvalerato. Junto con los carbamatos, son uno de los grupos más utilizados actualmente. Proviene de un derivado natural, la piretrina. Al ser productos muy fotosensibles, se degradan fácilmente y no presentan efectos tóxicos notables en mamíferos.
- Organoclorados: DDT (p,p'-diclorodifenil tricloroetano), DDD, DDE, lindano, metoxiclor, aldrina, dieldrina, endrina, endosulfán, dicofol (kelthane), clordano, etc. La mayoría están prohibidos en los países desarrollados, ya que tienen una elevada persistencia en el medio ambiente y en los alimentos, gran estabilidad química y una marcada capacidad de bioacumulación y biomagnificación. Muchos de ellos son posibles carcinógenos. Los insecticidas organoclorados son neurotóxicos, causan intoxicación a través de todas las vías de absorción y tienen graves efectos ecológicos. El insecticida más popular de todos los tiempos ha sido el famoso DDT, del grupo de los hidrocarburos, considerado durante décadas como “el salvador del hombre”, debido a su eficacia en el control de las enfermedades causadas por insectos. Salvó y sigue salvando a millones de personas de enfermedades como el tifus, el paludismo y la malaria pero, a la vez, puso en grave peligro a muchas especies, sobre todo de aves y peces. El libro “La primavera silenciosa”, de enorme éxito, hizo abrir los ojos a muchas personas al divulgar que se estaba a punto de acabar con algunas de las especies más emblemáticas de los EEUU. La capacidad de este compuesto organoclorado de acumularse en los tejidos grasos hace que vaya pasando desde niveles inferiores tales como las larvas que se alimentan de hojas fumigadas, hasta aves, roedores y otros animales, hasta llegar al hombre. El uso del DDT empezó a prohibirse en los años setenta y actualmente está prohibido en 34 países, mientras que otros 34 lo restringen rigurosamente. A pesar de todo, se han encontrado residuos de DDT en los lugares más inhóspitos del planeta (Antártida), y actualmente es común encontrarlo en la leche materna, lo cual supone un riesgo para los lactantes.

-Organofosforados: clorpirifos, diclorvos, malatión, paratión. Fueron sintetizados con la intención de sustituir a los organoclorados en muchas de sus aplicaciones agrícolas, ya que, comparativamente, tienen una persistencia mucho menor en el medio ambiente y se degradan rápidamente. Son compuestos muy volátiles, con una actividad biológica muy intensa tanto sobre insectos y ácaros como sobre animales superiores, con lo que presentan un elevado riesgo de intoxicación. Son potentes inhibidores de la acetilcolintransferasa, enzima encargada de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina, lo que provoca que haya una elevada actividad eléctrica y estimulación continua.

-Reguladores del crecimiento de los insectos: perturban la acción de las hormonas de los insectos controlando la muda, la maduración desde el estadio de pupa a adulto u otros procesos. Encontramos inhibidores de la síntesis de quitina (buprofezin, lufenuron), miméticos de hormonas juveniles (fenoxicarb), agonistas (tebufenozida) e inhibidores de la muda (diofenolan), miméticos de hormonas de muda (ecdisona).

-Virales: virus poliédricos.

**Molusquicidas**, matan caracoles y babosas: arseniato de calcio, bromoacetamida, metiocarb, PCP, entre otros.

**Nematicidas**, matan nemátodos que se alimentan de las raíces de las plantas. Principalmente tenemos:

-Antibióticos: abamectina.

-Carbamatos: aldicarb, benomilo, carbofurano, carbosulfan, oxamilo.

-Organofosforados: clorpirifos, dimetoato, fosfamidón.

**Rodenticidas**, controlan ratones y otros roedores. Aunque no tengan gran importancia directa a nivel agrícola, son muy importantes a nivel del almacenaje de las cosechas y a nivel sanitario, ya que muchos de los vectores de las principales plagas han sido roedores.

Como ejemplos podemos citar:

-Anticoagulantes: los derivados de la 4-hidroxicumarina o cumarínicos (warfarina, difenacoum, bromodiolona); derivados de la indandiona (clorofacinona, pindona).

-Estricnina: alcaloide indol, de estructura relativamente similar a la morfina, pero de efectos totalmente opuestos. Inhibe la glicina (inhibidor del sistema nervioso), con lo que aumenta la excitación.

-Inorgánicos: derivados de arsénico, fósforo blanco, sales de talio.

-Otros: 1-(1-naftil)-tiourea (ANTU), escila roja (alga del Mediterráneo), fluoroacetato de sodio (compuesto 1080).

Muchos de los productos citados anteriormente están en continua evaluación debido a sus efectos tóxicos, por lo que su fabricación y uso podrían desaparecer en un futuro más o menos inmediato.

### 1.1.5. Movimiento de los plaguicidas en el medio ambiente

El amplio uso y la disposición de productos plaguicidas por parte de los agricultores, las instituciones y la población en general, provoca que estos productos estén ampliamente distribuidos y puedan aparecer en cualquier lugar. Sólo un pequeño porcentaje de los plaguicidas aplicados, alcanza su objetivo, acabando generalmente en el aire, en la superficie del agua, en los sedimentos, en los alimentos y en organismos sobre los que no se tenía ninguna intención de hacer llegar el plaguicida, entre ellos el hombre.

La manera como se produzca la liberación de los plaguicidas al medio ambiente, determinará su movimiento. La distribución inicial viene condicionada por el método de aplicación, la cantidad de producto, la duración y la frecuencia de aplicación, así como por el lugar de aplicación y las condiciones ambientales durante la aplicación. La topografía del terreno, el tipo y densidad de vegetación, las condiciones del suelo y la proximidad de agua también son factores importantes. Este conjunto de factores determinan la cantidad de plaguicida que se distribuirá en aire, suelo, agua, plantas y animales. El destino de los plaguicidas aplicados en recintos cerrados (p.ej. invernaderos) y edificios, será diferente de los aplicados en lugares abiertos.

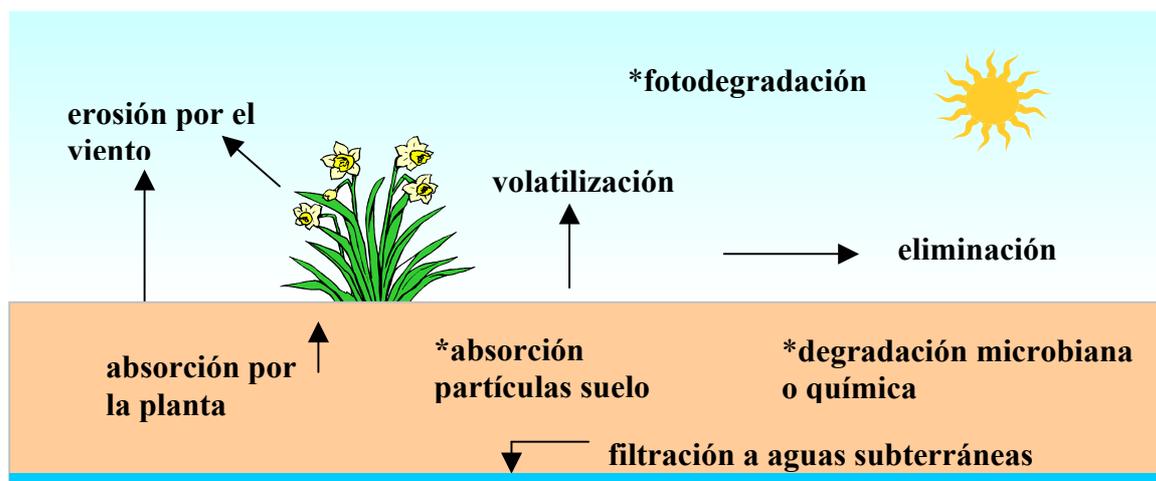


Figura 2. Movimientos de los plaguicidas en el medio ambiente.

Con el tiempo, los plaguicidas pueden redistribuirse en el lugar de aplicación, moverse del lugar (aguas subterráneas, atmósfera, etc.), degradarse o persistir. La figura 2 es un resumen esquemático de los movimientos de los plaguicidas en el ambiente y de sus posibles destinos.

Los plaguicidas pulverizados se pueden mover a través del aire y pueden acabar en lugares muy lejanos, tanto en el suelo como en el agua. Los que se aplican directamente sobre el suelo, pueden filtrarse a capas basales, reabsorberse posteriormente por otras plantas o bien pasar a las aguas subterráneas. Los plaguicidas que llegan a los acuíferos, ya sea porque se han aplicado directamente o indirectamente (por las aguas subterráneas contaminadas, por las pinturas de los barcos, o por la degradación del suelo, etc.), aumentarán la concentración de los productos en el agua y en la atmósfera a través de la evaporación. Esta lista incompleta de posibilidades sugiere que el movimiento de los plaguicidas es muy complejo. Así, por ejemplo, se encuentra DDT en lugares en donde nunca han sido utilizados.

Debido al elevado y continuo movimiento de los plaguicidas, algunos de ellos pueden llegar a lugares no deseados, pudiendo afectar a los depredadores naturales de las plagas, con lo que, en vez de producir un beneficio se provoca un daño más elevado.

### **1.1.6. Metabolismo y degradación de los plaguicidas**

El tiempo que un plaguicida perdura en el ambiente está determinado por su resistencia a la degradación. Los plaguicidas reaccionan en el medio para formar nuevas sustancias químicas, p.ej., mediante oxidaciones o hidrólisis, generalmente menos tóxicas. Se pueden degradar por la luz solar o por la acción de los microorganismos (bacterias, hongos) presentes en el suelo y sedimentos. La capacidad de degradación de los plaguicidas viene determinada por una serie de propiedades (volatilidad, facilidad de evaporación, solubilidad, sensibilidad a los cambios de pH, a la luz, a los microorganismos, etc.).

Por otra parte, los plaguicidas que entran en contacto con los animales y las plantas se pueden degradar a través del metabolismo de estos organismos.

Los plaguicidas que se aplican en interiores generalmente se degradan más lentamente, debido principalmente a la falta de luz solar (así, los cristales de los invernaderos filtran la luz UV necesaria para la degradación de los plaguicidas).

Si por el contrario los productos son resistentes a la degradación, pueden permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo, aumentando la capacidad de movimiento.

Los plaguicidas se transforman metabólicamente en uno o más productos diferentes en el interior de los organismos vivos. Los metabolitos pueden ser más tóxicos o menos tóxicos que los compuestos originales. Así, por ejemplo, la planta del maíz tolera bien los herbicidas del grupo de las triazidas porque desactiva rápidamente este tipo de compuestos, uniéndolos a otros productos de la planta. Por otra parte, también existen algunos plaguicidas que sólo son efectivos después que se han metabolizado.

La supervivencia de los plaguicidas y sus metabolitos fundamentalmente depende de la estructura química del compuesto activo y de que el organismo pueda metabolizar el plaguicida en metabolitos menos tóxicos antes de que la actividad tóxica sea completa o irreversible.

Dentro del metabolismo se pueden diferenciar diversas fases por las que el producto tiene que pasar, incluyendo la absorción, el transporte, la biotransformación, la acumulación y la excreción. Algunos plaguicidas pueden sufrir algún tipo de metabolismo externo, incluso antes de entrar en el organismo. Hay procesos que pueden degradar o modificar los xenobióticos como, por ejemplo, los provocados por cambios del pH (Fisher, 1991), la luz o el calor (Matsumura, 1975).

La acción tóxica de cualquier compuesto depende no solamente de la dosis y de las enzimas de metabolización, sino también de la capacidad del compuesto o de sus metabolitos de unirse a lugares específicos y poder así ejercer su acción.

La mayoría de xenobióticos, debido a su lipofiliidad, atraviesan la membrana con gran facilidad, pero en muchos casos su transporte está condicionado por el pH. Aunque el compuesto haya llegado a su lugar de acción, puede que la porción libre para reaccionar con otras moléculas no sea la suficiente, haciéndolo inactivo.

Las tres rutas principales de absorción de los plaguicidas son la dérmica, la oral y la respiratoria, y pueden ser absorbidos muy específicamente por una sola vía, o de manera más general, por todas las vías.

La mayoría de las exposiciones laborales a plaguicidas son dérmicas y respiratorias (Hayes y col., 1991). Muchos productos químicos, plaguicidas, determinados fármacos y productos de limpieza del hogar, son absorbidos muy eficientemente por la piel, convirtiéndose esta en una vía de entrada muy importante, especialmente para los insecticidas, ya que muchos de ellos son tóxicos por contacto. Un número elevado de personas ha sufrido envenenamiento e incluso algunas han muerto por la absorción de plaguicidas a través de la piel (p. ej., paratión y clordane).

La absorción oral no es demasiado habitual en las actividades ocupacionales relacionadas con plaguicidas, existiendo algunos casos de ingestión accidental sobre todo en niños. La falta de medidas de higiene adecuadas, como pueden ser lavarse las manos o limpiar los alimentos sobre los que se puede haber fumigado con plaguicidas, puede incrementar la cantidad de producto fitosanitario absorbido por el tracto gastrointestinal. Lo importante en la absorción de los plaguicidas es la ruta que siguen. Por ejemplo, el estómago puede absorber fácilmente el 2,4-D y el 2,4,5-T, pero no lo hace de manera eficaz con el paracuat y el dicuat. La absorción en el intestino es similar, aunque para la mayoría de plaguicidas es la difusión simple la que actúa en el tracto gastrointestinal.

Muchos de los plaguicidas se aplican por aspersión y, por tanto, es muy factible que sobre todo los trabajadores que los aplican se vean afectados y puedan respirar partículas que hayan quedado suspendidas en el aire después de una aplicación. Estas partículas, en forma de gas, vapor o micropartículas, al ser inspiradas pueden llegar al pulmón y desde aquí alcanzar el torrente sanguíneo. Para los plaguicidas, el interés toxicológico no radica en la parte del tracto respiratorio en el cual se ha depositado el plaguicida, sino en la cantidad total de dosis retenida.

Un dato aparte, es que no hace falta estar en contacto con aerosoles o gases de partículas para poder inhalarlos, dado que algunos plaguicidas aplicados a las plantas de tabaco pueden pasar a la persona fumadora a través del humo (Bowery y col., 1965).

Las enzimas de plantas o animales son las responsables de un amplio rango de biotransformaciones. Muchas de estas reacciones químicas están determinadas por enzimas específicas. La biotransformación de los plaguicidas conlleva una combinación de diversas reacciones químicas y, en algunos casos, los productos originados pueden formar parte del conjunto metabólico general. El metabolismo de los xenobióticos generalmente ocurre en dos fases: la **fase I**, que incluye predominantemente oxidaciones, reducciones e hidrólisis y sirve para introducir grupos polares en la molécula; y la **fase II**, que consiste en reacciones de conjugación implicando la combinación de los productos de la fase I con una o más moléculas endógenas, para formar productos solubles en agua y hacerlos así excretables. La conjugación es, por tanto, un proceso muy importante en la desintoxicación de los plaguicidas. Sin embargo, hay un número de plaguicidas o sus metabolitos de los que no se conoce que formen conjugados. Con la excepción de la conjugación del glutatión, la mayoría de reacciones de conjugación que incluyen plaguicidas son secundarias, teniendo como substratos los productos de la reacción de la fase I (Dorough, 1984). La conjugación con el glutatión, mediante una de las GST es el primer paso de una secuencia que conduce al ácido

mercaptúrico. Muchos plaguicidas se metabolizan de esta manera, particularmente los organofosforados, DDT, HCH y los organotiocianatos (Motoyama y Dauterman, 1980; Fukami, 1984). Es importante recalcar que tanto la inducción como la inhibición de las enzimas del metabolismo muestran una clara relación dosis-respuesta. La respuesta metabólica de un plaguicida depende mucho de la especie, incluso del individuo, ya que intervienen factores como la resistencia y la tolerancia que reducen la susceptibilidad al tóxico.

La lenta liberación de un compuesto a la circulación, ya sea porque se absorbe muy lentamente o porque forme un depósito en el cuerpo, tiende a suprimir los altos niveles del compuesto que, por otra parte, se alcanzarían en órganos con un flujo rápido de sangre. Por ejemplo, la rápida distribución de compuestos hacia el cerebro no es porque este tenga una gran afinidad sino porque el flujo sanguíneo es mayor. Dependiendo del tejido observaremos una mayor o menor capacidad de retener el compuesto. Los compuestos hidrosolubles se eliminan fácilmente y presentan un almacenamiento mínimo después de su absorción; mientras que determinados metales se almacenan en huesos, con una tasa de excreción muy baja, por lo que su almacenamiento dura largos periodos de tiempo.

Generalmente suele haber un equilibrio entre las reservas de plaguicidas y su excreción por lo que, si el compuesto no se encuentra en concentraciones exageradas, no habrá ningún problema, ya que el cuerpo se encarga de mantener los niveles. En el momento de almacenar los plaguicidas en el cuerpo, aparte de la eficiencia de absorción del compuesto, también son importantes la edad, el sexo, la especie, el estado del hígado y los riñones, la alimentación, etc.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de plaguicidas son lipofílicos y tienden a acumularse en el tejido adiposo (Smeds y Saukko, 2001), no estando disponibles para la eliminación. Estas reservas pueden llegar a alcanzar valores muy elevados y, si se produce un periodo de ayuno prolongado, con la consiguiente pérdida de grasa, las sustancias acumuladas saldrán a la circulación (Imbeault y col., 2001), pudiendo en algunos casos superar la tasa de excreción y provocando una intoxicación.

También se ha observado que los compuestos absorbidos por la madre se pueden transmitir al feto, y que este puede llegar a almacenar algunos plaguicidas (p.ej. organoclorados).

Los compuestos con una toxicidad baja o moderada tienden a guardarse fácilmente (p.ej. DDT), en cambio, los compuestos altamente tóxicos (p.ej. cianida) muestran un almacenamiento reducido.

La excreción de los plaguicidas es una medida de protección contra el envenenamiento. La excreción puede ocurrir a través del aire espirado, por la orina, las heces, la leche y las secreciones dérmicas. De hecho, el paso de sustancias tóxicas de la madre al huevo o al feto constituye, en cierta manera, un proceso de desintoxicación de la madre.

## **1.2. Efectos adversos de los plaguicidas**

### **1.2.1. Resistencia**

Uno de los problemas más importantes que supone el uso continuo de plaguicidas es la aparición de resistencias genéticas en los organismos que se quieren combatir.

Cabe resaltar el papel de los insectos, muy adaptables y que crecen muy rápidamente. A lo largo de los años, se ha dado un patrón cíclico casi predecible de nuevos desarrollos tecnológicos, seguido por una adaptación reactiva por parte de los insectos en respuesta a la exposición al plaguicida. Entre 5 y 10 años (más pronto en áreas tropicales), los insectos pueden desarrollar inmunidad a los plaguicidas mediante selección natural y convertirse en más fuertes y resistentes que antes. Después de 15 años, los productos aún pueden seguir siendo útiles, aunque pasados 20 años desde su introducción, casi no tienen efectos sobre la plagas.

Se estima que desde 1950, al menos 520 especies de insectos y ácaros, 273 especies de malas hierbas, 150 enfermedades de plantas, y 10 especies de roedores (principalmente ratas), han desarrollado resistencia genética a uno o más plaguicidas (Miller, 1999). Probablemente, los productos transgénicos, introducidos en el mercado hace pocos años, también creen resistencias.

Debido a estas resistencias, muchas enfermedades hasta el momento erradicadas están resurgiendo con fuerza, como es el caso de la malaria, con la consiguiente fabricación de nuevos y potentes productos, que van saliendo al mercado.

### 1.2.2. Biomagnificación

La biomagnificación resulta de la acumulación de un producto químico en un organismo, alcanzando niveles mucho más elevados de los que se encuentra en los alimentos que ha ingerido; es decir, cuando el producto químico aparece en más concentración a lo largo de la cadena alimentaria. Es un problema grave ya que, aunque el hombre sea el más afectado por ser el último eslabón de la cadena, no es el único. Los trabajos llevados a cabo sobre biomagnificación se refieren sobre todo a los compuestos organoclorados (OCs) y a los bifenilos policlorados (PCBs), actualmente prohibidos pero que, debido a su elevada utilización durante décadas, todavía hoy se encuentran en elevadas concentraciones en los organismos. Otros compuestos como el arsénico, el metilmercurio, el toxafeno, etc., también presentan el mismo efecto. Diferentes estudios (Kidd y col., 2001; Senthilkumar y col., 2001) han encontrado que las concentraciones más altas de OCs y PCBs se hallan en los depredadores que ocupan los puestos más altos de la cadena. Así, Borga y col. (2001) encontraron que las concentraciones de OCs y PCB en crustáceos estaban comprendidas entre 11 y 50 ng, en peces eran parecidas (15-50 ng), mientras que en aves marinas eran de 1 a 3 órdenes de magnitud superiores. La bioconcentración de plaguicidas por el fitoplancton y el zooplancton, en la base de la cadena alimentaria, incrementa la probabilidad de persistencia de los plaguicidas en los ecosistemas marinos y puede tener efectos en todos los niveles de la cadena (DeLorenzo y col., 2002).

### 1.2.3. Salud ambiental

Las grandes cantidades de plaguicidas que se utilizan constituyen un peligro para el medio ambiente. Según datos de PAN-Europa (*Pesticides Action Network Europe*), 300.000 toneladas de pesticidas son liberadas cada año en Europa.

Sin embargo, existe también una gran preocupación por todos aquellos que se han ido acumulando y están sin utilizar. Según datos de la FAO, se calcula que cientos de miles de toneladas de plaguicidas caducos están repartidas por todo el mundo. La FAO (2001) calcula que la cantidad de restos de plaguicidas en África y Medio Oriente ronda las 100.000 toneladas, en Asia casi las 200.000 toneladas y una cantidad semejante en Europa del Este y en la antigua Unión Soviética. El legado de plaguicidas obsoletos representa una amenaza constante para la salud animal y ambiental. En muchos países africanos, los bidones que

contienen plaguicidas peligrosos pierden líquido, y muchos de estos recipientes se utilizan después para almacenar agua y alimentos. Los costes para limpiar todos los plaguicidas obsoletos son demasiado elevados para que los países en desarrollo puedan hacer frente a esos gastos, con la consiguiente contaminación permanente.

Dentro de los múltiples efectos sobre el ambiente a considerar, especialmente por sus posibles consecuencias sobre la salud humana, está la contaminación de los ríos, de las aguas subterráneas y de los alimentos.

Debido a las prácticas agrícolas actuales de explotación del terreno, los cultivos han perdido diversidad. Los suelos que se han dejado de cultivar sufren una elevada erosión, pierden materia orgánica y están contaminados con plaguicidas y metales pesados. Los plaguicidas se filtran a las aguas subterráneas, y aumentan los daños ecológicos. Los nitratos y algunos plaguicidas, a través de la lixiviación de las tierras cultivadas también alcanzan las aguas subterráneas. La contaminación de las aguas, ya sean superficiales o subterráneas, comporta graves riesgos para la salud (Ritter y col., 2002). Los datos del estudio de Van Maanen y col. (2001) en una región de Holanda indican que existen niveles elevados de plaguicidas en aguas subterráneas y en la lluvia, llegando en algunos casos a superar los niveles máximos permitidos.

### **1.2.3.1. Problemática ecológica: disruptores endocrinos**

Los disruptores endocrinos juegan un papel muy importante en la salud, tanto humana (a tratar más adelante) como en el resto de animales, teniendo una especial relevancia ecológica. La capacidad de los plaguicidas para interferir en la función endocrina, fue establecida hace más de 30 años, cuando se asoció el descenso de población de pájaros piscívoros en los Estados Unidos debido a problemas reproductivos graves provocados por hidrocarburos clorados (Hickey y Anderson, 1968; Health y col., 1969). El problema se resolvió con la retirada del DDT, aunque la elevada persistencia del mismo y de otros plaguicidas organoclorados, continúan teniendo algún efecto. Numerosos estudios han asociado diferentes patologías reproductivas y endocrinas observadas en distintas especies animales con la exposición a compuestos plaguicidas. Un ejemplo de esto sería la reducción significativa de la población de caimanes en el lago Apopka en Florida, después de diez años de exposición accidental a dicofol/keltano (muerte de los huevos y crías, anormalidades severas en órganos reproductivos, etc.) (Woodward y col., 1993; Guillette y col., 1995). Otros efectos evidenciados de las disrupciones endocrinas son: alteraciones de la función tiroidea y

del sistema inmune y disminución de la fertilidad (Colborn y col., 1993; Akingbemi y Hardy, 2001); desordenes en la diferenciación sexual de los machos y desmasculinización de diversas especies (Guillette, 2000; Sultan y col., 2001; Halles y col., 2002), con lo que se puede poner en peligro a la misma especie y a todo un ecosistema. Ya que las hormonas controlan parte del sistema nervioso central, se especula sobre los posible efectos cognitivos mediados por las acciones endocrinas de los plaguicidas (Schantz y Widholm, 2001).

Casi todos los efectos encontrados en el hombre se podrían extrapolar al resto de vertebrados. Así, no es de extrañar el efecto inmunotóxico de los compuestos organoclorados en los osos polares (Bernhoft y col., 2000), encontrándose una correlación negativa entre los niveles de organoclorados y de inmunoglobulinas G.

#### **1.2.4. Efectos directos sobre la salud humana**

Se estima que las intoxicaciones agudas por plaguicidas alcanzan entre 1 y 3 millones de casos al año en todo el mundo. La mortalidad varía entre el 1% y el 9% y depende del tratamiento y de los antídotos utilizados. Los envenenamientos intencionados con plaguicidas (generalmente por suicidio), adquieren cifras importantes, al estar estos productos en la mayoría de hogares y al alcance de todas las personas.

Las intoxicaciones no intencionadas ocurren principalmente en trabajadores agrícolas y en sus familias y la exposición ocurre principalmente durante la mezcla y utilización de los plaguicidas, fumigando o entrando en un área tratada.

La exposición a plaguicidas está ligada a la aparición de diferentes alteraciones bien descritas, pero muchas veces clasificadas como inespecíficas, ya que, por su naturaleza son difíciles de atribuir a un determinado compuesto. Así, es común la aparición de cefalea, astenia, eritema, prurito, rinitis, conjuntivitis, fiebre, dificultades respiratorias, etc. (Kishi y col., 1995; López y col., 1998), que muchas veces se corresponden con intoxicaciones agudas pero que se catalogan como otras enfermedades no relacionadas, generalmente como un resfriado común o una gripe. También son muy comunes las alergias, las irritaciones de mucosas y las dermatitis por contacto, provocadas por la mayoría de compuestos plaguicidas, y que son otros de los efectos de hipersensibilidad bien documentados y más habituales en la comunidad agrícola (Spiewak, 2001; Penagos, 2002). También se cree que los plaguicidas pueden causar asma (Eskenazi y col., 1999).

El tratar de asociar la exposición a plaguicidas con determinados efectos o enfermedades está muy de moda. Como ejemplo cabe citar, la relación de los plaguicidas, en los veteranos de la guerra del Golfo, con una sensibilidad química múltiple y con el síndrome de fatiga crónica (Reid y col., 2001). Aunque la literatura intenta relacionar estos síndromes con los plaguicidas (entre otros contaminantes ambientales), es muy difícil discernir entre las posibles causas debido a los múltiples síntomas.

Otro problema añadido es que muchas intoxicaciones desencadenan alteraciones al cabo de varias semanas de la exposición. Los efectos a largo plazo de los plaguicidas sobre la salud se producen por el almacenamiento de los mismos en el organismo o por los efectos acumulativos irreversibles después de la exposición (López y col., 1998).

Seguidamente se tratarán algunos de los aspectos con más relevancia médica provocados, generalmente, por exposiciones prolongadas a estos productos.

#### **1.2.4.1. Intoxicaciones**

Las intoxicaciones agudas debidas a exposiciones ocupacionales agrícolas están bien documentadas. Así, Martín Rubí y col. (1996) estudiaron 506 casos de intoxicación aguda en Almería que necesitaron hospitalización, entre 1981 y 1992. Los agentes responsables más frecuentes fueron los plaguicidas organofosforados (metamidofos, clorpirifos y paratión), que desencadenaron un cuadro de síntomas colinérgicos. La mayoría de intoxicaciones se produjeron por vía dérmica o por inhalación, y se produjo un 5% de defunciones. Esto es un reflejo de lo que ocurre a diario en zonas de agricultura intensiva (como Almería). El riesgo reside en que el trabajador relaciona la intoxicación con la exposición, pero tiene una gran dificultad para asignar un efecto nocivo a largo plazo.

Otro caso aparte que ya ha sido mencionando corresponde a las intoxicaciones intencionadas, con finalidad suicida, que representan una fracción elevada de los accidentes por intoxicación con plaguicidas (Langley y Sumner, 2002).

Existen muchos problemas para identificar las intoxicaciones agudas. Sobre todo las crónicas, ya que aunque son habitualmente objeto de seguimiento específico, no suelen ser identificadas correctamente. Entre los efectos mejor documentados producidos por los plaguicidas a largo plazo, hay que citar los que afectan a los sistemas inmunitario, nervioso, endocrino y reproductor, así como y su incidencia en la génesis de determinados cánceres.

### 1.2.4.2. Mortalidad ocupacional agrícola

Por lo general, la mortalidad de una población especialmente expuesta a plaguicidas no muestra diferencias relevantes respecto a otras poblaciones no expuestas, si bien existen casos específicos de asociaciones directas entre algún plaguicida y mayor mortalidad por cáncer (Pesatori y col., 1994; Amoateng y col., 1995; Tollestrup y col., 1995). Cabe señalar también que, debido generalmente a que la actividad agrícola se asocia a un estilo de vida saludable (alimentos frescos, vida al aire libre y no sedentaria), algunos estudios han encontrado en poblaciones agrícolas tasas de mortalidad inferiores a las de la población general (López y col., 1998). Estos datos no excluyen, sin embargo, que la actividad agrícola relacionada con el uso y exposición a plaguicidas no represente ningún peligro para la salud, tal como queda reflejado en los siguientes apartados.

### 1.2.4.3. Alimentos

Otro problema que afecta al hombre y al resto de animales, es el de los alimentos que, de manera directa o indirecta, han sido tratados con productos plaguicidas en los días previos a su consumo. Los alimentos pueden contener cantidades bastante elevadas de plaguicidas y, si no se toman las medidas higiénicas adecuadas, dependiendo del producto se pueden ir acumulando en el organismo y/o biomagnificarse a través de la propia cadena alimentaria. Actualmente, la mayoría de alimentos se someten a algún tratamiento plaguicida (en la siembra, en el almacenamiento, en el transporte,...), existiendo en muchos países una legislación específica sobre la contaminación de los alimentos. La relevancia del tema ha llevado a la realización de diversos estudios para determinar las concentraciones de plaguicidas presentes en diferentes alimentos. Como ejemplo de ello se podría citar el estudio realizado en Tailandia, donde se hizo un seguimiento de los residuos de plaguicidas en los alimentos entre 1989 y 1996; en total se encontraron 24 plaguicidas diferentes (Vongbuddhapitak y col., 2002). Otros estudios en diferentes países corroboran que la mayoría de alimentos analizados contenían residuos de plaguicidas (Kalantzi y col., 2001; Hamlet y col., 2002).

Los alimentos en los que generalmente se han encontrado mayor cantidad de residuos de plaguicidas se corresponden con los vegetales, tubérculos y frutas frescas (Schinas y col.,

2000; Kobayashi y col., 2001; Fenske y col., 2002; Moysich y col., 2002), sobre los que más directamente se deposita el plaguicida.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los compuestos plaguicidas son lipofílicos así que, aparte de los productos sobre los que se aplican directamente los plaguicidas, serán los alimentos que contengan más grasas los más afectados. Según el estudio de Pandit y col. (2002), las cantidades mayores de DDT en derivados de la leche se encontraron en la mantequilla, seguida del queso y de la leche en polvo. También se han detectado cantidades significativas de estos contaminantes en pescados y carnes (Shinas y col., 2000; Moysich y col., 2002).

Se han encontrado restos de diferentes plaguicidas organoclorados en la leche materna, principalmente de DDT y sus derivados. Este hallazgo no se restringe a una zona en concreto, sino que está distribuido por todo el planeta, lo que contribuye a ratificar la elevada persistencia del DDT. Así, recientemente se han encontrado residuos de organoclorados en la leche materna en España (Campoy y col., 2001), Grecia (Schinas y col., 2000), Estados Unidos (Pohl y Tylanda, 2000), Kuwait (Saeed y col., 2000) y Méjico (López-Carrillo y col., 2001); entre otros ejemplos. Las concentraciones encontradas se ven afectadas por los hábitos en la dieta y por la edad. Este último factor está relacionado con la capacidad metabólica de los individuos, que disminuye con la edad.

En la mayoría de estos trabajos, los valores de plaguicida encontrados fueron generalmente (con algunas excepciones) inferiores a los máximos establecidos como ingesta diaria aceptada (ADI). Pero no hay que olvidar que no se ingiere un único alimento, lo que contribuye a una suma de compuestos y a un posible riesgo de bioacumulación.

Si se encuentran restos de plaguicidas en humanos, no es de extrañar que ocurra lo mismo en otras especies animales, incluso en las más salvajes como el lobo del este de Europa (Shore y col., 2001).

La elevada persistencia de algunos plaguicidas provoca que todavía aún hoy en día se encuentren distribuidos por todo el planeta y se sigan detectando en cualquier organismo a pesar de haber transcurrido bastantes años de su retirada del mercado. Sin embargo, algunos estudios, como el realizado en Barcelona con el hexaclorobenceno (To-Figueras y col., 1995) demuestran que los niveles en sangre han descendido en la población respecto a los niveles encontrados en años anteriores, debido a las normativas de reducción de plaguicidas organoclorados.

#### **1.2.4.4. Efectos inmunológicos**

Está demostrada desde hace mucho tiempo la asociación entre la supresión de la respuesta inmune y el aumento en la incidencia de infecciones y cáncer. También está probado que la exposición ambiental a sustancias químicas, muchas de las cuales son plaguicidas o contaminantes de estas sustancias, pueden alterar el funcionamiento del sistema inmunitario, provocando inmunodeficiencias (Daniel y col., 2001) que pueden acarrear enfermedades más severas. Hay que tener presente que en la formulación de los plaguicidas aparecen otros ingredientes considerados “inertes” y, ocasionalmente, subproductos no queridos en el proceso de fabricación, que muchas veces son los causantes de la inmunosupresión.

#### **1.2.4.5. Efectos neurotóxicos**

Las distancias que separan el sistema nervioso de los vertebrados del de los invertebrados no son tan grandes. Como consecuencia, los insecticidas preparados para atacar el sistema nervioso de los insectos (clorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, etc.) son igualmente capaces de producir efectos agudos y crónicos sobre otros vertebrados, incluido el hombre. Por lo tanto, no hay que extrañarse al encontrar alteraciones en el sistema nervioso sensorial, motor, autónomo y en las funciones cognitivas y comportamentales, trastornos del sueño, cefaleas, etc., en las personas expuestas a los diferentes productos.

La literatura es prolífica respecto a las neuropatías retardadas, con aparición posterior a la exposición a organofosforados (Hsieh y col., 2001; Wesseling y col., 2002). Las neuropatías y otros trastornos neurológicos pueden encontrarse tanto en personas expuestas a bajas y repetidas dosis de organofosforados (exposiciones crónicas), aunque son mucho más frecuentes en intoxicaciones agudas y subagudas. Los síntomas incluyen nerviosismo, fatiga, déficit de memoria y depresión, entre otros. Muchos de estos cambios aparecen aún sin que exista una disminución manifiesta de la colinesterasa, aunque la exposición a organofosforados la gran mayoría de veces va ligada a un descenso significativo en los niveles de colinesterasa sérica (Dyer y col., 2001). También existe la posibilidad de alteraciones del sistema nervioso por exposición perinatal a diferentes plaguicidas (Zhang y col., 1992; Bajaj y col., 1993).

En los últimos años se está relacionando la exposición a plaguicidas con enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson (Engel y col., 2001; Jenner, 2001; Woodward, 2001) y la enfermedad de Alzheimer (Gauthier y col., 2001)

#### **1.2.4.6. Efectos endocrinos**

Muchos de los plaguicidas utilizados hoy en día son estrogénicos con capacidad disruptora endocrina, es decir, mimetizan los efectos de hormonas endógenas (estrogénicas/antiestrogénicas) o las perturban de alguna manera. Existen evidencias sobre los disruptores endocrinos de que químicos medioambientales, tales como los plaguicidas (DDT, junto con otros organoclorados, actúan como xenoestrógenos), juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama, ya que los factores de riesgo bien conocidos sólo explican un reducido porcentaje de casos (Allen y col., 1997) y los tumores mamarios tienen más riesgo de aparecer cuando existe un exceso de actividad hormonal estrogénica (Davis y col., 1993). Concretamente, Falck y col. (1992) encontraron que la grasa de las mamas de las mujeres con carcinoma mamario contenía mucha más cantidad de metabolitos de DDT que la grasa de las mujeres controles y, que las mujeres con concentraciones elevadas de DDE en suero eran más propensas a desarrollar cáncer de mama (Wolff y col., 1993). Otros estudios llevados a cabo en agricultores han relacionado la exposición a herbicidas fenoxiácidos y a DDT, con un incremento en los casos de cánceres relacionados con glándulas hormonales (Buranatrevedh y Roy, 2001).

Algunos estudios han llamado la atención sobre los riesgos para la salud infantil derivados de la exposición intrauterina y durante la lactancia de madres profesionalmente expuestas a los plaguicidas. En los trabajos de Weidner (1998) y García (1999), se asocia la exposición a plaguicidas con criptorquidia y con malformaciones congénitas.

#### **1.2.4.7. Toxicidad reproductiva**

Son bien conocidos los efectos tóxicos para la reproducción del dibromuro de etileno, del carbaril, de la clordecona y del 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP). Los primeros estudios sobre el nematocida DBCP, llevados a cabo por Torkelson en 1961, ya demostraron que este compuesto provocaba atrofia testicular en ratas, cobayas y conejos. Whorton en 1977 confirmó y amplió estos resultados, encontrando casos de azoospermia y oligospermia en trabajadores californianos expuestos a DBCP. Quizás el caso más llamativo se produjo

durante la década de los 80 en Costa Rica, en donde se diagnosticó la esterilidad o infertilidad permanente de 1500 trabajadores expuestos al nematocida DBCP, el cual se había empezado a aplicar a los cultivos de bananas en 1970 y que se continuó utilizando en otros países en vías de desarrollo después de haberse conocido esta información (Thrupp, 1991) y haber sido prohibido en los Estados Unidos a finales de los 70. Así, trabajos posteriores de Slutsky y col. (1999) con una población de 26.400 hombres, trabajadores en plantaciones de banana o piña de 12 países diferentes, también encontraron importantes alteraciones reproductivas.

Otros plaguicidas también se han asociado con descensos de la fertilidad (De Cock y col., 1994; Koifman y col., 2002), reducción de la fecundidad en mujeres (Abell y col., 2000); incremento de abortos espontáneos (Arbuckle y Sever, 1998) y anomalías congénitas (Shaw y col., 1999). Los efectos del defoliante conocido como agente naranja y utilizado durante la guerra del Vietnam, persisten hoy en día en forma de incremento de abortos, malformaciones, discapacidades y nacimientos prematuros (Le y Johansson, 2000).

#### **1.2.4.8. Carcinogénesis**

Los estudios epidemiológicos para identificar la responsabilidad de un plaguicida en un proceso cancerígeno presentan dificultades dado que lo habitual es que los individuos estén expuestos a múltiples productos. Así y todo, se han establecido relaciones entre la exposición (laboral o no) a plaguicidas y determinados tipos de cáncer.

Por ejemplo, un estudio encontró que los niños nacidos de madres que habían usado plaguicidas durante los últimos meses del embarazo tuvieron un riesgo tres veces mayor de desarrollar leucemia en la niñez, mientras que los niños expuestos después de nacer presentaban un riesgo dos veces mayor (Leiss y Savitz, 1995).

Se ha evidenciado especialmente un incremento de leucemias y linfomas no Hodgkin en niños residentes en zonas de elevada exposición a plaguicidas (Buckley y col., 2000; Meinert y col., 2000), y en adultos expuestos a diferentes plaguicidas, no necesariamente ligado a su actividad laboral (Cullen y col., 1990; Hardell y col., 2001; McDuffie y col., 2001; Zheng y col., 2001).

Las neoplasias de origen hematopoyético se han relacionado también con la exposición ocupacional directa e indirecta a plaguicidas (Costantini y col., 2001). Además, Wiklund y Holm (1986), encontraron un elevado riesgo de cáncer testicular entre los trabajadores y aplicadores de plaguicidas en Suecia. Otros cánceres que se han asociado con la exposición a

plaguicidas son el cáncer pancreático (Ji y col., 2001), el cáncer de pulmón (Blair y col., 1983; Safi, 2002), los cánceres de estómago, hígado y vejiga (Stubbs y col., 1984; Safi, 2002), de vesícula biliar (Shukla y col., 2001), mieloma múltiple (Brown y col., 1990; Eriksson and Karlsson, 1992), sarcomas de tejidos blandos (Hardell y Erikson, 1988; Kogevinas y col., 1995; Lynge 1998), y cánceres de cerebro, próstata, colon, útero, mama y tiroides (Safi, 2002), que en diversos grados se correlacionan con un incremento en la mortalidad (Koifman y col., 2002).

Muchas veces no es la sustancia activa la que provoca la acción, sino los disolventes empleados en las formulaciones, ya que existen evidencias de que algunos de los disolventes utilizados presentan efectos carcinogénicos en el hombre y en otros animales (López y col., 1998). Podemos citar, entre otros, el benceno, el cloroformo, el tetracloruro de carbono, el 2-nitropropano, etc.

Diversos plaguicidas han sido clasificados por la IARC en la categoría de “posiblemente carcinógenos para el ser humano”, y aunque muchos ya han sido retirados del mercado algunos todavía se siguen utilizando.

#### **1.2.4.9. Efectos genéticos**

El daño provocado por los productos fitosanitarios no se limita simplemente a evidencias externas, sino que la mayoría de veces estos productos llegan a interaccionar con el material genético, dañándolo, y si esta lesión no se repara correctamente se puede originar una serie de efectos, algunos de los cuales ya se han tratado anteriormente (cáncer, enfermedades degenerativas, abortos, descendencia con alteraciones genéticas,...). La identificación de estos cambios genéticos es un punto clave y esencial antes de llegar a mayores consecuencias. Numerosos estudios han puesto de manifiesto alteraciones cromosómicas en los individuos que están en contacto con plaguicidas; así, Webster y col. (2002) encuentran que la exposición ocupacional a organofosforados resulta en un incremento significativo de la frecuencia de roturas y *gaps* cromosómicos. Se han observado diferentes efectos citogenéticos (principalmente CA, SCE, MN y SCGE) en poblaciones laboralmente expuestas a plaguicidas y que están ampliamente documentados en el Anexo 2. En numerosos casos se puede establecer una asociación positiva entre la exposición y el incremento en la frecuencia de las alteraciones citogenéticas analizadas.

## 1.3. Toxicología

El uso de cualquier compuesto biológicamente activo puede provocar problemas de toxicidad. De manera general, las personas que pueden estar más afectadas son aquellas que están en contacto directo con el compuesto, incluyendo quienes los manufacturan, formulan y utilizan. Lo mismo ocurre con los plaguicidas, aunque en este caso no sólo adquieren relevancia en el sector laboral, ya que se utilizan indiscriminada y ampliamente, y muchos alimentos han sido tratados con los mismos. El problema de los plaguicidas es más que la suma de los daños reales y potenciales, dado que el riesgo asociado a su uso depende tanto del punto de vista de sus detractores (que alegan problemas de salud y ambientales), como de sus defensores (que alegan beneficios económicos y sociales).

En apartados anteriores se han comentado tanto los beneficios como los efectos perjudiciales sobre la salud y el medio ambiente que muchos de los compuestos plaguicidas producen. Cómo controlar estos riesgos, evaluar el peligro y determinar el daño son aspectos que corresponden a la toxicología. Es la finalidad de la toxicología el identificar y evaluar los problemas y, sobre la base de estudios científicos, prevenir el daño y desarrollar estrategias para contrarrestar los efectos tóxicos.

La toxicología realiza estudios cualitativos y especialmente cuantitativos de los efectos negativos de los agentes químicos, físicos y biológicos, observados como consecuencia de las alteraciones funcionales y estructurales de los distintos órganos y sistemas de los seres vivos.

### 1.3.1. Definición de toxicidad

En términos amplios, se entiende que la toxicidad es la capacidad de un compuesto para ocasionar daños mediante efectos biológicos adversos, una vez ha alcanzado un punto susceptible del organismo. Esta posible acción tóxica significa que la exposición a los contaminantes comporta un **riesgo**, el cual se puede definir como la probabilidad o posibilidad de aparición de efectos indeseables como resultado de la exposición a un contaminante, bajo unas circunstancias concretas. Así pues, la toxicidad es uno de los factores que determinan el riesgo. Pero el riesgo depende además de otros factores, tales como la intensidad y la duración de la exposición, la volatilidad del compuesto, el tamaño de las partículas, factores hormonales, etc., entre una larga lista de aspectos que pueden influir y que se tratarán más adelante.

El concepto de toxicidad se refiere a los efectos biológicos adversos que pueden aparecer tras la interacción de la sustancia con el cuerpo, mientras que el concepto del riesgo incluye además la probabilidad de que se produzca una interacción efectiva.

En consecuencia, la toxicidad y el riesgo se concretarán en cada circunstancia particular en función de los efectos biológicos y las propiedades fisicoquímicas del compuesto implicado, así como de las características que presente la exposición al mismo.

Seguidamente se tratarán algunos puntos relevantes para comprender la finalidad de los estudios de toxicología, no solamente de los plaguicidas sino extrapolables a cualquier otro producto.

### **1.3.2. Toxicidad aguda y toxicidad crónica**

La toxicidad de un compuesto se puede clasificar de acuerdo con la naturaleza de la exposición. El concepto de exposición, integra la concentración del compuesto y el tiempo de exposición.

Hay que hacer una distinción entre la toxicidad aguda, con efectos inmediatos al cabo de poco tiempo, horas o días, fácil de observar y comprobar; y la toxicidad crónica, mucho más difícil de evaluar, ya que los efectos aparecen después de semanas, meses e, incluso, años.

El daño observado puede ser el resultado directo de la acción del tóxico o de sus metabolitos, o puede ser debido a causas ajenas al compuesto tales como malnutrición, edad, alteraciones metabólicas, etc. Como ya se ha comentado, la toxicidad aguda por plaguicidas se caracteriza por una serie de síntomas, generalmente reacciones alérgicas, provocadas por una exposición mayoritariamente puntual a unas dosis muy elevadas.

Los estudios de corta duración con animales proporcionan evidencias de qué efectos están asociados con los químicos y tras qué dosis aparecen tales efectos. Algunas veces se tienen datos en humanos debido a exposiciones accidentales. Cuando se dispone de las dos evidencias, es factible realizar una estima del nivel necesario para que un tóxico específico produzca un efecto agudo adverso en humanos.

Para evaluar la toxicidad crónica existen una serie de tests específicos que evalúan el daño reproductivo, alteraciones del comportamiento, cáncer, etc. Las pruebas se realizan con animales de experimentación, que se someten a altas dosis del producto hasta obtener la respuesta adversa deseada. Para poder extrapolar los resultados a humanos, existen diferentes modelos matemáticos que permiten predecir los niveles de daño.

Algunos productos son propicios a causar toxicidad crónica debido a su absorción y a su alta irreversibilidad, aún sólo con una única dosis. Otros, sin embargo, necesitan de una exposición continua a niveles suficientemente elevados.

A veces, la toxicidad crónica es difícil de evaluar ya que los efectos que se observan son el resultado de una exposición continua a diferentes compuestos y en concentraciones desconocidas. Ahora bien, generalmente a mayor tiempo de exposición, mayor cantidad de producto puede entrar en el organismo.

En la evaluación de la toxicidad crónica en el caso de exposiciones humanas, también se recurre a evidencias epidemiológicas, principalmente en exposiciones laborales y/o accidentales. En el caso de los agricultores, los niveles de exposición a plaguicidas en el lugar de trabajo son generalmente más altos que en el resto de ambientes, y se puede determinar la duración de la exposición. Las exposiciones crónicas son un problema difícil de tratar ya que, debido al largo periodo de tiempo en el que se está expuesto, no se controlan todos los factores que pueden haber influido y que tienen efectos adversos sobre la salud. Es un problema el determinar la dosis requerida para cada dolencia, lo que hace mucho más difícil obtener una conclusión definitiva entre la mayoría de exposiciones ambientales y los efectos crónicos de salud observados.

La exposición solamente será efectiva cuando el tóxico se incorpore al individuo. La cantidad de plaguicida u otro contaminante que se incorpore al organismo constituirá la dosis absorbida o dosis interna. De la cantidad absorbida, la que alcance un determinado órgano (después de pasar todas las barreras) constituirá la dosis local recibida por el mismo y será la causante de los efectos tóxicos en ese punto.

### 1.3.3. Índices de toxicidad

Las pruebas experimentales para establecer la toxicidad de los compuestos químicos se realizan principalmente con animales de laboratorio (ejemplares relativamente asequibles y cuya respuesta sea extrapolable al hombre); aunque también se llevan a cabo pruebas *in vitro* y, en menor grado, los estudios con humanos (generalmente, tras exposiciones laborales, terapéuticas o accidentales).

Una de las pruebas más utilizadas consiste en determinar la dosis letal media para exposiciones agudas ( $DL_{50}$ ) que es la dosis, expresada en miligramos del tóxico por kilogramo de peso del individuo, que administrada de una sola vez por vía oral a un grupo

concreto de individuos produce la muerte del 50% de los mismos en un periodo de 14 días tras el tratamiento. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) determina la concentración del tóxico en el aire que, al ser inhalada durante un periodo determinado de tiempo, produce el fallecimiento del 50% de los animales.

Desde el punto de vista de la prevención de los riesgos higiénicos, los índices de toxicidad  $DL_{50}$  y  $CL_{50}$  no permiten deducir unos niveles admisibles de exposición. Para ello habría que conocer las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta de cada posible contaminante, principalmente en el punto referente a valores umbral de respuesta, y poder así deducir los niveles máximos de concentración ambiental que no producen efectos adversos.

Llegar a conocer todas estas relaciones no es fácil y no siempre es posible determinar los valores umbrales de respuesta debido al amplio margen en la sensibilidad humana. Los niveles ambientales admisibles se establecerán en función de toda la información disponible, ya sea toxicológica, epidemiológica o clínica. Así, dependiendo de los criterios que se tengan en cuenta se han establecido varias listas de valores umbral. La más aceptada en los países occidentales es la de la "*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*" (ACGIH) de EEUU, conocida como *Threshold Limits Values* (TLV) o valores límites umbral. Esta lista incluye tres categorías de valores: los TLV-TWA, medidas ponderadas en el tiempo (exposición media durante 8h); TLV-STEL, límites de exposición para periodos cortos de tiempo (15 min); y TLV-C, valores techo, nunca sobrepasables.

Los TLV no se pueden utilizar como índices relativos de riesgo o toxicidad, simplemente representan las condiciones bajo las que la población puede estar expuesta sin manifestar efectos adversos, teniendo en cuenta la variabilidad interindividual.

Otro modo de realizar una valoración de la exposición con finalidad preventiva es mediante los límites biológicos de exposición o BEI (*Biological Exposure Index*). Los BEI representan las cantidades máximas de contaminantes a los que el trabajador puede estar expuesto sin peligro para su salud, calculados a partir de determinaciones efectuadas en sus tejidos, fluidos biológicos o aire exhalado y pueden proporcionar una estimación de la exposición interna (determinación del contaminante o metabolitos) o una medida de la respuesta individual del trabajador (efecto).

### 1.3.4. Factores que influyen en la toxicidad

Existen diferentes factores que determinan la toxicidad de un producto. No depende simplemente de la naturaleza química del compuesto, sino de la dosis absorbida, del tiempo de exposición, de la edad y sexo del individuo expuesto, de su metabolismo, de la dieta, etc, aspectos que se han de tener en cuenta a la hora de realizar estudios toxicológicos.

Entre los factores más influyentes podemos señalar los siguientes:

➤ *La dosis*

Para cada producto, la dosis marca la diferencia entre la salud y la muerte. La importancia de la dosis en la toxicidad es el factor clave y fundamental. Una cantidad suficientemente elevada del material más inocuo puede ser fatal y una pequeña cantidad del más virulento de los venenos puede no tener efecto. Como ejemplo podemos citar el arsénico, el plomo y el mercurio, utilizados como plaguicidas inorgánicos y a los que estamos expuestos diariamente a través de los alimentos y del agua. En condiciones normales no nos causan ningún problema, pero a concentraciones muy elevadas son mortales.

➤ *El compuesto*

Dependiendo del compuesto hablaremos de la toxicidad de los productos primarios o de los productos derivados.

Las sustancias activas de los plaguicidas muestran un amplio rango de toxicidades. Algunos plaguicidas sufren un proceso de degradación durante el almacenamiento, por la luz, enzimas o microorganismos, pudiendo originar compuestos diferentes a los del producto original y que pueden ser incluso más peligrosos que el producto primario. Por ejemplo, en el caso del herbicida 2,4,5-T, en su fabricación también se genera TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), producto mucho más tóxico y cancerígeno.

➤ *Interacción de los compuestos*

En la práctica, la toxicidad de un determinado plaguicida es especialmente difícil de evaluar debido a que generalmente no se aplican individualmente sino como mezclas de diferentes plaguicidas. Por lo tanto, su estudio deberá tener en cuenta las posibles interacciones entre los diferentes compuestos. La toxicidad de una sustancia puede verse incrementada o disminuida por la exposición simultánea, o consecutiva, a otra sustancia. Los efectos combinados pueden ser:

- a) Aditivos, en donde el efecto tóxico de la combinación de dos sustancias corresponde a la suma de los efectos individuales; por ejemplo, dos insecticidas organofosforados producen una inhibición aditiva de la colinesterasa.
- b) Sinérgicos, con una respuesta mayor que la esperada por la simple adición de las respuestas individuales.
- c) Potenciadores, si una sustancia que no es tóxica en un determinado órgano diana, al agregar otra, la segunda se vuelve mucho más tóxica por la presencia de la primera. Por ejemplo, el isopropanol no es tóxico para el hígado pero cuando se administra junto con tetracloruro de carbono, el primero incrementa la actividad hepatotóxica del segundo compuesto.
- d) Antagónicos, cuando dos sustancias administradas simultáneamente se interfieren mutuamente en sus acciones o interfieren con la acción de otra. Las respuestas antagónicas son la base de muchos antidotos. El antagonismo puede ser funcional, donde cada sustancia produce efectos contrarios sobre la misma función fisiológica, contrarrestándose mutuamente; químico o por inactivación, reacción que da lugar a un producto menos tóxico; disposicional, que produce una alteración de la absorción, distribución, metabolismo o excreción de un compuesto para disminuir su concentración o duración en el lugar diana; y, finalmente por recepción, basado en un bloqueo de una sustancia por otra en el mismo receptor, p.ej., el bloqueo del receptor de la colinesterasa con atropina en el envenenamiento con organofosforados.

➤ *Duración de la dosificación*

La toxicidad puede aumentar a medida que se van repitiendo las dosis durante largos periodos de tiempo (toxicidad crónica), o bien puede aparecer una adaptación. El organismo expuesto a un compuesto durante largos periodos de tiempo puede desarrollar medidas de protección como, por ejemplo, aumentando el metabolismo o excreción del compuesto, y alcanzando un nivel de adaptación en el que el compuesto no tenga un efecto adverso.

➤ *Ruta de exposición*

Según la ruta por la que un compuesto sea absorbido, dependerá la facilidad de absorción de ese compuesto y su facilidad para ser metabolizado. Generalmente, los compuestos son más tóxicos por ruta oral que dérmica, y se observan diferentes efectos dependiendo de la ruta de exposición.

➤ *Factores genéticos. Diferencias entre especies*

La presencia o ausencia de una determinada ruta metabólica, como el buen funcionamiento de los sistemas de reparación, están determinados por la constitución genética del individuo. Los polimorfismos genéticos pueden afectar la capacidad de un organismo para biotransformar un compuesto exógeno, lo cual afecta a su toxicidad. Por ejemplo, los organismos con niveles bajos de colinesterasa sérica son más sensibles a ciertos insecticidas organofosforados.

➤ *Sexo y otros factores endocrinos*

Se ha observado que el efecto de algunos tóxicos puede ser diferente dependiendo del sexo. Algunas de estas diferencias se pueden explicar sobre la base de las diferencias hormonales entre los dos sexos, y los efectos hormonales sobre los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción, especialmente presencia o ausencia de testosterona o estrógeno. En humanos, las diferencias en el metabolismo de los xenobióticos están menos influenciadas por el sexo que en algunos animales de experimentación como las ratas. Entre ratas macho y ratas hembra existen diferencias en la susceptibilidad a determinados tóxicos y en los valores de LD<sub>50</sub>. Esto es porque las ratas macho adultas tienen tasas metabólicas más altas para muchos compuestos, lo que las hace más susceptibles. Aunque también hay sustancias que causan más toxicidad en las hembras, como los insecticidas azinfosfometilo y paratión, que son activados rápidamente produciendo derivados que aumentan la toxicidad.

➤ *Estado fisiológico*

La edad es un factor determinante en la toxicidad, ya que va relacionada con la capacidad metabólica del individuo. Los animales jóvenes y los niños son generalmente más susceptibles que los adultos a los venenos presentes en los alimentos. Una de las razones es que comen más en relación con su peso, por lo que la dosis recibida es mayor; otra razón es la deficiencia en varias enzimas de desintoxicación. Ciertas sustancias, sobre todo los estimulantes del sistema nervioso central, son menos tóxicas para los niños, debido a la ausencia de ciertas enzimas de bioactivación. Así, por ejemplo, se conoce que la LD<sub>50</sub> para determinados tóxicos es 20 veces superior en ratas recién nacidas que en las adultas. Quizás sea este el motivo de la protección de los bebés de la contaminación con DDT de la leche materna.

Otro aspecto negativo en los organismos jóvenes es la gran capacidad de absorción y la mala excreción que presentan.

En contraste, los individuos viejos, animales y humanos, también son más susceptibles a ciertas sustancias. Esto se debe a la disminución de la capacidad de desintoxicación y a la disminución de la excreción renal. El incremento de grasa y la pérdida de agua corporal pueden cambiar la distribución de los tóxicos.

Un estado fisiológico especial a tener en cuenta es el embarazo, durante el cual la actividad de varias enzimas de biotransformación y la excreción renal disminuyen, incrementando la toxicidad de algunos agentes. Las enfermedades hepáticas disminuyen la capacidad de biotransformación; mientras que otras enfermedades tales como el hipertiroidismo y el hiperinsulinismo, entre otras, pueden modificar el efecto de ciertos tóxicos.

➤ *Nutrición*

En parte, estamos muy influenciados por lo que comemos. La influencia de los alimentos sobre la toxicidad se puede deber a: alteraciones en la velocidad de absorción, cambios en las tasas metabólicas y de desintoxicación y modificaciones de la eliminación renal. Así, por ejemplo, la deficiencia en ácidos grasos, en proteínas y el exceso de hidratos de carbono, reduce la actividad de las oxidasas de función mixta (OFM) en los microsomas, que es una de las rutas más importantes de biotransformación de tóxicos. Además, la falta de proteínas no activará los enzimas hepáticos necesarios para metabolizar algunos productos, o bien los alimentos muy grasos podrán aumentar la ingesta de plaguicidas organoclorados, ya que como se ha explicado anteriormente se almacenan en el tejido adiposo.

➤ *Otros factores*

La temperatura ambiental puede aumentar la absorción de los plaguicidas, incrementando su toxicidad. El incremento y la disminución de la temperatura corporal incrementa la vida media de los tóxicos en el organismo.

Otros factores que también pueden influir en la toxicidad de un plaguicida son las exposiciones a la radiación, la presión y la altitud (a más altitud más toxicidad), los ritmos circadianos, las diferencias estacionales, la humedad, etc.

### 1.3.5. Toxicología genética

Un gran número de agentes ambientales son mutágenos capaces de interactuar con el DNA, directa o indirectamente, provocando cambios en la secuencia de bases y, por tanto, alterando la información contenida en el material genético, contribuyendo así, a aumentar la incidencia de enfermedades de etiología genética. Como fuente de mutágenos ambientales originados por el hombre habría que destacar los compuestos químicos de uso agrícola (plaguicidas), los aditivos alimentarios, las emisiones de la combustión de combustibles fósiles, etc.

Debido a la continua exposición a multitud de agentes que dañan el material genético, la mayoría de organismos han desarrollado mecanismos de reparación de las lesiones producidas por los mutágenos en el DNA. Sin embargo, el daño potencial que pueden sufrir los organismos al estar expuestos a los diferentes productos debería controlarse.

Si se tuvieran los valores de la exposición a agentes genotóxicos y los cambios que estos hubieran provocado, se podría estimar la probabilidad de padecer una determinada enfermedad genética. Pero como este no es el caso ideal, se emplean métodos comparativos en el análisis de los agentes genotóxicos. La disciplina encargada de evaluar los efectos de las exposiciones con riesgo genotóxico es la Toxicología Genética. En pocas palabras, esta disciplina se encarga de detectar las genotoxinas, agentes capaces de actuar directa o indirectamente sobre el DNA o sobre moléculas asociadas (proteínas que intervienen en la reparación del DNA o en la segregación cromosómica) y que producen alteraciones (mutaciones) en el material genético a concentraciones no tóxicas o subtóxicas (Kirsch-Volders y col., 1984). Los cambios inducidos por los agentes genotóxicos pueden causar la muerte de la célula o inducir alteraciones transmisibles a la siguiente generación celular (mutación somática) o a la descendencia (mutación germinal) (Mendelson y col., 1994).

#### 1.3.5.1. Los inicios de la toxicología genética

Los principios de la herencia descubiertos por Gregor Mendel provocaron un creciente interés por la actividad investigadora en el campo de la genética. Esta investigación se sirvió de mutantes espontáneos que se encontraron en estado salvaje o en el laboratorio. Uno de los mayores acontecimientos en la historia de la genética fue el descubrimiento de que la radiación ionizante causaba un incremento en las mutaciones, es decir, cambios permanentes

en el material genético, generalmente desfavorables. Concretamente fue Herman J. Muller (1927) quien demostró por primera vez que los rayos X (RX) inducían mutaciones recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster*. Así pues, los RX se convirtieron en el primer ejemplo de mutágeno conocido.

A partir de entonces, los experimentos sobre mutagénesis aumentaron. Antes de 1940 se comenzó a especular sobre la actividad mutagénica de los productos químicos, pero no se llegó a una demostración definitiva hasta la Segunda Guerra Mundial, cuando Charlotte Auerbach y J.M. Robson demostraron que un agente, el gas mostaza, también se comportaba como mutagénico en *Drosophila melanogaster*. Investigaciones paralelas de Oehlkers (1943) en Alemania y de Rapoport (1946) en la Unión Soviética encontraron que otros compuestos químicos (como el uretano y el formaldehído) inducían aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas, respectivamente. Unos años más tarde, la lista de productos químicos clasificados como mutagénicos había aumentado considerablemente.

La investigación genética básica comenzó a interesarse por los mutágenos químicos como un buen sistema para obtener muchos mutantes nuevos. Asimismo, también la agricultura, la ganadería y la industria, se interesaron por ellos con el fin de causar variaciones genéticas en organismos de interés.

A partir de los años 50 una serie de investigadores, junto con un sector de la opinión pública, empezaron a percibir que las mutaciones inducidas por los agentes ambientales podrían causar daños genéticos irreversibles en el hombre. Este riesgo para la salud es especialmente preocupante ya que las consecuencias de las exposiciones a mutágenos pueden no ser evidentes hasta después de largos periodos desde el momento de la exposición.

A partir de entonces, uno de los objetivos de la Toxicología Genética fué desarrollar sistemas para la identificación de los mutágenos, con el fin de minimizar su exposición.

## **1.4. Proceso de evaluación del riesgo genético**

La evaluación del riesgo que resulta de la exposición a agentes genotóxicos estuvo durante muchos años basada en el estudio del riesgo en las enfermedades heredables transmitidas por mutaciones en la línea germinal y en el riesgo de desarrollar cáncer por la inducción de mutaciones en las células somáticas.

Como es bien conocido, muchos de los efectos adversos para la salud son el resultado del daño genético inducido por agentes genotóxicos, tanto en las células somáticas como en

las germinales. Si el daño genético se produce en la línea somática, entre otros efectos, puede derivar en cáncer (Bishop, 1987; Aust, 1991); contribuir al envejecimiento prematuro (Rattan, 1991; DeMarini y col., 1994); producir enfermedades vasculares, etc. Asimismo, si el daño se induce en células germinales puede afectar tanto a los individuos expuestos (efectos sobre la fertilidad), como a su descendencia, que verá aumentado el riesgo de desordenes genéticos, tanto monogénicos como poligénicos.

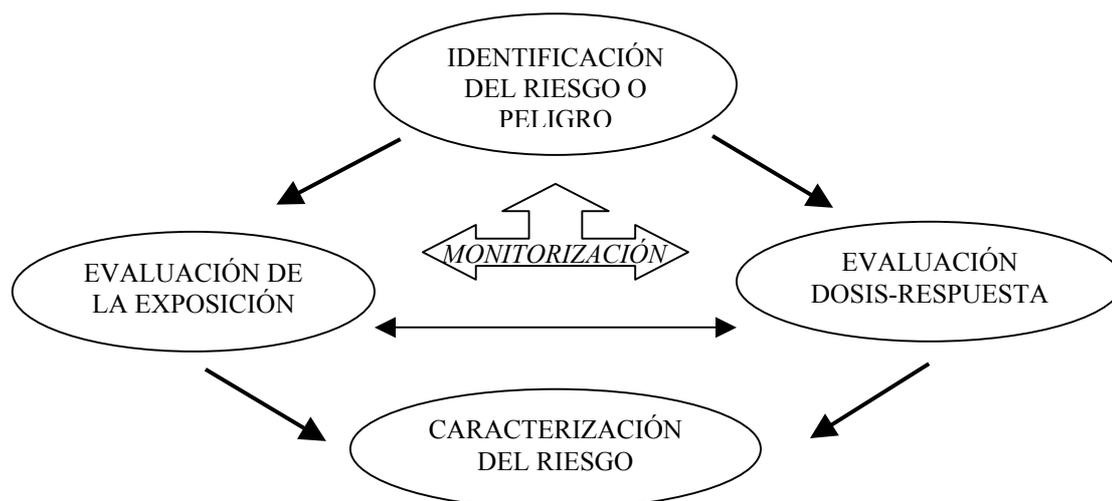
Por consiguiente, está claro, el gran impacto en la salud humana que las enfermedades genéticas presentan, y que hay que dedicar todos los esfuerzos posibles para minimizar la exposición a los mutágenos ambientales que pueden conducir al desarrollo de las mismas.

Un elevado porcentaje de los productos químicos liberados al medio ambiente no han sido evaluados de manera adecuada en relación a su actividad mutagénica. Por lo tanto, es esencial identificar estos productos para poder así determinar el riesgo genético que estos presentan para los seres vivos, incluido el hombre.

En el contexto de salud humana, el riesgo ha sido expresado como la probabilidad o posibilidad de aparición de efectos indeseables, resultado de la exposición a un contaminante. Se puede hacer una distinción entre riesgo absoluto, o riesgo en exceso debido a una exposición; y riesgo relativo, que compara el riesgo en la población expuesta y en la población no expuesta. En forma matemática se puede expresar como:

Riesgo = Peligro  $\times$  Exposición, donde si aumenta la exposición aumenta también la probabilidad del daño.

Para evaluar las exposiciones a plaguicidas y cualquier otro producto sospechoso de causar algún tipo de daño o efectos adversos sobre la salud se siguen una serie de pasos, que constituyen lo que se conoce como evaluación del riesgo. La **evaluación del riesgo** después de diferentes estudios permite determinar la naturaleza, magnitud y probabilidad de sufrir un efecto adverso para la salud como exposición a una o varias sustancias y es la base a partir de la cual se regulan los niveles de seguridad para exposiciones a productos químicos en el medio ambiente y se desarrollan programas de prevención química, con el objetivo de minimizar la exposición y reducir el riesgo. La evaluación del riesgo es una búsqueda intensiva que comprende cuatro etapas diferenciadas que se complementan (Figura 3).



**Figura 3.** Proceso de la evaluación del riesgo (Brusick, 1994).

La primera etapa tiene como objetivo la **identificación del peligro**. Engloba la evaluación de sistemas, industrias, procesos y otras actividades que utilizan materiales potencialmente tóxicos, como los plaguicidas, y determina cuáles de ellos poseen un *riesgo potencial* para la salud o para el medioambiente. Este paso no determina ni la magnitud de la respuesta ni la probabilidad de una exposición; es, esencialmente, una evaluación cualitativa del potencial tóxico/genotóxico de una determinada sustancia, y se basa en la información proveniente de diferentes bioensayos y en la magnitud de las posibles exposiciones. Nos da una idea de la capacidad de causar daño de un determinado agente y de su disponibilidad en el medio. La evaluación de riesgo de una sustancia sólo empieza después de que la evaluación del peligro haya aportado evidencias suficientes que indiquen que pueden ocurrir efectos biológicos adversos en las poblaciones potencialmente expuestas. Aunque un producto sea por sí mismo muy peligroso, si no hay exposición al mismo o la exposición es muy débil, el riesgo es nulo o muy pequeño. Por ejemplo, si nos referimos a las dioxinas, consideradas una de las sustancias químicas más tóxicas según la relación dosis-respuesta, resulta que la exposición potencial es tan poco probable y pequeña que, a efectos prácticos, el riesgo es despreciable.

Los siguientes pasos, evaluación de la exposición y la caracterización de la dosis-respuesta, son prácticamente simultáneos en el tiempo y no importa el orden ya que se complementan.

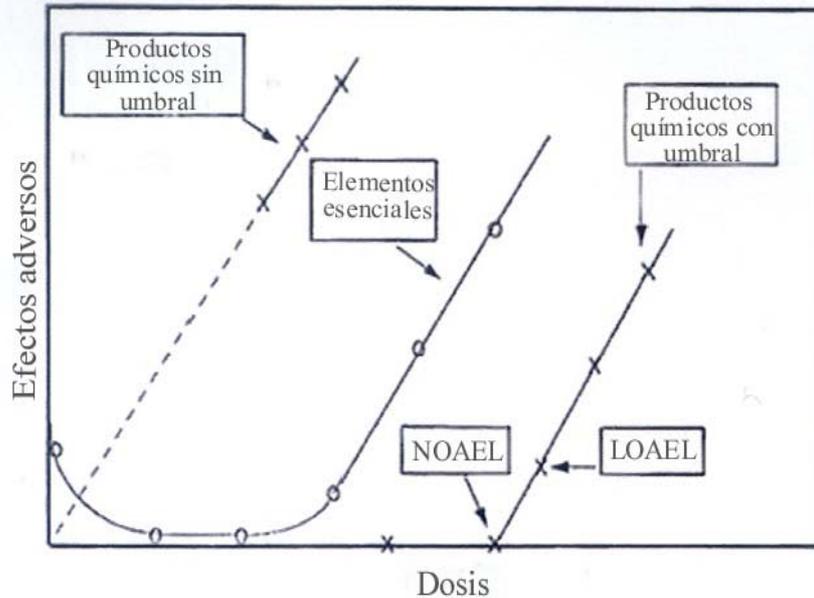
La **evaluación de la exposición**, evalúa las poblaciones que están o pueden estar expuestas a los agentes peligrosos y los niveles de exposición esperados y/o encontrados, como resultado de situaciones rutinarias o accidentales. Generalmente, comienza con la localización del agente en el medio y se estima su transporte y acceso a las especies diana. Es un análisis crucial ya que identifica la fuente que origina las genotoxinas, y permite controlar el riesgo combatiendo el origen. Considera las diferentes rutas de exposición y la cantidad de producto que entra en el organismo. Para llevar a cabo esta fase se puede recurrir al análisis de las fuentes de exposición (p. ej., niveles de genotoxinas en el agua de consumo o en el aire del lugar de trabajo) o a pruebas de laboratorio (p. ej., análisis de sangre u orina de los individuos expuestos). Los análisis del aire y/o del agua proporcionan bastante información, ya que dan a conocer los niveles de contaminación a los que los individuos están expuestos. Sin embargo, sólo reflejan la concentración en el momento de la prueba y no se pueden utilizar para cuantificar el tipo o la intensidad de anteriores contaminaciones. Son de interés las estimas de contaminación en el pasado ya que, de este modo, se puede analizar el transporte y transformación de las sustancias en el medio ambiente y cuantificar las variaciones espaciales y temporales de las mismas.

Otro tipo de medición de exposiciones pasadas puede ser, por ejemplo, el análisis de peces o de sedimentos lacustres, que nos pueden orientar sobre el comportamiento de las sustancias químicas persistentes que están y estuvieron en el agua de los lagos.

El análisis de los fluidos corporales de los individuos probablemente expuestos proporciona la mejor medida de la exposición directa, aunque no permite obtener buenas medidas de exposiciones anteriores, debido al equilibrio entre la absorción y la eliminación de los distintos contaminantes.

Para poder cuantificar el riesgo se necesita establecer una relación entre la dosis y el efecto a nivel individual y una relación entre la dosis y la respuesta en las poblaciones. Ambas proporcionan información relevante sobre cómo aumenta el riesgo en función de un incremento de la exposición.

La etapa de **caracterización de la relación dosis-respuesta** tiene como objetivo evaluar la capacidad de alteración (o mutación del DNA) en función de la dosis del agente aplicado. Es decir, se evalúa la relación dosis-respuesta para determinar la correlación entre la intensidad de la exposición y la probabilidad de efectos sobre la salud o el medio ambiente, estableciendo las denominadas curvas dosis-respuesta. Las curvas pueden presentar variedad de formas (Figura 4).



**Figura 4.** Posibles curvas dosis-respuesta de las sustancias químicas (según H. Galal-Gorchev) [www.who.int/pes/training\\_material/hazardous\\_chemicals](http://www.who.int/pes/training_material/hazardous_chemicals) .

Los elementos esenciales son un caso especial en cuanto a la relación dosis-respuesta. Así, por ejemplo, para elementos como el hierro o el yodo, existe una dosis que suple los requerimientos nutricionales del organismo. Por debajo de esta dosis, se observan efectos adversos debidos a deficiencias nutricionales (anemia y bocio, por carencia de hierro y yodo respectivamente); mientras que por encima de la dosis nutricional del elemento esencial, este pasará a ser tóxico con efectos adversos (hemocromatosis y bocio, respectivamente).

Para la mayoría de productos químicos, las dosis por debajo del umbral no presentan ningún efecto tóxico. El **umbral** se define como la concentración o dosis por encima de la cual pueden ocurrir efectos adversos bajo determinadas condiciones de exposición. Este valor es básico en prevención y se deriva del nivel máximo en el cual no se observan efectos adversos o NOAEL (*non observed adverse effect level*). El NOAEL se suele expresar en mg o  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal y por día, y para su determinación se requieren ensayos de corta y larga duración y estudios bioquímicos, entre otros.

En algunos experimentos, debido a que la selección de dosis debería ser muy elevada, se determina la dosis más baja a la que se observan efectos adversos o LOAEL (*lowest observed adverse effect level*).

Para algunos productos cancerígenos o mutagénicos, no es posible demostrar una dosis umbral, ya que existe una probabilidad de daño y riesgo para cualquier nivel de exposición. Es por ello que se clasifican como productos químicos sin umbral.

Se necesitan datos de mutagenicidad dosis-respuesta en humanos o en mamíferos *in vivo* para poder determinar el riesgo humano a diferentes dosis. Sin embargo, cuando esto no es factible se puede recurrir a los estudios *in vitro* para estimar la potencia genotóxica o mutagénica.

La cuarta y última etapa en el proceso de evaluación del riesgo cuantifica los diferentes resultados obtenidos para hacer una **caracterización del riesgo** y determinar la exposición en un determinado lugar y estimar el riesgo o probabilidad de aparición de cualquier efecto adverso en la población como consecuencia de la exposición a las genotoxinas.

La evaluación del riesgo es un proceso complejo que depende de la calidad de la información científica disponible. Si la evaluación del riesgo de un compuesto es suficientemente amplia y precisa, puede ser la base para prevenir los daños que éste podría causar o estar causando. La evaluación es más fiable para determinar riesgos agudos que se manifiestan en un periodo corto de tiempo después de la exposición. La duda e incerteza se van incrementando cuanto mayor es el tiempo transcurrido entre la exposición y la aparición de los síntomas. En algunos casos, las dificultades de evaluación que van surgiendo hacen imposible llegar a conclusiones contundentes sobre el riesgo. Sin embargo, existen principios toxicológicos bien establecidos y medidas de salud laboral, que son útiles para reducir a niveles mínimos el riesgo genotóxico en el lugar de trabajo.

Podemos concluir diciendo que la evaluación del riesgo genético es un proceso, generalmente útil, pero que no siempre permite dar respuesta a todas las preguntas que nos formulamos.

La manera más eficiente de controlar el daño es una monitorización constante de la población general y de los individuos expuestos, e ir observando posibles efectos sobre la salud, debidos a la genotoxicidad. La exposición se puede mantener en unos niveles seguros (establecidos como estándar) mediante una adecuada educación, el uso correcto de las medidas de protección y unas prácticas adecuadas. Finalmente, las regulaciones definen las diferentes medidas que pueden ayudar a prevenir el daño y establecen su cumplimiento.

### 1.4.1. Indicadores de riesgo genético

Para valorar los diferentes tipos de daño, se pueden emplear tests de toxicidad aguda, subaguda o crónica.

Si queremos saber el daño asociado con una exposición única, se realizará un test de toxicidad aguda, determinando la magnitud de la dosis más pequeña que produce efectos adversos.

Dependiendo de las dosis implicadas, aplicaremos tests de toxicidad subaguda o crónica. Estos estudios consideran los efectos de diferentes dosis repetidas a lo largo del tiempo y valoran efectos nocivos provocados. Entre ellos podemos destacar los estudios bioquímicos y biofísicos, los estudios toxicológicos en cultivos celulares, y los tests de mutagenicidad y carcinogenicidad.

La utilización de métodos de criba (*screening*) de corta duración para detectar mutágenos y carcinógenos, es esencial para poder evaluar el riesgo. Así, demostrar que una determinada sustancia es una potente genotoxina en diferentes organismos y líneas celulares, es una evidencia de su posible genotoxicidad en humanos.

Actualmente se dispone de una batería de herramientas que pueden ser útiles en los diferentes estadios de la evaluación del riesgo. En la primera etapa de la evaluación, que es básica, y que corresponde a la identificación del riesgo, tal como se ha comentado anteriormente, existen diferentes técnicas como son las citogenéticas.

Monitorizar la actividad genotóxica directamente en el medio ambiente es muy útil para la identificación del riesgo, ya que no requiere conocimientos específicos sobre el producto genotóxico que, como suele ocurrir con los plaguicidas, generalmente forma parte de una mezcla compleja de compuestos.

Para detectar daño en el DNA que sea indicativo de riesgo genético, podemos estudiar las células de la línea germinal (estudiadas durante décadas, ya que las mutaciones en las mismas son causante de enfermedades y alteraciones genéticas en las futuras generaciones), y la línea somática, en donde las mutaciones están implicadas en el cáncer y el envejecimiento, entre otros efectos adversos para la salud. Los conocimientos sobre el cáncer van incrementando a diario con la aplicación de nuevas técnicas de estudio y, aunque los mecanismos exactos de la inducción de cáncer no son por ahora completamente conocidos, existen claras evidencias que los sucesos mutacionales están ciertamente implicados en el proceso multifactorial de la carcinogénesis (DeMarini y col., 1994). También es importante

recalcar que las mutaciones somáticas no sólo están relacionadas con acontecimientos tumorales, sino también con otras patologías como el incremento de placas ateroscleróticas asociadas a las enfermedades cardiovasculares, las cataratas seniles, y las metaplasias de estómago e intestino (Hartman, 1983; ICPEMC, 1990).

### **1.4.2. Biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos**

Los efectos negativos sobre la salud que se han producido como consecuencia de una exposición a un factor ambiental, pueden expresarse inmediatamente o tardar años en manifestarse. Son estos últimos sobre los que hay que hacer especial hincapié para poder identificar el problema antes de la aparición de los síntomas, ya que los individuos estarán expuestos a los agentes nocivos durante mucho tiempo antes de que se manifiesten los efectos adversos. Es aquí donde entran en juego los estudios de biomonitorización, que intentan establecer la relación entre factores ambientales y enfermedad, detectando alteraciones iniciales en fases todavía no malignas. Algunos estudios de biomonitorización se basan en el análisis de los compuestos químicos o de sus metabolitos en muestras de sangre, orina, pelo, etc.; otros en evaluar el riesgo de la exposición mediante la determinación de las posibles alteraciones, tanto físicas como bioquímicas, inducidas en los individuos. En el caso de los compuestos genotóxicos, la biomonitorización se amplía al uso de los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad, para poder realizar una evaluación del daño a nivel del material genético.

Los estudios de biomonitorización en poblaciones expuestas a algún agente sospechoso de causar daño genético son un complemento a los estudios epidemiológicos, buscando una correlación entre el factor de riesgo y un incremento en la incidencia de cáncer u otra enfermedad genética. Así pues, la finalidad de los estudios de biomonitorización es la prevención de la enfermedad mediante la identificación de la causa ambiental que la provoca.

La biomonitorización, como parte del proceso de evaluación del riesgo genético, presenta dos objetivos: detectar la exposición a genotóxicas ambientales y determinar sus efectos genotóxicos *in vivo* (Albertini, 1994).

## 1.5. Biomarcadores como indicadores de riesgo genético

El término biomarcador hace referencia a cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, ya sea químico, físico o biológico (WHO/IPCS, 1993). Incluye diferentes dianas biológicas que se utilizan para evaluar el riesgo mutagénico y cancerígeno. Para mutágenos/cancerígenos, estas dianas se deben ordenar en relación con las diferentes etapas del proceso que conduce al desarrollo del cáncer, proceso complejo, que conlleva diferentes etapas. Para que se desarrolle el cáncer inducido, el agente cancerígeno ha de estar en el medio y posteriormente entrar en el organismo y, si es necesario, metabolizarse para reaccionar con diferentes macromoléculas (incluyendo el DNA). Al final, si se induce un daño genético, este puede ser visualizado mediante técnicas citogenéticas o moleculares.

La identificación de marcadores de genotoxicidad del producto(s) sospechoso(s) de causar daño es útil ya que puede definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención de la enfermedad, que es el objetivo final de la biomonitorización. Para llegar a este objetivo, se debe pasar básicamente por dos etapas: a) detectar exposiciones humanas a cancerígenos ambientales; b) determinar efectos genotóxicos *in vivo*.

Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales. Según Albertini y col. (1996), los biomarcadores se pueden dividir en:

a) **Biomarcadores de exposición**, detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a diferentes niveles. Localizan la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos (o sus metabolitos) en tejidos y secreciones corporales (p. ej. sangre, orina, heces). Si el compuesto ha penetrado y ha interactuado con el material genético (mutágenos/ carcinógenos electrofílicos), se puede detectar por la aparición de aductos en proteínas (albúmina y hemoglobina) y en DNA (células de la línea blanca, orina, tejidos), así como por la formación de SCE, reflejando una exposición primaria. Un resultado positivo a este nivel no indica necesariamente consecuencias adversas, ya que parte del daño genotóxico primario puede ser reversible.

Para detectar la exposición a plaguicidas se han utilizado diferentes biomarcadores tales como: la determinación directa de DDE en tejidos de peces (Mora y col., 2001); de HCB y PCB en suero (Sala y col., 2001); depresión de los niveles de colinesterasa (Anwar 1997; Nigg y Knaak, 2000), y detección de aductos en hemoglobina (Anwar, 1997), entre otros. El

trabajo de Maroni y col. (2000) revisa las distintas técnicas utilizadas para detectar la exposición a los diferentes plaguicidas, ya sea midiendo directamente el compuesto en cuestión (como los herbicidas fenoxiacéticos, que casi no se metabolizan en mamíferos), o los metabolitos que se forman, tanto en sangre como en orina.

b) **Biomarcadores de efecto**, miden el daño genético una vez que ya ha sido procesado por el organismo. Las lesiones en el DNA, una vez procesadas, pueden convertirse en cambios permanentes en las células (mutaciones). Como son efectos fijados, reflejan daños correspondientes a exposiciones pasadas, por lo que son útiles para detectar daño acumulativo. Tradicionalmente, los biomarcadores de efecto han sido los más utilizados en los estudios de biomonitorización humana. Se pueden dividir en informativos (no específicos) y en relevantes para algunas enfermedades, es decir, aquellos biomarcadores que determinan cambios cromosómicos o genómicos en lugares críticos relacionados con el desarrollo de una enfermedad (ver Tabla 1). En este punto, hay que plantearse si realmente estamos hablando de biomarcadores de efecto o de indicadores tempranos de enfermedad.

	DAÑO CROMOSÓMICO	DAÑO GÉNICO
<b>INFORMATIVOS</b>	Aberraciones cromosómicas <b>Micronúcleos</b> Intercambios entre cromátidas hermanas Roturas DNA (Cometa)	Mutaciones puntuales ( <i>hprt, gpa, pkr, F8,...</i> ) Deleciones Recombinaciones Amplificaciones
<b>RELEVANTES ENFERMEDAD</b>	Alteraciones específicas	Mutaciones en: protooncogenes genes supresores de tumores genes de reparación

**Tabla 1.** Biomarcadores de efecto.

Nos podemos preguntar: ¿qué biomarcador es el más adecuado?. La respuesta dependerá del objetivo que nos planteemos.

En el presente trabajo se pretende estudiar si la exposición a determinados genotóxicos, concretamente plaguicidas, induce un incremento del daño genético, utilizando el ensayo de micronúcleos como biomarcador de efecto.

Para investigar si la exposición a plaguicidas deriva o no en daño genotóxico, se han llevado a cabo numerosos estudios al respecto. Se han utilizado distintos biomarcadores de efecto tales como CA, SCE, MN y SCGE (Saleha Banu y col., 2001), entre otros. Una relación detallada y bastante exhaustiva de los estudios de biomonitorización que han evaluado el daño genotóxico de los plaguicidas se muestra en el Anexo 2. Se puede observar que hay estudios que no encuentran incremento de daño, mientras que otros sí, y que la tarea de la monitorización de poblaciones humanas expuestas a plaguicidas es una tarea difícil por la diversidad de factores que entran en juego, especialmente en el campo de la exposición ocupacional, en donde generalmente no se emplea un único producto sino mezclas de varios de ellos.

c) **Biomarcadores de susceptibilidad**, se basan en identificar aquellas diferencias interindividuales que hacen que un individuo sea más susceptible o responda de manera diferente, con un mayor riesgo para su salud, frente a diferentes exposiciones ambientales. La capacidad de reparación del daño genético también está determinada genéticamente y aquellos individuos deficientes en los mecanismos de reparación sufrirán mayores niveles de daño genético irreversible, incluso frente a exposiciones de baja intensidad. Otros indicadores de susceptibilidad que deben ser considerados son las diferencias inmunológicas (Richeldi y col., 1993) y factores nutricionales, tales como las deficiencias en folato (Branda y col., 1991) o vitamina C (Aidoo y col., 1994), que pueden incidir en la existencia de mayor daño genético.

Se ha demostrado que distintos genes polimórficos como los que codifican para el citocromo P450, las glutatión S-transferasas (*GST*) y los genes *PON* son algunos de los responsables del metabolismo de los plaguicidas (Sultatos, 1992, 1994; Furlong y col., 2000). De los *loci* que codifican estas enzimas metabolizadoras existen múltiples alelos, lo que supone una susceptibilidad individual delante de una exposición a un compuesto. El estudio de Au y col. (1999), sugiere que los agricultores que presentan el alelo desfavorable (menor metabolización) o nulo, presentan más efectos biológicos adversos.

Las enzimas conocidas como citocromos P450 son una familia multigénica, formada por diversas monooxigenasas monoméricas que catalizan el metabolismo oxidativo de la

mayoría de compuestos químicos endógenos (esteroides, ácidos grasos, etc.), y xenobióticos (tóxicos, fármacos, etc.). Participan en la fase I del metabolismo, normalmente haciendo más hidrofílicos a los sustratos y facilitando su excreción. Así, por ejemplo, estas se han relacionado con la detoxificación de organofosforados (Eaton, 2000; Tang y col., 2001); aunque algunas veces, dependiendo de su isoforma, pueden actuar de activadores de procarcinógenos, transformando los compuestos en electrofílicos y altamente reactivos con el DNA (Tang y col., 2001).

Las glutatión-S-transferasas, son otro grupo de enzimas polimórficas, que intervienen en la detoxificación de los metabolitos electrofílicos originados en la fase I del metabolismo, y también protegen del daño oxidativo (Berhane y col., 1994). Las GST incorporan un grupo glutatión reducido (GSH) a la molécula, minimizando su potencial tóxico (Smith y col., 1995). Las enzimas más estudiadas de esta familia son la GSTM1 y la GSTT1. Ambas presentan variantes genotípicas nulas que determinan la ausencia total de la enzima. Por parte Hayes y Pulford (1995) sugirieron que la deficiencia en un isoenzima GST se podría compensar con otras isoformas y rutas metabólicas alternativas. Esto podría ser la respuesta a los numerosos resultados conflictivos sobre la asociación entre los polimorfismos GSTs y la predisposición al cáncer (Hirvonen, 1997). Los genotipos GSTM1 y GSTT1 nulos se han asociado con incrementos en la frecuencia de algunos cánceres (Rebbeck, 1997; Toruner y col., 2001; Kerb y col., 2002; Zheng y col., 2002), con un mayor incremento de daño citogenético (Šram, 1998; Au y col., 1999) y con una mayor acción genotóxica *in vitro* de algunos compuestos (Norppa y col., 1995; Ollikainen y col., 1998) y, aunque existe mucha controversia al respecto, es útil utilizarlos como biomarcadores de predisposición, a ser posible junto con otros biomarcadores de susceptibilidad metabólica, ya que las posibles interacciones pueden aportar mayor información y reflejar mejor la realidad.

Otras enzimas que están relacionadas con la metabolización de los plaguicidas son las paraoxonasas (PON), que actúan en la misma fase que las GST, y se ha comprobado su acción desintoxicante frente a compuestos organofosforados (Furlong y col., 2000; Brophy y col., 2001).

### **1.5.1. Alteraciones citogenéticas como biomarcadores de efecto**

Muchas de las alteraciones, espontáneas o inducidas, que se producen en el DNA, se traducen en roturas y pérdidas cromosómicas. Sea cual sea el origen, algunas alteraciones se pueden reparar y volver a su estado inicial; si no se reparan o se reparan incorrectamente, provocan diferentes tipos de anomalías, algunas de ellas detectables mediante diferentes técnicas citogenéticas y/o moleculares. Las técnicas citogenéticas más utilizadas para detectar cambios cromosómicos estructurales y numéricos, para evaluar el riesgo genético de determinadas poblaciones expuestas a mutágenos, son las de análisis de CA y MN. Distintos datos epidemiológicos y experimentales han puesto en evidencia un aumento de las alteraciones cromosómicas como resultado de la exposición a agentes genotóxicos, así como un incremento en la incidencia de cáncer. Los estudios de Hagmar y col. (1998a) demostraron la existencia de una mayor incidencia de cáncer en aquellos individuos que con anterioridad presentaban frecuencias elevadas de aberraciones cromosómicas; Knudson (1993) relacionó la inactivación de genes supresores de tumores con alteraciones cromosómicas; mientras que Mitelman y Heim (1990), entre otros, han demostrado que la mayoría de células neoplásicas presentan niveles elevados de alteraciones cromosómicas.

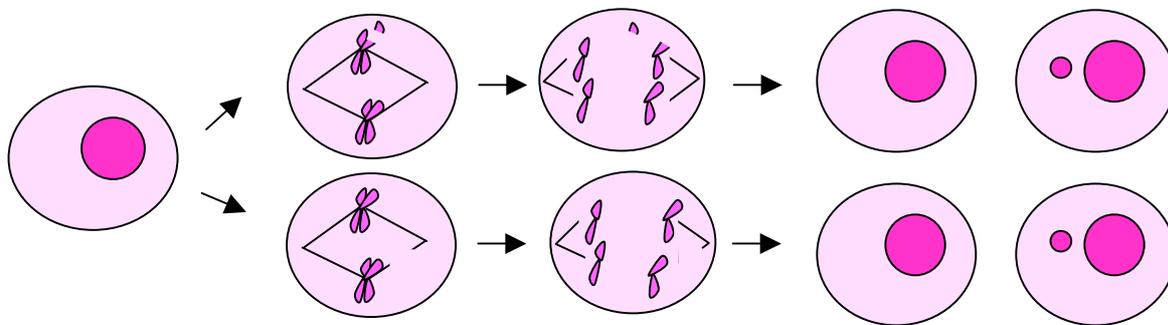
De todo ello se desprende la importancia que tiene el localizar y cuantificar las alteraciones cromosómicas, ya que pueden ser muy útiles para descubrir efectos tempranos de daño genotóxico que pueden desembocar más adelante en una enfermedad grave, y así, convertirse en una herramienta efectiva no sólo para la evaluación del riesgo, sino también para su predicción.

#### **1.5.1.1. El ensayo de micronúcleos: aspectos generales**

El ensayo de micronúcleos es uno de los tests de genotoxicidad más frecuentemente utilizado en mamíferos y actualmente se está empleando en la evaluación de las consecuencias genotóxicas de las exposiciones ambientales y laborales a mutágenos (Vaglenov y col., 2001; Benova y col., 2002; Pitarque y col., 2002).

Los micronúcleos (MN), como su nombre indica, son masas de cromatina que tienen la forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Los MN se pueden originar de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados agentes (clastogénicos y/o aneugénicos), resultando de la pérdida durante la

división celular de fragmentos cromosómicos y/o cromosomas enteros (Fenech y Morley, 1985a). Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, al no poderse unir al huso mitótico en la anafase. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos. Si el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro, al centrómero o al huso mitótico, lo más probable es que se produzca un retraso mitótico y un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que los cromosomas rezagados se pierdan durante la anafase y se rodeen de membrana nuclear, como ocurre con los fragmentos cromosómicos, originando también micronúcleos (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema general de la formación de MN.

Conviene destacar dos puntos relevantes sobre los MN:

-Se requiere una división celular después del daño para que se formen y puedan ser visualizados (Fenech y Morley, 1985a; Fenech, 1997).

-Los MN pueden ser consecuencia tanto de agentes clastogénicos como aneugénicos.

El hecho de que se puedan identificar los efectos producidos por agentes clastogénicos y aneugénicos permite al ensayo de MN detectar diferentes tipos de lesiones, como por ejemplo:

-Roturas de doble cadena del DNA.

-Roturas de cadena simple del DNA, mal reparadas o sin reparar. Según Surrallés y col. (1995a), la mayoría de MN derivan de la mala reparación de diferentes lesiones, por lo que el ensayo de MN también se podría utilizar para evaluar la eficacia de la reparación.

-Alteraciones en las proteínas implicadas en la segregación cromosómica.

-Diferentes aberraciones cromosómicas, que pueden dar lugar a MN.

-Apoptosis, mediante la frecuencia de núcleos condensados (Kirsch-Volders, 1997).

Para identificar el contenido de los MN y poder así determinar el mecanismo de inducción, se utilizan técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*), pudiendo identificar la región cromosómica que se ha perdido o roto. Estudios utilizando sondas específicas de centrómero, demuestran que aproximadamente el 50% de los MN espontáneos son consecuencia de pérdidas cromosómicas y la otra mitad son fragmentos acéntricos (Eastmond y Tucker, 1989; Fenech y Morley, 1989; Surrallés y col., 1995b).

El significado biológico de los MN dependerá de la región involucrada en la rotura y del cromosoma(s) que se pierda. Si bien, alguna rotura puede provocar muerte celular, las aneuploidías, tanto germinales como somáticas, se relacionan con alteraciones genéticas mucho más graves implicadas en abortos espontáneos, retraso mental y cáncer (Hassold y col., 1996; Hagmar y col., 1998b).

El ensayo de MN se utiliza tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, y se lleva a cabo con diferentes especies. La formación de MN se estudia habitualmente en modelos animales de laboratorio. Así, el test de MN en eritrocitos de médula ósea de ratón o sangre periférica, es desde 1983 el ensayo *in vivo* más utilizado rutinariamente en la evaluación genotóxica de los productos químicos, estando incluido dentro de la batería de ensayos de toxicología (*OECD, Guideline for the testing of chemicals*, 474, 1997).

Se incluye en los ensayos de genotoxicidad por presentar una serie de ventajas generales:

-Es una técnica relativamente rápida, sencilla y con un coste reducido.

-Permite trabajar con diferentes tipos celulares (células sanguíneas, células epiteliales, semen,...) y utilizar células interfásicas, lo que permite analizar un elevado número de células sin utilizar métodos demasiado invasivos.

-Permite valorar efectos pasado bastante tiempo después de la exposición. Por ejemplo, en el estudio de Lee y col. (2002), entre los 19 e incluso los 75 meses después de la radioterapia, 7 de los 13 pacientes estudiados mostraban frecuencias de MN superiores a las que presentaban con anterioridad al tratamiento.

Ahora bien, como cualquier ensayo, también presenta algunos inconvenientes que pueden dificultar el proceso de análisis y la interpretación de los resultados:

-La existencia de diferentes factores de confusión, como son la edad y el sexo (Migliore y col., 1991a), las técnicas de tinción (Surrallés y col., 1995b), etc.

-La elevada variabilidad intra e interindividual, que puede crear problemas a la hora de interpretar resultados en estudios poblacionales (Radack y col., 1995). En algunos casos, la variabilidad intraindividual puede alcanzar hasta un 67% atribuible al error experimental (Fenech y Neville, 1992).

-Otro punto limitante es la persistencia relativamente baja de los MN en células con un elevado índice de división, ya que los MN provienen de aberraciones cromosómicas inestables y, por lo tanto, tienden a perderse con el tiempo (Tucker y Preston, 1996; Ramírez y col., 1999).

- Bastantes aspectos del protocolo experimental no están completamente uniformizados, existiendo variaciones entre los diferentes laboratorios que utilizan la técnica de MN (Surrallés y Natarajan, 1997).

#### 1.5.1.1.1. Origen y desarrollo del ensayo de MN

Ya en los años 1920, en algunos trabajos científicos se describe la presencia de pequeños núcleos en el citoplasma de varias células, sobre todo en células sanguíneas. Unos años más tarde, Carlson (1938), Sax (1941) y Koller (1943) identifican las mismas estructuras después de haber irradiado células vegetales con rayos X. Pero no fue hasta 1959 cuando Evans y col., utilizaron el ensayo de MN para cuantificar la inducción de daño cromosómico *in vitro*, demostrando que las radiaciones ionizantes provocaban una clara relación dosis-efecto en células de *Vicia faba*. Posteriormente se pasó a la aplicación del ensayo de MN para detectar exposiciones a mutágenos *in vivo*, analizando sobre todo células de médula ósea de ratón (Matter y Schmid, 1971) y otros mamíferos.

Desde finales de la década de los 80, el ensayo se viene utilizando en multitud de estudios de biomonitorización como marcador de efecto en exposiciones medioambientales y ocupacionales, utilizando diferente tipos celulares.

El ensayo de MN está ampliamente utilizado en estudios de monitorización ambiental, tanto en estudios con plantas, sobre todo con las raíces de *Allium cepa* y *Vicia faba* (Grant, 1994) o con polen de *Tradescantia* (Rodrigues y col., 1997; Batalha y col., 1999; Sadowska y col., 2001); como en estudios con algunas especies animales sensibles a la contaminación ambiental. Así, el análisis de estudios de MN en peces (Campana y col., 2001), anguilas (Sánchez-Galán y col., 2001) y mejillones (Mersch y Beauvais, 1997), entre muchos otros ejemplos, han sido buenos indicadores de contaminación masiva.

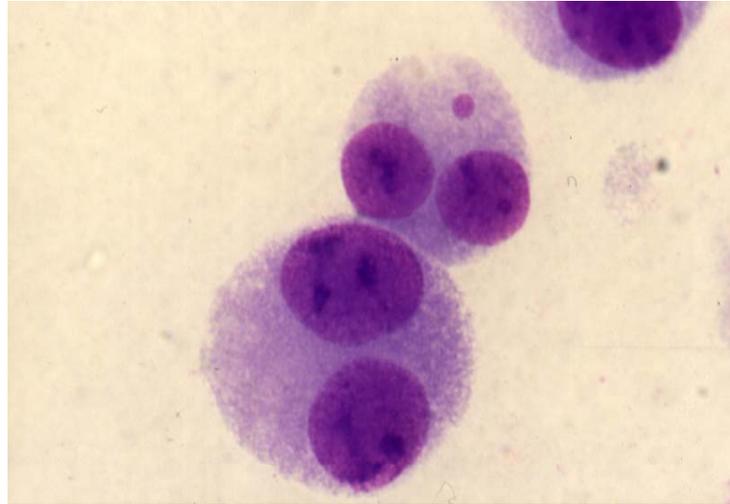
#### 1.5.1.1.2. MN en linfocitos de sangre periférica

La utilización de linfocitos de sangre periférica (LSP) en estudios de biomonitorización utilizando MN para evaluar el daño genotóxico provocado por mutágenos/cancerígenos está ampliamente extendido. Desde el año 1976 en que Countryman y Heddle utilizaron el ensayo de MN *in vitro* en cultivos de LSP, se han realizado multitud de estudios con esta técnica. Su gran popularidad reside sobre todo en que son un tipo celular fácil de estimular, que para su obtención se requiere un método poco invasivo y que reflejan una exposición global del organismo a los agentes genotóxicos, ya que la sangre está en contacto directo con los distintos tejidos corporales.

Sólo una pequeña proporción de los linfocitos circula por el torrente sanguíneo, estando el resto almacenado en los órganos linfoides. Se diferencian dos subpoblaciones de linfocitos en función de su vida media, los linfocitos de vida corta, que solamente viven unos días, y los de vida larga o de memoria, que pueden alcanzar varios años (Celada, 1994). El hecho de que entre el 10 y el 25% de los LSP se consideren de vida larga (en algunos casos, hasta más de cinco años) y que generalmente los LSP están en estado G<sub>0</sub> (no proliferativo), los hace una diana ideal de estudio para que las alteraciones producidas no se pierdan y se puedan detectar.

Uno de los requisitos del ensayo de MN es la necesidad de que ocurra la división celular para que el daño genético se pueda manifestar en forma de MN. Al encontrarse generalmente en estado no proliferativo, los linfocitos necesitan de una estimulación durante el cultivo. La estimulación hace que estos empiecen su ciclo de división, pasando a la fase G<sub>1</sub>, y generalmente se realiza mediante la adición del mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Pero todavía sigue existiendo un gran problema, porque una vez que los micronúcleos se han podido visualizar, al ser aberraciones inestables tienden a desaparecer a lo largo de las divisiones celulares. Por esta razón, es indispensable conocer si una célula se ha dividido y cuántas veces lo ha hecho. Para averiguar si las células se han dividido o no, se han descrito diferentes métodos. El método introducido por Pincu y col. (1984), consistía en el marcado de las células con bromodesoxiuridina y timidina tritiada. Su baja eficacia y el hecho de que causase daño *per se* determinó que se dejara de utilizar, a favor de la propuesta de Fenech y Morley (1985b), de utilizar la citocalasina-B (cyt-B) para inhibir la citocinesis celular. La cyt-B, sustancia que proviene del hongo *Helminthosporium dematoideum*, impide la polimerización de las fibras de actina y, por lo tanto, del anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma después de la telofase. Las células llevarán a cabo todo su ciclo celular normalmente hasta llegar al final de la telofase cuando la célula no se divide y

los dos núcleos hijos quedan englobados dentro de una misma membrana citoplasmática. Así, las células que han sufrido una división celular se distinguirán fácilmente por su aspecto binucleado (Figura 6) y las que han experimentado más de una división por ser polinucleadas (Fenech, 1993; Kirsch-Volders y col., 2000).



**Figura 6.** Linfocitos binucleados humanos con y sin MN.

Algunos estudios han comprobado que algunos agentes aneunógenos pueden interactuar con la cyt-B (Antoccia y col., 1993), ya que con la cyt-B en el medio la distancia entre los polos celulares es menor (Norppa y col., 1993; Falck y col., 1997) y puede favorecerse que los cromosomas que van rezagados se incorporen en los núcleos hijos. Así, Minissi y col., (1999) encontraron una disminución de MN cuando se evaluaba el daño genotóxico de la colchicina *in vitro* en presencia de cyt-B, con respecto al obtenido sin cyt-B.

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis se ha ido refinando con el tiempo y, además de evaluar la tasa de daño genético mediante los MN (información genotóxica), permite estimar paralelamente el retraso mitótico, que se traduce en información citotóxica, cuantificando el número de células que no se han dividido (mononucleadas), las que se han dividido una vez (binucleadas) y más de una vez (polinucleadas). Mediante el índice de proliferación celular (CBPI) se estiman los ciclos de división (Surrallés y col., 1995c). El ensayo de MN también permite evaluar la reparación por escisión (Surrallés y col., 1995a) y, si se realiza conjuntamente con una tinción fluorescente, permite detectar la no disyunción (Kirsch-Volders, 1997).

La frecuencia basal de MN en LSP oscila entre 0 y 2,5 % (Surrallés y Natarajan, 1997). La técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos se ha

utilizado y está siendo utilizada en muchos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Surrallés y Natarajan, 1997). El daño genético inducido por los plaguicidas ha sido ampliamente evaluado mediante esta técnica en estudios *in vitro* (Surrallés y col., 1995b; Ribas y col., 1997; 1998; Kligerman y Erexson, 1999), y también en estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas (ver Anexo 2) y en estudios con animales como indicadores de exposición (Backer y col., 2001).

#### 1.5.1.1.3. MN en células epiteliales de la mucosa bucal

El hecho de que un porcentaje muy elevado de los cánceres tenga un origen epitelial (Cairns, 1975) sugiere que el ensayo de MN en células epiteliales puede tener un enorme potencial epidemiológico.

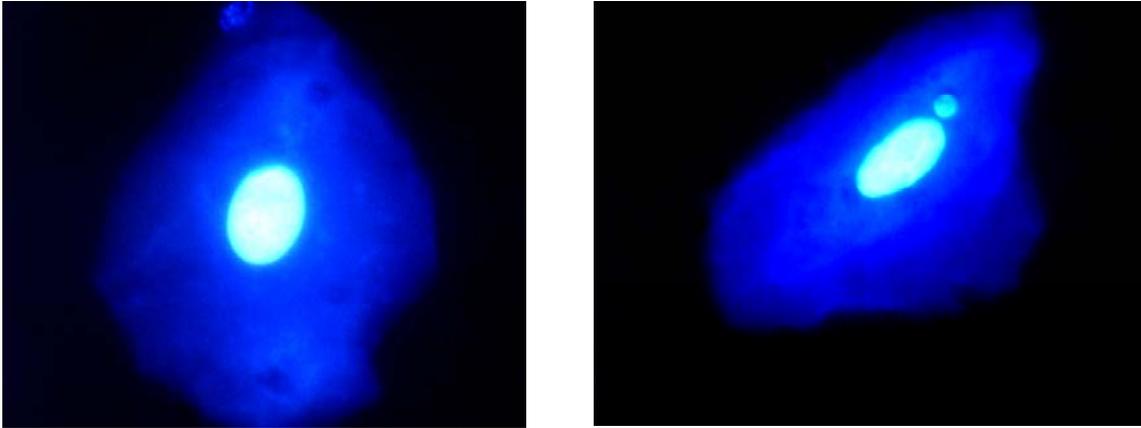
Los tejidos epiteliales son tejidos que proliferan muy rápidamente y muchos están en continuo contacto con el medio. Los cambios citogenéticos en estos tejidos son difíciles de estudiar por métodos tradicionales (CA o SCE), ya que se necesita tener metafases. Para solucionar este problema se deben utilizar técnicas citogenéticas que permitan hacer el análisis en interfase, como ocurre con la técnica de MN.

El ensayo de MN con células de exfoliación se comenzó a utilizar por Stich y col., a principios de los años 80, quienes utilizaron células de la mucosa bucal para evaluar los efectos genotóxicos de la exposición al tabaco (Stich y col., 1982; Stich y Rosin, 1983a). Estos autores postularon que este sistema se podía utilizar para valorar los efectos genotóxicos en todos los tejidos de los que se pudieran obtener células de exfoliación, abriendo una ventana a numerosos estudios. Pronto empezaron a aparecer estudios con células de mucosa bucal (Figura 7), de la mucosa nasal, bronquiales, de vejiga urinaria y cuello del útero (ver revisión de Majer y col., 2001).

Los mecanismos de formación de MN, explicados anteriormente (Apartado 1.5.1.1), son comunes a todas las células.

A diferencia de otros tipos celulares, el epitelio está formado por varias capas de células que se van exfoliando a medida que alcanzan la superficie, por lo que el daño genético que vamos a detectar es el que ha ocurrido en las capas basales, el lugar en donde las células se han dividido. La rápida renovación de los tejidos epiteliales hace que el máximo índice de formación de MN aparezca entre 1 y 3 semanas después de la exposición al agente genotóxico (Rosin, 1992; Fenech y col., 1999), que será el tiempo necesario para que las células migren desde las capas basales del epitelio hasta la superficie. La mayoría de estudios están de

acuerdo con esta afirmación y concluyen que, después del cese del tratamiento o de la exposición, los valores de MN descienden (Sarto y col., 1990; Titenko-Holland y col., 1998).



**Figura 7.** Célula de descamación de la mucosa bucal: normal (izquierda) y con 1 MN (derecha), con tinción fluorescente DAPI.

En comparación con otros ensayos de genotoxicidad actualmente usados en biomonitorización humana, el ensayo de MN con células de exfoliación presenta una serie de ventajas:

- Es simple y rápido. Si bien es una ventaja común a la técnica de MN con cualquier tipo celular, las células de exfoliación no necesitan ser cultivadas (como es necesario con linfocitos). Por lo que su procesamiento requiere menor tiempo y un equipamiento básico.
- El blanco o diana está bien definido y se puede reconocer fácilmente.
- La simplicidad de la recolección de las células, junto con una metodología no invasiva, hace el test aplicable a multitud de muestras.

Los inconvenientes propios de la técnica (elevada variabilidad intra e interindividual, la influencia de factores de confusión y diversidad de criterios de evaluación) se siguen presentando y son los principales problemas que presenta la técnica de MN con las células de exfoliación. Otra limitación es que las células de exfoliación bajo procesos degenerativos, pueden producir anomalías difíciles de distinguir de los MN (Stich y col., 1985; Sarto y col., 1987). Sin embargo, estas alteraciones pueden estar correlacionadas con las exposiciones en estudio y ser el resultado de fenómenos por ellos mismos relevantes en la carcinogénesis.

La frecuencia basal media de los MN en células de exfoliación epitelial de la mucosa bucal tiende a ser inferior a la observada en células sanguíneas. Existe mucha variabilidad

entre los valores que se obtienen en los individuos controles, encontrándose en un rango comprendido entre un 0,03% y 0,47% (Titenko-Holland y col., 1994).

Se han realizado diversos estudios de biomonitorización mediante el ensayo de MN con células de exfoliación de diferentes órganos, como los que analizan la relación entre el consumo de tabaco (en sus diferentes formas), la incidencia de diversos cánceres y el incremento de daño genético en la mucosa bucal y en las células de exfoliación de la vejiga de la orina (Nair y col., 1991; Burgaz y col., 1995). El ensayo de MN en células de exfoliación se ha utilizado también para evaluar poblaciones ocupacionalmente expuestas a diversas genotoxinas tales como el formaldehído (Titenko-Holland y col., 1996), el arsénico (Gonsebatt y col., 1997), y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Karahalil y col., 1999), entre otros. También se ha utilizado para evaluar el daño genético en pacientes con diversas enfermedades asociadas a deficiencias en los mecanismos de reparación como, por ejemplo, el *xeroderma pigmentosum* (Rosin y col., 1994). El ensayo de micronúcleos con células de exfoliación se ha utilizado con éxito en la identificación de agentes quimiopreventivos o anticarcinogénicos (Prasad y col., 1995), demostrando una vez más su versatilidad.

Debido al conjunto de ventajas que presenta el ensayo de MN y a su valor predictivo, reforzado por los numerosos estudios realizados para monitorizar riesgos específicos para la salud debidos a diversas exposiciones, tanto con células sanguíneas como con células de exfoliación de la mucosa bucal, se consideró oportuno llevar a cabo la biomonitorización de poblaciones agrícolas expuestas a plaguicidas, usando los MN como biomarcador y utilizando los dos tipos celulares mencionados.

## 2. OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

Dentro de un contexto europeo, y considerando la problemática actual sobre los efectos perjudiciales que los plaguicidas pueden representar para la salud, se fijó como objetivo general:

- **La evaluación del posible daño genotóxico de los plaguicidas, mediante la técnica de micronúcleos (MN), en cuatro poblaciones agrícolas europeas utilizando células sanguíneas y células epiteliales de descamación oral.**

Como objetivos secundarios se propusieron los siguientes:

- Valorar los factores higiénicos, de salud, de exposición a plaguicidas, de protección laboral, de alimentación, etc., que pueden influir en las variaciones de la frecuencia de micronúcleos.
- Evaluar el efecto citotóxico de los plaguicidas y de los factores de confusión, mediante la determinación del CBPI.
- Analizar los genotipos GSTM1 y GSTT1 de los individuos españoles, con el objetivo de evaluar hasta que punto la variabilidad genética puede modificar la capacidad de respuesta frente a una exposición continua a plaguicidas.
- Estudiar el efecto citogenético y los cambios bioquímicos y hematológicos en la población española, en dos periodos de distinta intensidad de aplicación de plaguicidas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

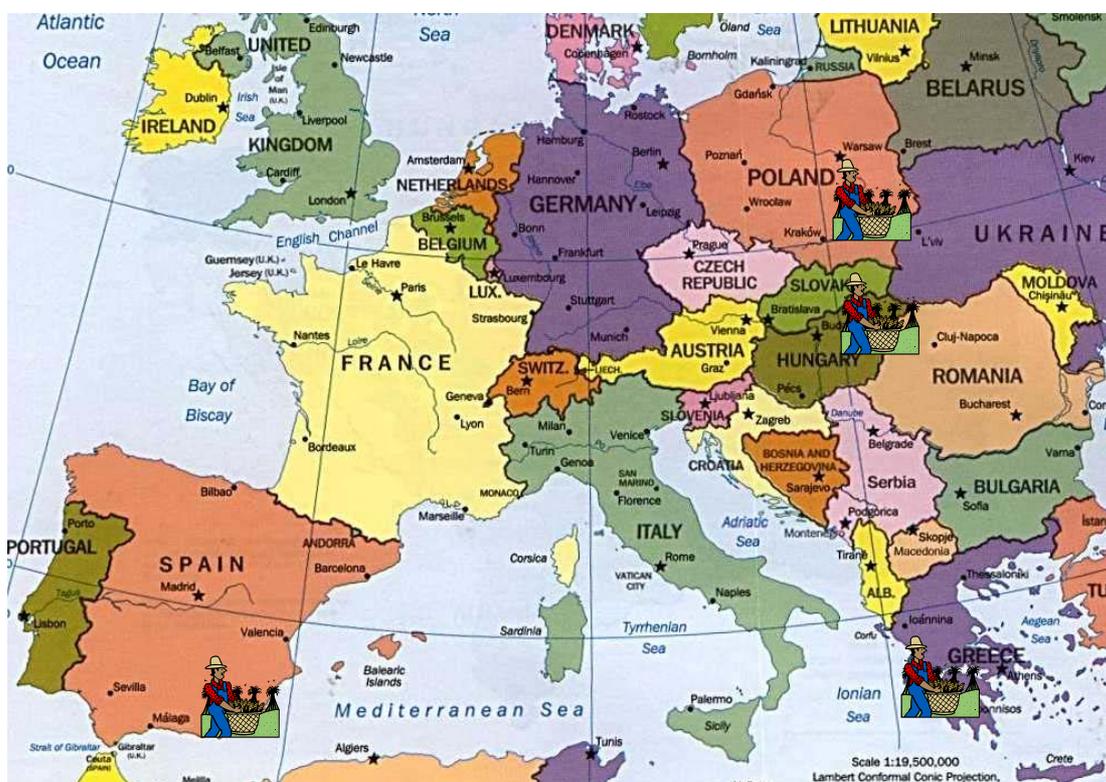
---

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los objetivos planteados se procedió a un análisis exhaustivo de los distintos tipos de datos procedentes de cada población, tanto a nivel descriptivo como estadístico.

#### 3.1. Selección de los individuos

Se han estudiado cuatro poblaciones europeas. Cada población incluye un grupo de agricultores expuestos a plaguicidas y su respectivo grupo control. La selección de cada grupo estuvo determinada por la disponibilidad de voluntarios en cada momento y situación. Las poblaciones escogidas no fueron al azar, sino seleccionadas previamente en base a sus características de exposición a plaguicidas y por corresponder a zonas no evaluadas en estudios anteriores. Así, se estudiaron las poblaciones agrícolas expuestas a plaguicidas y no expuestas (grupo de referencia) de Nea Makri (Grecia), Almería (España), Małopolska (Polonia) y del sureste de Hungría.



**Figura 8.** Mapa político de la Unión Europea, donde figuran los países que forman parte del estudio.

Todos los trabajadores agrícolas se caracterizan por estar expuestos a multitud de plaguicidas, en forma de mezclas complejas. Todos ellos trabajan en invernaderos, lo que podría facilitar aún más la absorción de fitosanitarios al organismo.

Los individuos controles fueron escogidos de cada zona o región lo más cercana posible, y lo más similares a la población expuesta, con la diferencia esencial de la ausencia de exposición a plaguicidas y a cualquier otro compuesto con capacidad genotóxica. La gran mayoría pertenecen a colectivos administrativos o sanitarios.

El número total de individuos alcanza la cifra de 478, divididos en 247 agricultores y 231 controles no expuestos. Esta cifra varía en función del parámetro citogenético evaluado, debido a problemas de transporte, cantidad y calidad de la muestra, etc. En la tabla 2 (ver apartado 5) se puede observar el número de individuos por cada país participante en el estudio.

## **3.2. Encuesta**

Paralelamente a la extracción de las muestras biológicas, y para tener un buen conocimiento de las características, tanto del colectivo expuesto a plaguicidas como del control, cada donante se sometió a una encuesta exhaustiva (ver Anexo 1) con el fin de obtener información, lo más detallada posible, sobre su actividad laboral y sus antecedentes personales. Se realizaron las preguntas habituales sobre demografía (edad, sexo, lugar de residencia,...), preguntas relacionadas con su historial médico (enfermedades, anomalías genéticas, medicación, antecedentes familiares de cáncer, abortos espontáneos,...), con la ocupación previa y actual, actividades de ocio, dieta, hábitos de consumo (alcohol, tabaco, café, drogas), exposiciones peligrosas (RX, productos cancerígenos, etc.), y cualquier otro factor que pudiera inducir daño genotóxico o interaccionar con la exposición. Los agricultores tuvieron que responder, además, a una serie de preguntas relacionadas con su actividad laboral: medidas de protección, productos utilizados, frecuencia de aplicación de plaguicidas, años de trabajo, accidentes de intoxicación, almacenamiento y preparación de los productos.

El objetivo de la encuesta es detectar cualquier factor que pueda crear confusión con los resultados obtenidos.

### 3.3. Obtención de las muestras

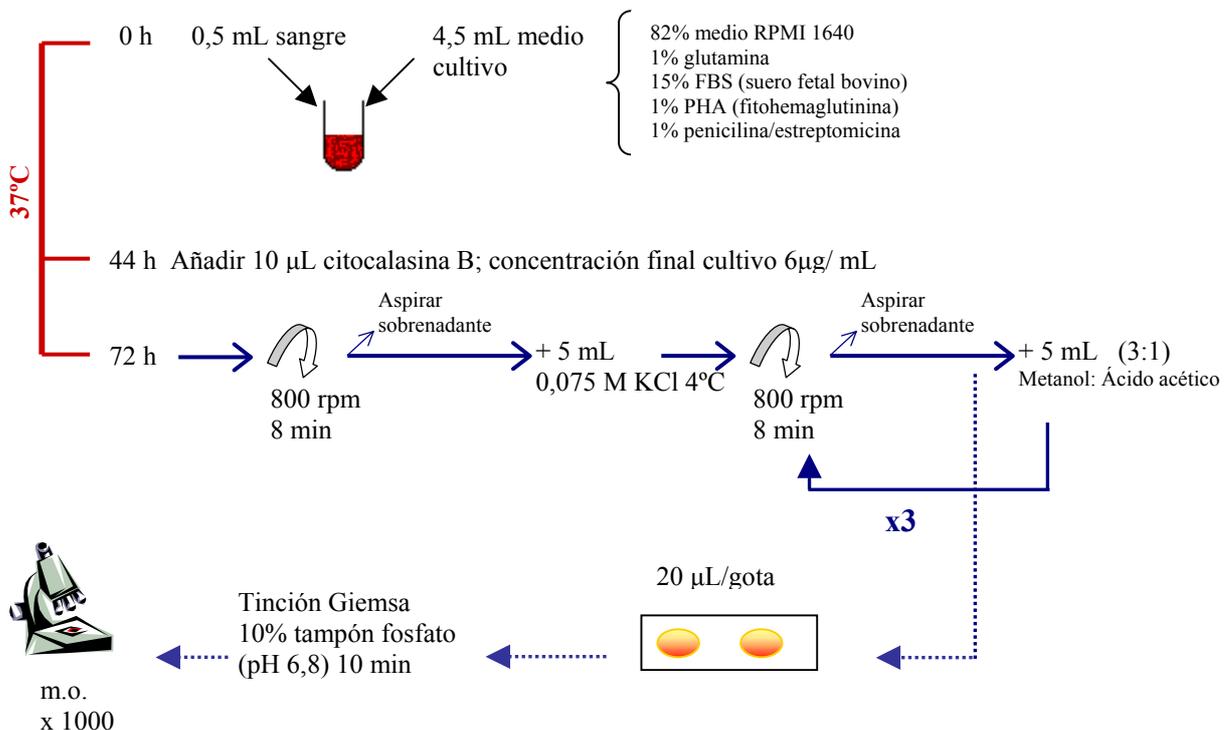
La obtención de todas las muestras (sanguíneas y bucales) se realizó a lo largo de 1998. Todos los individuos autorizaron por escrito la manipulación de las muestras biológicas bajo los procedimientos éticos estándar.

#### 3.3.1. Cultivos de linfocitos y análisis de MN

La extracción de sangre se realizó por profesionales acreditados para dicho proceso. Como el proyecto europeo en el que está incluido este trabajo comprende diversas técnicas, la cantidad de sangre extraída a cada individuo fue la adecuada para poder realizar todas las pruebas previstas en el estudio.

A cada individuo se le extrajeron unos 20 ml de sangre venosa periférica mediante punción en el antebrazo. Para la obtención de las muestras se utilizaron tubos de extracción (*vacutainers*) con anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su llegada, lo más rápidamente posible, al laboratorio correspondiente para ser procesadas. Todos los laboratorios implicados utilizaron el mismo protocolo.

A continuación se muestra un esquema del protocolo utilizado para el análisis de MN, a partir de un cultivo de linfocitos de sangre periférica:



La tinción y recuento de todas las preparaciones se realizó en los laboratorios del grupo de Mutagénesis de la Unidad de Genética de la UAB. El recuento se llevó a cabo por una única persona, técnico especialista con reconocida experiencia en el recuento de MN. Todas las preparaciones fueron previamente codificadas, por lo que se puede decir que se realizó un estudio “a ciegas”. De cada individuo se establecieron dos cultivos y de cada una de estas réplicas se prepararon como mínimo dos porpaobjetos, con lo que al final se disponía de un número bastante elevado de células.

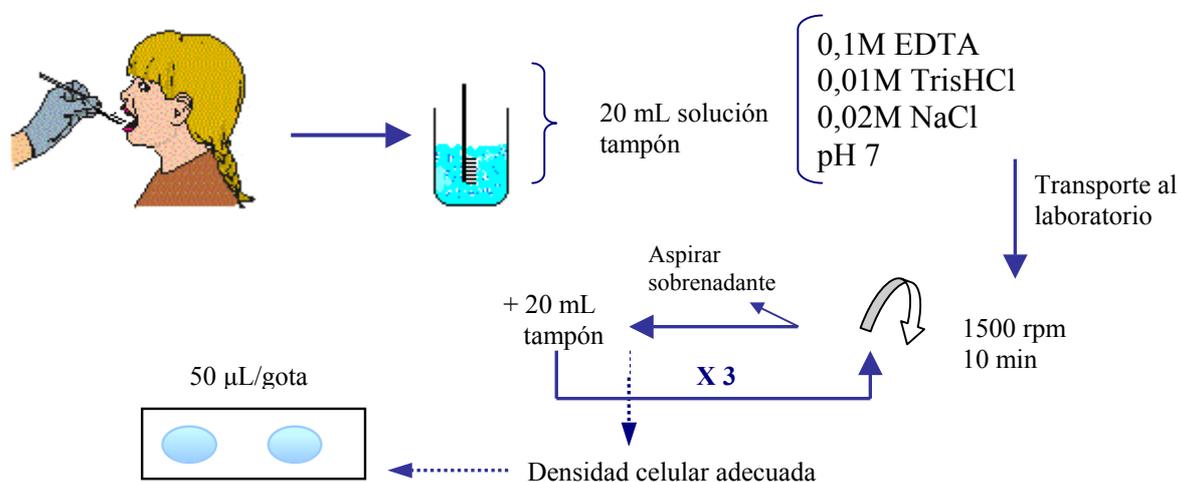
Se determinó la frecuencia de BNMN y MN totales, de un total de 1000 células binucleadas por individuo (500 de cada réplica).

### 3.3.1.1. CBPI - índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis -

Para calcular el CBPI se contaron 500 linfocitos y se determinó el porcentaje de células con un núcleo (mononucleadas), con dos núcleos (binucleadas), con tres y con cuatro núcleos (tri y tetranucleadas). Siempre a partir de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. Para su cálculo se aplica la fórmula:  $CBPI = [(NI + 2NII + 3(NIII + NIV)] / \text{total}$ , siendo NI-NIV las células con 1 a 4 núcleos.

### 3.3.2. Análisis de MN en células epiteliales de la mucosa bucal

Las muestras epiteliales de descamación de la mucosa bucal se recogieron simultáneamente con las de sangre. Se obtuvieron friccionando el interior de las mejillas de cada individuo con un cepillo dental, sin tocar los dientes ni la lengua. El protocolo seguido se detalla a continuación:



Todas las preparaciones, excepto las muestras procesadas desde el inicio en nuestro laboratorio, nos fueron enviadas y se almacenaron a -20 °C hasta su tinción y conteo.

La tinción se realizó justo antes (horas o pocos días) del recuento al microscopio. Para evitar los posibles artefactos a la hora del recuento, se utilizó una solución específica del DNA: amidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI). Todas las muestras se analizaron por un único observador, en portaobjetos codificados, en un microscopio de fluorescencia (X1000). Se evaluaron 2000 células mononucleadas por individuo, siguiendo los criterios de evaluación de MN sugeridos por Titenko-Holland y col. (1998).

Se determinó tanto las células bucales mononucleadas con MN (CBMN), como el total de MN encontrado en las células bucales (MNCB).

### 3.4 Tratamiento estadístico de los datos

Los datos se analizaron por países (Publicaciones 1-4) y, posteriormente, se realizó un estudio global (Publicación 5) para responder al objetivo principal, ¿La exposición a plaguicidas incrementa, en forma de MN, el daño en linfocitos o en células de descamación bucales?

Antes de todo hay que decir que en todos los análisis estadísticos se han tenido en cuenta factores demográficos, hábitos de fumar, alcohol, dieta, etc., y cualquier otro factor que pudiera influir sobre los resultados (años de aplicación de plaguicidas, protección, etc.).

En un primer momento, se tuvieron en cuenta, el mayor número de variables sospechosas de poder ejercer algún tipo de efecto. Sin embargo, debido a la falta de significación de la mayoría de variables, junto con el hecho de que no aportaban información útil para explicar los resultados, se fueron eliminando del análisis (método *backward*), hasta alcanzar un modelo parsimonioso (que explicara al máximo los resultados con el menor número de variables). Otras variables de interés primordial (como la exposición a plaguicidas), a pesar de la falta de significación, se han mantenido.

Para cada población estudiada, el método estadístico utilizado está descrito en cada uno de los artículos (ver artículos 1-6).

El análisis conjunto para evaluar el daño genotóxico se realizó mediante los programas SPSS versión 10.0 (SPSS, Chicago, IL, EEUU) y SAS versión 8.0 (SAS, Cary, NC, EEUU). Para comparar medias y frecuencias para algunos factores demográficos, de la dieta, etc., se utilizaron el test *t* de *Student*, el análisis de la varianza y la prueba de Ji-cuadrado.

Las variables citogenéticas BNMN y CBPI se analizaron utilizando un modelo lineal generalizado (GLZ). Con la finalidad de eliminar el efecto de las demás variables del modelo se utilizaron las suma de cuadrados de tipo III.

En el estudio de BNMN, los datos necesitaron una transformación previa (raíz cuadrada) para cumplir con todos los requisitos del método. Todas las variables de influencia se incluyeron en el análisis. Para obtener más información de los datos, se realizaron comparaciones *a posteriori* (*post hoc*) con la corrección de Tukey.

Debido a la existencia de diferencias entre las poblaciones y el hecho que dos de ellas incluyen mujeres, y que es bien conocido el efecto del sexo sobre la frecuencia de MN, se creó una nueva variable, llamada PS (País-Sexo) que engloba el sexo y la procedencia de cada individuo. PS fue introducida en el modelo como un factor aleatorio más.

En el análisis estadístico de los resultados citogenéticos de MN en células de descamación de la mucosa bucal, dado que la distribución de los datos se acercaba más a una distribución de Poisson, en primera instancia se realizó un análisis de regresión de Poisson. Ahora bien, debido a la elevada sobredispersión de los datos, se consideró más oportuno ajustar una distribución binomial negativa.

Como comentario especial decir, que todos los análisis que incluyeron el estudio del tabaco, únicamente se incluyeron aquellas poblaciones que presentan fumadores (excluyendo la de Grecia).

Los niveles de significación se consideraron siempre por debajo de 0,05.

### **3.5. Análisis de los genotipos**

La acción de los genes involucrados en la biotransformación de sustancias tóxicas pueden ser fuente de variabilidad individual en los parámetros citogenéticos. En una de las poblaciones estudiadas se determinó la presencia o ausencia de las enzimas de conjugación GSTM1 y GSTT1 en la población almeriense (España; Artículo 1).

A partir de una muestra de sangre de cada individuo, anticoagulada con EDTA, se extrajo DNA genómico utilizando el kit comercial Pharmacia Biotech, GenomicPrep. La identificación de GSTM1 y GSTT1 se realizó simultáneamente mediante una PCR múltiple y posterior detección en un gel de agarosa al 2,5%, con tinción de bromuro de etidio, en una electroforesis a 120 V durante un tiempo comprendido entre 75 y 90 min.

La ausencia de amplificación determinó los genotipos nulos (delección homocigótica del gen) y se corresponde con la deficiencia de actividad enzimática. La presencia de bandas de 230 pb y 112 pb correspondieron a GSTM1 y T1, clasificados como positivos (con al menos una copia del gen). Como control interno de amplificación se utilizó un fragmento de la  $\beta$ -globina.

Para valorar la posible diferencia de distribución de frecuencias de los genotipos entre controles y expuestos se realizó un análisis loglineal. Se prosiguió con un análisis de regresión múltiple donde se valoraba la influencia de los polimorfismos sobre los valores de los parámetros citogenéticos.

### **3.6. Estudio longitudinal: análisis citogenéticos, bioquímicos y hematológicos de la población almeriense**

El estudio longitudinal se realizó con 39 de los hombres trabajadores en invernaderos de la zona de Almería (España) y con el respectivo grupo control, formado por 22 hombres de la misma zona (Artículo 6). Las muestras de sangre se obtuvieron en dos periodos de tiempo diferentes: en un periodo de alta exposición (Marzo-Abril, muestra A), cuyos datos (ampliados) se explican en el artículo 1; y en un periodo de baja exposición (Noviembre-Diciembre, muestra B), después de un periodo de descanso por las vacaciones estivales y seguido de tres semanas de pausa en la aplicación de los plaguicidas.

Las muestras de sangre se obtuvieron como se ha explicado anteriormente.

Parte de la sangre fue sometida a un completo perfil bioquímico y hematológico, en el laboratorio del Centro Hospitalario Torrecárdenas de Almería; que comprendía una valoración renal (urea, creatinina y análisis de orina), el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol, HDL y LDL), enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina), recuento leucocitario, valores de hemoglobina, y otros índices sanguíneos. La finalidad de este estudio era detectar los posibles cambios metabólicos que los xenobióticos pudieran ejercer sobre el organismo.

Se realizó un análisis de la covarianza (ANCOVA) de medidas repetidas, para detectar diferencias a lo largo del tiempo de BNMN y CBPI; y evaluar los efectos de las covariables (edad, alcohol y café). Dado que no se detectó ningún síntoma extraño ni fuera de los límites en los valores bioquímicos y hematológicos, estos no se incluyeron en el análisis estadístico

de los parámetros citogenéticos, con tal de simplificar los análisis. El test de  $t$  y la prueba de  $\chi^2$  se utilizaron para determinar las diferencias entre los valores bioquímicos de los dos periodos de tiempo y para comparar las frecuencias entre grupos de variables (intoxicaciones, síntomas, enfermedades, etc.).

A continuación se recogen los artículos publicados, fruto del trabajo desarrollado, para después llevar a cabo una presentación general de los resultados obtenidos, así como una discusión general de los mismos.

## 4. ARTÍCULOS

---

## Artículo 1

*Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides:  
micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells*

L. Lucero, **S. Pastor**, S. Suárez, R. Durbán, C. Gómez, T. Parrón, A. Creus, R. Marcos

Mutation Research, 464 (2000) 255-262

# Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells

L. Lucero<sup>a</sup>, S. Pastor<sup>a</sup>, S. Suárez<sup>a,1</sup>, R. Durbán<sup>b</sup>, C. Gómez<sup>b</sup>, T. Parrón<sup>b</sup>,  
A. Creus<sup>a</sup>, R. Marcos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

<sup>b</sup> Delegación Provincial de la Consejería de Salud de Almería, Carretera de Ronda 101, Almería, Spain

Received 18 May 1999; received in revised form 13 October 1999; accepted 13 October 1999

## Abstract

In the present study, we evaluate whether or not occupational exposure to a complex mixture of pesticides results in a significant increase of micronuclei (MN) in both peripheral blood lymphocytes and buccal cells. Sixty four greenhouse workers from Almería (Southeastern Spain), together with 50 men from the same area, without indication of exposure to pesticides, that served as controls were used in this investigation. The results obtained indicate that there are no statistically significant differences in the MN frequencies between the two groups. Each donor was assessed for the presence or absence of glutathione *S*-transferase M1 (GSTM1) and glutathione *S*-transferase T1 (GSTT1), to look for relationships between the genotypes and the cytogenetic responses. According to the GSTT1 genotype, there is a difference between both groups only for the cytokinesis-block proliferation index (CBPI). Neither GSTM1 nor smoking habit and age showed any effect in the overall analysis. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Biomonitoring; Micronucleus test; Human lymphocytes; Buccal cells; GST; Pesticides

## 1. Introduction

Pesticides represent an important group of environmental pollutants to which man is daily exposed, mainly as consequence of their wide use in agriculture, which is likely to continue and possibly in-

crease in the near future. Of special concern with these chemicals are their undesirable health effects in humans. Among these are the genotoxic effects, including cancer and several other genetic diseases [1]. Thus, significant increased risk for developing leukemias [2–4], as well as bladder cancer [5], has been reported in farmers when compared to non-farmers.

Human cytogenetic biomonitoring studies carried out using somatic cells are considered as pertinent tools to evaluate the possible genotoxic effects of a defined exposure. For instance, chromosomal dam-

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-581-20-52; fax: +34-93-581-23-87; e-mail: rmd@cc.uab.es

<sup>1</sup> Present address: Laboratorio Microbiología, Instituto de Investigación e Análises Alimentarias, Campus Sur, Universidade de Santiago, 15706 Santiago de Compostela, Spain.

age is a relevant biomarker for cancer predisposition [6]. In this context, different studies have been conducted in human populations occupationally exposed to pesticides by using different indicators of genetic damage, mainly cytogenetic endpoints. The results of these studies are not conclusive and rather conflictive. Changes in pesticides formulation and the various mixtures used in agricultural practices across different regions make a constant reevaluation of their potential health effects in humans highly necessary. Apart from the previous considerations, there are also differences in the protective measures employed by the agricultural workers and in the cytogenetic endpoints evaluated, it is not surprising to find of both negative [7–10], and positive results [11–15].

In the present work, we used the micronucleus assay because of its advantages for the screening of cytogenetic damage due to potential environmental mutagens [16,17]. Briefly, micronuclei (MN) are acentric chromosome fragments or whole chromosomes left behind during mitotic cellular division and appear in the cytoplasm of interphase cells as small additional nuclei. The MN test is faster and easier than metaphase analyses and it can be used both *in vivo* and *in vitro* in a variety of cells. This assay has shown to be a reliable and sensitive biomarker [18–20] also for human biomonitoring, [14,21–23] being an adequate alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test [24].

The main objective of this study was to investigate whether or not glass-house workmen with prolonged exposure to pesticides, which presumably reach high concentrations inside their working environments, showed a significant increase in the level of cytogenetic damage, when evaluated by the MN assay.

Generally, different confounding factors, such as age, diet and smoking habit, had been considered to affect the results found in exposed populations. Nevertheless, it is evident that genetic risk is not only based on the genotoxic potency of the environmental agents, since differences in genetic susceptibility towards their adverse effects, are also an important factor. Thus, genotypes responsible for inter-individual differences in the ability to activate or detoxify genotoxic substances are recognised as biomarkers of susceptibility to mutation, cancer and other diseases [25,26].

Glutathione *S*-transferases (GST) are enzymes which catalyse the conjugation of glutathione to electrophilic substrates, most of which are formed during phase I metabolism [27]. They also have an important role in free radical scavenging, protecting the cell from the deleterious effects of oxidative stress, and they may be involved in the activation process of some carcinogens [28]. Taking this into account, a further objective in our study was to assess whether the polymorphism of GST genes influence the level of cytogenetic damage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Studied population

The study was carried out in a group of 64 male agricultural workers from the province of Almería (Spain), occupationally exposed to different mixtures of pesticides. Table 1 gives the main pesticides used in this region, classified as insecticides, bactericides and fungicides, with an indication of their frequency of use.

The control group consisted of 50 healthy men from the same area, without previous occupational exposure to pesticides or any other agents suspicious of being genotoxic. Table 2 reports the main characteristics (age, smoking habit, years of exposure) of both groups. They differ with respect to their average age, but this can be easily accommodated in the statistical analysis by introducing the age as a covariate.

Previous to the study, all the individuals gave informed consent and blood and buccal cell samples were collected and further manipulated in accordance with ethical standards. All participants completed a detailed questionnaire, covering standard demographic questions, as well as a brief occupational, medical, and family history. This questionnaire is similar to that published by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens [29]. The analytical protocol used also included a biochemical evaluation. Samples were obtained between March 1998 and

Table 1

Pesticides used by the studied group, with indication of its frequencies of use, WHO classification by hazard, and mutagenicity (M) and carcinogenicity (C) experimental data

Type	Product	Use (%)	Class (WHO)	M	C	Type	Product	Use (%)	Class (WHO)	M	C
Insecticides	Abamectine	35.9	*	–	–	Bactericides	Kasugamycin	4.7	V	–	–
	Acrinathrin	17.2	*	*	*		Fungicides	Carbendazim	3.1	*	+
	Buprofezin	4.7	IV	–	+	Cymoxanil		14.1	*	*	–
	Cyromazine	12.5	IV	*	–	Diethofencarb		3.1	*	*	*
	Dichlorvos	3.2	Ib	+	+	Mancozeb		12.5	IV	+	–
	Endosulfan	20.3	II	+	–	Nuarimol		3.1	*	+	*
	Formetanate	9.4	I	–	–	Fosetyl-aluminium		6.2	V	–	–
	Imidacloprid	50.0	*	+	–	Procymidone		10.9	V	–	–
	Malathion	12.5	III	+	–	Propamocarb		3.1	*	–	*
	Methamidophos	34.4	Ib	+	–	Propineb		7.8	V	–	–
	Methomyl	50.0	II	+	–						
	Oxamyl	14.1	Ib	–	–						
	Permethrin	4.7	II	–	–						
	Pyriproxyfen	14.1	*	*	*						
	Tebufenozide	4.7	*	*	*						
	Tralomehrin	15.6	*	*	*						

\* , Not available; – , no observed effects; + , adverse effects in at least one experiment (see Ref. [45] for more detailed information).

April 1998, following a period of extensive pesticide application.

## 2.2. Lymphocyte cultures and MN analysis

Blood was obtained from each subject by venipuncture using heparinized vacutainers. Lymphocyte cultures were set up by adding 0.5 ml of whole blood to 4.5 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% L-glutamine (all provided by Gibco Life Technolo-

gies, Paisley, UK). Lymphocytes were stimulated by 1% phytohaemagglutinin (Gibco) and incubated for 72 h at 37°C.

A cytochalasin B (Cyt-B, Sigma, St. Louis, MO, USA) solution was prepared in dimethylsulphoxide at a concentration of 6 µg/ml and stored at –20°C [30]. This solution was thawed and added to the cultures 44 h later to arrest cytokinesis. At 72 h of incubation, the cultures were harvested by centrifugation at 800 rpm for 8 min. Next, to eliminate red cells and to preserve cytoplasm, blood cultures were washed once in RPMI 1640 medium and a mild hypotonic treatment (2–3 min in 0.075 M KCl at 4°C) was carried out thereafter. Cells were centrifuged and a methanol–acetic acid (3:1 v/v) solution was gently added. This fixation step was repeated twice and the resulting cells were resuspended in a small volume of fixative solution and dropped onto clean slides. Finally they were stained with 10% Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 10 min.

To determine the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) and the total number of MN, a total of 1000 binucleated cells with well preserved cytoplasm (500 per replicate) were scored for each subject. In addition, 500 lymphocytes were scored to evaluate the percentage of cells with one to

Table 2

Characteristics of the studied groups

	Control	Exposed	<i>t</i>
No. subjects	50	64	
Age (years) <sup>a</sup>	38.56 ± 1.37	32.83 ± 1.14	3.237***
Years of exposure	–	9.82 ± 1.01	
<i>Smoking habit</i>			
No. non-smokers	14	27	
No. ex-smokers	6	2	
No. smokers	30	35	
Cigarettes/day <sup>a</sup>	14.70 ± 1.58	12.54 ± 1.63	0.929

<sup>a</sup> Mean ± S.E.

\*\*\* *P* = 0.001.

four nuclei and the cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was calculated [31].

### 2.3. MN analysis in buccal cells

Buccal cell samples were obtained by rubbing the inside of the cheeks with a toothbrush. The cells were collected in a conical tube containing 20 ml buffer solution (0.1 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl and 0.02 M NaCl, pH 7). After three washes in this buffer solution, by centrifugation at 1500 rpm during 10 min, 50  $\mu$ l of an adequate cell suspension density was dropped onto preheated (55°C) slides and allowed to air-dry for 15 min on a slide-warmer. The slides were fixed in 80% cold methanol for 30 min, air-dried overnight at room temperature, and stored at -20°C until use. Finally, they were stained with a 4',6-di-amidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) solution and a total of 2000 cells/donor were scored under an Olympus BX50 fluorescence microscope.

### 2.4. Genotype analysis

DNA was isolated from peripheral blood samples (300  $\mu$ l), which were collected into EDTA tubes, by using the Pharmacia Biotech GenomicPrep Kit (Piscataway, NJ, USA). The identification of GSTM1 and GSTT1 genotypes were determined simultaneously by a multiplex PCR, as described elsewhere [32]. Briefly, isolated DNA was amplified in a reaction mixture containing GSTM1 and GSTT1 primers, and  $\beta$ -globin primers as an internal control to confirm the presence of amplifiable DNA in the samples. PCR products were analysed by electrophoresis on an ethidium bromide-stained 2.5% agarose gel. The GSTs null genotypes, resulting in a deficiency of enzyme activity, were identified on the basis of the absence of specific bands at 230 bp (GSTM1) and 112 bp (GSTT1). The GSTM1 + and GSTT1 + correspond to the presence of the respective specific signals from both homozygotes and heterozygotes.

### 2.5. Statistical methods

The comparison between groups for the cytogenetic variables was done by means of the one-way analysis of covariance (ANCOVA) including age, years of exposure to pesticides and smoking habit as

covariates. The regression coefficients for the possible covariates' effects are given for each of the cytogenetic parameters evaluated.

The data on GSTM1 and GSTT1 frequencies consist of two-way tables in each group. To assess whether or not these frequencies differ between controls and exposed workers, a three-way log-linear analysis was performed. A multiple regression analysis was used to determine any relationship between the GSTs polymorphism and the cytogenetic variables for both studied groups. The statistical software used for the data analyses was STATISTICA (Stat-Soft, 1996, Tulsa, OK, USA). It was run on a Pentium PC-compatible.

## 3. Results and discussion

Table 3 shows the mean values ( $\pm$ S.E.) for the cytogenetic variables in both groups. The results of the ANCOVA and the partial regression coefficients are presented in Table 4a and b, respectively. As mentioned before, age was the only factor in which both groups differ; even so neither of the covariates analysed show a statistically significant relationship with the cytogenetic parameters. Although there is a slight increase in the MN and BNMN frequencies for the agricultural workers, this is not statistically significant. The whole analysis of the data reveals that there are no differences between groups.

The log-linear analysis indicated that the phenotypic frequencies for GSTM1 are significantly different for each group; the frequencies of the null genotype being 72% and 44% ( $P = 0.003$ ) for controls and exposed, respectively (Table 5).

With regard to the influence of the GSTs polymorphism on the cytogenetic variables, only the

Table 3  
Mean values for the cytogenetic parameters analysed

	Control <i>N</i>	Mean $\pm$ S.E.	Exposed <i>N</i>	Mean $\pm$ S.E.
MNL	50	7.90 $\pm$ 0.125	64	9.53 $\pm$ 0.863
BNMN	50	7.32 $\pm$ 0.641	64	8.72 $\pm$ 0.726
CBPI	50	1.82 $\pm$ 0.025	64	1.86 $\pm$ 0.022
MNBC	45	1.77 $\pm$ 0.125	59	1.83 $\pm$ 0.129

MNL, micronuclei in lymphocytes; BNMN, binucleated cells with micronuclei; CBPI, cytokinesis block proliferation index; MNBC, micronuclei in buccal cells.

Table 4  
(a) Summary of the effects for each cytogenetic variable (ANCOVA)

Dependent variable	<i>MS</i> effect	<i>MS</i> error	<i>F</i> ( <i>df</i> 1, 93)	<i>P</i>
MNL	112.45	38.56	2.92	0.091
BNMN	86.00	28.27	3.04	0.084
CBPI	0.01	0.03	0.24	0.623
MNBC	0.46	0.87	0.53	0.466

(b) Partial regression coefficients for the covariates introduced in the analysis

Covariate	$\beta \pm$ S.E.	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>MNL</i>			
Age	0.147 $\pm$ 0.078	1.89	0.062
Years of exposure	0.038 $\pm$ 0.087	0.43	0.665
Smoking habit	−0.667 $\pm$ 0.051	0.19	0.853
<i>BNMN</i>			
Age	0.126 $\pm$ 0.067	1.89	0.062
Years of exposure	−0.035 $\pm$ 0.075	0.47	0.638
Smoking habit	−0.616 $\pm$ 0.044	0.02	0.981
<i>CBPI</i>			
Age	−0.005 $\pm$ 0.002	2.57	0.012
Years of exposure	0.003 $\pm$ 0.002	1.29	0.199
Smoking habit	0.022 $\pm$ 0.0014	0.07	0.945
<i>MNBC</i>			
Age	0.010 $\pm$ 0.01	0.832	0.408
Years of exposure	−0.010 $\pm$ 0.01	0.670	0.505
Smoking habit	−0.173 $\pm$ 0.10	1.705	0.092

*MS*, mean square; *df*, degrees of freedom.

MNL, micronuclei in lymphocytes; BNMN, binucleated cells with micronuclei; CBPI, cytokinesis block proliferation index; MNBC, micronuclei in buccal cells.

CBPI appears to be affected and differs between groups. The multiple regression analysis (Table 6) indicates that while there is no distinction in the control group between the presence or absence of GSTT1; in the exposed individuals, the CBPI decreases in the presence of GSTT1.

The results of the present study indicate that the specific group of agricultural workers, under their particular conditions of exposure, do not reveal a

significant induction of genetic damage, as measured by the micronucleus assay. Recalling the nature of MN, the reported data would indicate a lack of clastogenic and/or aneugenic effects associated to this pesticide exposure.

Until now, many biomonitoring studies have been performed in agricultural workers from different regions and under a variety of exposure conditions. In this context, it is not surprising that the results obtained by different authors have also shown a high variability. The usual explanation for this has been, mainly, the different levels of exposure [9]. Nevertheless, the agricultural workers of this study were selected because of the particular characteristics of their working area, where the agricultural activity is intensive and exclusively in greenhouses, supposing a high level of exposure. In addition, the climatic conditions of the area allow 3–4 crops/year, which

Table 5  
Phenotypic frequencies for GSTM1 and GSTT1 in both groups

	GSTM1		GSTT1	
	Absent (0)	Present (1)	Absent (0)	Present (1)
Control	36	14	6	44
Exposed	28	35	14	49

GST, glutathione *S*-transferase.

Table 6  
Influence of GST polymorphism on the CBPI

	GSTM1 $\beta \pm$ S.E.	GSTT1 $\beta \pm$ S.E.
Control	$-0.046 \pm 0.057$ ( $t = 0.807$ , $P = 0.423$ )	$0.059 \pm 0.079$ ( $t = 0.747$ , $P = 0.459$ )
Exposed	$0.026 \pm 0.042$ ( $t = 0.613$ , $P = 0.542$ )	$-0.142^{**} \pm 0.051$ ( $t = 2.811$ , $P = 0.007$ )

GST, glutathione *S*-transferase; CBPI, cytokinesis block proliferation index.

implies a constant use and application of pesticides throughout the year. Thus, the lack of genetic damage observed in this study cannot be attributed to a low exposure. In many biomonitoring studies with agricultural workers, the use of a large number of pesticides has been reported, i.e., more than 100 [9], 64 [13], 43 [33]. Nevertheless, in this particular group, only 26 different chemical pesticides have been used, from which only 14 of them had been used by at least 10% of the workers.

As the exposure level can be considered significant, an alternative explanation for the lack of genotoxic damage observed can be the protective measures taken by the workers. According to the information obtained from the questionnaires, about 80% of them normally use gloves and protective clothes, which would minimise the real exposure. Nevertheless, given the temperature conditions inside the greenhouses, these protective measures may not be followed all year round.

Although in human cytogenetic biomonitoring studies the peripheral lymphocytes are the cells usually chosen, buccal epithelium cells provide an alternative source to monitor human exposure to genotoxins [22]. This tissue is on the direct route of airborne pollutants and, therefore, in our case it is supposed to be exposed to the small drops resulting from pesticide spraying. In addition to being easy to obtain, the use of epithelial cells in the detection of genotoxic effects is important when considering that about 90% of all cancers arise from epithelial tissue [34]. The use of both buccal and urothelial cells have been considered as sensitive methods for monitoring genetic damage in human populations [19]. In this context, genotoxic effects were detected in occupational exposure to pesticides by using urothelial cells [35]. In the case of exfoliated buccal cells, a substantial variation (more than tenfold) has been reported for the background level of MN. Part of this variation can be attributed to the different staining proce-

dures. In our study, we have overcome this source of error by using fluorescence staining (DAPI), which is specific of DNA and avoids possible artefacts. In the way stated, our negative results for buccal cells would reinforce the findings obtained by using lymphocytes.

An interesting point in our study is the use of genotype analysis to identify possible individual genetic susceptibility towards pesticide exposure. In the recent years, there is an increasing tendency to include information about the metabolic status of the individuals selected for biomonitoring, mainly about the genotype of detoxification phase II enzymes. This is in consequence of the accumulated evidence supporting the view that the presence of abundant detoxification enzymes protects the cells from the genotoxic effects of chemicals [36,37]. Yet, in some cases, conjugation can result in intermediates that may be more reactive than the parental compound [38].

GSTs are a family of enzymes that present genetic polymorphisms in human populations and have been suggested to be involved in the detoxification of many chemicals, including pesticides [39]. In particular, null genotypes for the GSTT1 and GSTM1 genes have been associated with an increased risk of various cancers [40,41]. Previous studies have been conducted to correlate cytogenetic damage in workers exposed to pesticides and GSTs polymorphism [42,43] and no association was found between these parameters. Nevertheless, the fact that in these studies pesticide exposure does not induce any significant increase in the cytogenetic parameters evaluated precludes conclusions.

When the micronucleus frequency in smokers and non-smokers is related with the presence/absence of GSTT1 or GSTM1 null alleles, no significant association was observed. This would contradict other studies analysing the induction of chromosome aberrations [43] or sister-chromatid exchanges [44], which

would reflect differences in the smoking intensity or different association between induced damage caused by smoking and the cytogenetic parameters analysed. Nonetheless, the association seen between GSTs phenotypes and CBPI must be remarked, where those null genotypes have higher proliferative indexes. This would contrast with the initial expectations and could indicate that some pesticide metabolites generated in the non-null genotypes are responsible of this slower division capability.

We feel that, in spite of the lack of association between GSTs polymorphism and modulation of the genetic damage present in the cells of agricultural exposed workers, it is necessary to obtain new data in populations where increases in the frequency of genetic damage are clearly associated to pesticide exposure.

### Acknowledgements

This investigation was supported in part by a grant of the European Union (CT96-0300, INCO-COPERNICUS), awarded to Dr. S.M. Piperakis, from the National Centre for Scientific Research ‘‘Demokritos’’, Athens, Greece. We would like to thank G. Umbert and A. Corral for their expert technical assistance in the preparation and scoring of samples.

### References

- [1] IARC, International Agency for Research on Cancer, Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides, Vol. 53, IARC Monographs, Lyon, France, 1991.
- [2] L.M. Brown, A. Blair, R. Gibson, G.D. Everett, K.P. Cantor, L.M. Schuman, L.F. Burmeister, S.F. Van Lier, F. Dick, Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota, *Cancer Res.* 50 (1990) 6585–6591.
- [3] A. Blair, S.H. Zahm, Agricultural exposures and cancer, *Environ. Health Perspect.* 103 (S8) (1995) 205–208.
- [4] A. Blair, S.H. Zahm, N.E. Pearce, E.F. Heineman, J. Fraumeni Jr., Clues to cancer etiology from studies of farmers, *Scand. J. Work Environ. Health* 18 (1992) 209–215.
- [5] J.F. Viel, B. Chalier, Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part?, *Occup. Environ. Med.* 52 (1995) 587–592.
- [6] L. Hagmar, A. Brøgger, I.-L. Hansteen, S. Heim, B. Høgstedt, L. Knudsen, B. Lambert, K. Linnainmaa, F. Mitelman, I. Nordenson, C. Reuterwall, C. Salomaa, S. Skerfving, M. Sorsa, Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage, *Cancer Res.* 54 (1994) 2919–2922.
- [7] S. Gómez-Arroyo, N. Noriega-Aldana, A. Osorio, F. Galicia, S. Ling, R. Villalobos-Pietrini, Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 281 (1992) 173–179.
- [8] L.E. Hoyos, S. Carvajal, L. Solano, J. Rodríguez, L. Orozco, Y. López, W.W. Au, Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia, *Environ. Health Perspect.* 104 (S3) (1996) 535–538.
- [9] R. Scarpato, L. Migliore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Migli, N. Loprieno, Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure, *Mutat. Res.* 367 (1996) 73–82.
- [10] W. Venegas, Y. Zapata, E. Carbonell, R. Marcos, Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción (Chile), *Teratog., Carcinog., Mutagen.* 18 (1998) 123–129.
- [11] M. De Ferrari, M. Artuso, S. Bonassi, S. Bonatti, Z. Cavalieri, D. Pescatore, E. Marchini, V. Pisano, A. Abbondandolo, Cytogenetic monitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes, *Mutat. Res.* 260 (1991) 105–113.
- [12] D.S. Rupa, P.P. Reddi, O.S. Reddi, Clastogenic effect of pesticides in peripheral lymphocytes of cotton-field workers, *Mutat. Res.* 261 (1991) 177–180.
- [13] E. Carbonell, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides, *Mutagenesis* 8 (1993) 511–517.
- [14] C. Bolognesi, M. Parrini, S. Bonassi, G. Ianello, A. Salanito, Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 285 (1993) 239–249.
- [15] A. Kourakis, M. Mouratidou, A. Barbouti, M. Dimikiotiou, Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers, *Carcinogenesis* 17 (1996) 99–101.
- [16] M. Fenech, A.A. Morley, Citokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutat. Res.* 161 (1986) 193–198.
- [17] S. Viaggi, S. Bonatti, A. Abbondandolo, New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells, *Mutagenesis* 2 (1987) 367–370.
- [18] J. Surrallés, E. Carbonell, R. Marcos, F. Degraffi, A. Antocchia, C. Tanzarella, A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 7 (1992) 407–410.
- [19] N. Titenko-Holland, L.E. Moore, M.T. Smith, Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, *Mutat. Res.* 312 (1994) 39–50.
- [20] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Humelen, The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromo-

- some breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* 392 (1997) 19–30.
- [21] M. Fenech, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* 285 (1993) 35–44.
- [22] J. Surrallés, K. Autio, L. Nylund, H. Järventaus, H. Norppa, T. Veidebaum, M. Sorsa, K. Peltonen, Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene exposed workers, *Carcinogenesis* 18 (1997) 817–823.
- [23] S. Gutiérrez, E. Carbonell, P. Galofré, A. Creus, R. Marcos, Micronuclei induction by  $^{131}\text{I}$  exposure: study in hyperthyroidism patients, *Mutat. Res.* 373 (1997) 39–45.
- [24] M.S. Miller, D.G. McCarver, D.A. Bell, D.L. Eaton, J.A. Goldstein, Genetic polymorphisms in human metabolic enzymes, *Fundam. Appl. Toxicol.* 40 (1997) 1–14.
- [25] A.K. Daly, S. Cholerton, W. Gregory, J.R. Idle, Metabolic polymorphisms, *Pharmacol. Ther.* 57 (1993) 129–160.
- [26] R.J. Srám, Effect of glutathione *S*-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects, *Environ. Health Perspect.* 106 (S1) (1998) 231–239.
- [27] T.H. Rushmore, C.B. Pickett, Glutathione *S* transferases, structure, regulation and therapeutic implications, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11475–11478.
- [28] G. Cantelli-Forti, P. Hrelia, M. Paoletti, The pitfall of detoxifying enzymes, *Mutat. Res.* 402 (1998) 179–183.
- [29] A.V. Carrano, A.T. Natarajan, Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC Publication No. 14, *Mutat. Res.* 204 (1988) 379–406.
- [30] J. Surrallés, A. Antocchia, A. Creus, F. Degraffi, F. Peris, C. Tanzarella, N. Xamena, R. Marcos, The effects of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories, *Mutagenesis* 9 (1994) 347–353.
- [31] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 341 (1995) 169–184.
- [32] A. Hirvonen, S.T. Saarikoski, K. Linnainmaa, K. Koskinen, K. Husgafvel-Pursiainen, K. Mattson, H. Vainio, Glutathione *S*-transferase and *N*-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 11853–11856.
- [33] E. Carbonell, A. Valbuena, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 344 (1995) 127–134.
- [34] J. Cairns, Mutational selection and the natural history of cancer, *Nature* 255 (1975) 197–200.
- [35] R.H.C. San, M.P. Rosin, R.H. See, B.P. Dunn, H.F. Stich, Use of urine for monitoring human exposure to genotoxic agents, in: R. Wang, C.A. Franklin, J.C. Reinert (Eds.), *Biological Monitoring for Pesticide Exposure*, American Chemical Society, Washington, DC, 1989, pp. 98–116.
- [36] M.S. Miller, D.G. Mc Carver, D.A. Bell, D.L. Eaton, J.A. Goldstein, Genetic polymorphisms in human metabolic enzymes, *Fundam. Appl. Toxicol.* 40 (1997) 1–14.
- [37] S.Z. Abdel-Rahman, R.A. El-Zein, J.B. Zwischenberger, W.W. Au, Association of the NAT1\*10 genotype with increased chromosome aberrations and higher lung cancer risk in cigarette smokers, *Mutat. Res.* 398 (1998) 43–54.
- [38] M.A. Watson, R.K. Stewart, G.B.J. Smith, T.E. Massey, D.A. Bell, Human glutathione *S*-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution, *Carcinogenesis* 19 (1998) 275–280.
- [39] E. Hodgson, I.S. Silver, L.E. Butler, M.P. Lawton, P.E. Levi, Metabolism, in: W.J. Hayes, E.R. Laws (Eds.), *Handbook of Pesticides Toxicology*, Vol. 1, Academic Press, San Diego, 1991, pp. 106–167.
- [40] J.T. Lear, A.H.M. Heagerty, A. Smith et al, Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione *S*-transferases (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphism influence tumour numbers and accrual, *Carcinogenesis* 17 (1996) 1891–1896.
- [41] A. D’Errico, E. Taioli, X. Chen, P. Vineis, Genetic metabolic polymorphism and the risk of cancer: a review of literature, *Biomarkers* 1 (1996) 149–173.
- [42] R. Scarpato, L. Migliore, A. Hirvonen, G. Falck, H. Norppa, Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 263–269.
- [43] R. Scarpato, A. Hirvonen, L. Migliore, G. Falck, H. Norppa, Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and non smokers and pesticide-exposed greenhouse workers, *Mutat. Res.* 389 (1997) 227–235.
- [44] G. van Poppel, N. de Vogel, P.J. van Balderen, F.J. Kok, Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione *S*-transferase isozyme  $\mu$ , *Carcinogenesis* 13 (1992) 303–305.
- [45] M.L. Richardson (Ed.), *The Dictionary of Substances and their Effects*, Royal Society of Chemistry, Vol. 1, 1st edn., 1992.

## **Artículo 2**

*Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and bucal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides*

**Susana Pastor**, Sara Gutiérrez, Amadeu Creus, Antonina Cebulska-Wasilewska, Ricard Marcos

Mutation Research, 495 (2001) 147-156

## Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides

Susana Pastor<sup>a</sup>, Sara Gutiérrez<sup>a,1</sup>, Amadeu Creus<sup>a</sup>,  
Antonina Cebulska-Wasilewska<sup>b</sup>, Ricard Marcos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Radiation and Environmental Biology, The H. Niewodniczański Institute of Nuclear Physics, Kraków, Poland*

Received 13 March 2001; received in revised form 15 May 2001; accepted 16 May 2001

### Abstract

In this biomonitoring study, we investigated whether an occupational exposure to a complex mixture of chemical pesticides produced a significant increase of micronuclei (MN) in both peripheral blood lymphocytes and buccal cells. Forty-nine male workers exposed to pesticides, from an agricultural area of Małopolska Region in Southern Poland, together with 50 men from the same area without indication of exposure to pesticides that served as controls, were used in this investigation.

No statistically significant differences in the frequencies of cytogenetic damage were detected between exposed and control individuals, for either type of cells. The multiple linear regression analysis in the case of lymphocytes indicated that the studied cytogenetic endpoints were inversely influenced by alcohol; whilst a negative binomial regression, in the case of buccal cells, indicated that the MN values were directly influenced by the ingestion of red meat. An inverse negative relationship between the cytokinesis-block proliferation index and age, and a significant increase of miscarriages due to the exposure to pesticides were also observed. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Biomonitoring; Pesticides; Micronucleus test; Human lymphocytes; Buccal cells

### 1. Introduction

Nowadays, pesticides are extensively used all over the world, not only in agriculture, but also in lots of daily chemical products (insect repellents, paints, glues, etc.). In spite of this general exposure, there are groups that are occupationally exposed, such as agricultural workers that are often exposed to moderate or high doses of genotoxic chemicals. Exposure

to pesticides can represent a potential risk to human beings and some studies have demonstrated the harmful effect of pesticides in human health, such as an increase of different symptoms including neuritis, psychiatric manifestations, hepatorenal dysfunction, electroencephalograph changes [1,2] and neurological, immune, metabolic and endocrine problems [3,4]. In addition, exposure to pesticides is also related to an increase in the incidence of leukaemia [5,6] and bladder cancer [7] reported in farmers when compared to non-farmers, as consequence of the genotoxic effects of some pesticides [8]. Results of this kind have moved many researchers to evaluate the genetic risk associated to pesticide exposure.

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-5812052;  
fax: +34-93-5812387.

E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

<sup>1</sup> Present address: DNA Repair Group, IARC, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon, Cedex 08, France.

The testing for genetic damage induction has been carried out by different approaches, although in human biomonitoring studies the cytogenetic assays are the most commonly used. Chromosome aberrations (CA) may be used as an early warning signal for cancer development, and it has been suggested that the detection of an increase in chromosome aberrations, related to an exposure to genotoxic agents, may be used to estimate cancer risk [9,10]. Although different studies have been conducted in populations occupationally exposed to pesticides by analysing different cytogenetic endpoints, some of the reported data are confusing and inconclusive. These studies require a continuous evaluation due to the differences in the number, concentration and mixtures of pesticides, and also the differences in protective measures, climatic conditions, kind of crops, etc. Therefore, it is not odd to find negative [11–14] as well as positive results [15–17] in biomonitoring of these populations.

The sensitivity and reliability of the micronucleus (MN) assay to detect DNA damage, as well as its capability when applied with different kinds of cells, makes it a good method to analyse the potential cytogenetic damage of environmental pollutants [18–20]. Thus, many studies have demonstrated the efficiency of the MN assay to detect DNA damage induced by pesticides [21,22]. Thus, we used the micronucleus assay in two different kinds of cells: (1) peripheral blood lymphocytes; (2) epithelial buccal cells, to assess if the prolonged exposure to complex mixtures of pesticides leads to an increase in cytogenetic damage in a group of agricultural workers from a southern region of Poland.

It is evident that genetic risk estimation is not only based on the genotoxic potency of the genotoxic chemicals. Different confounding factors such as age, diet, alcohol consumption and smoking habit, can also influence the results; therefore, when analysing the results, these and other influential factors were taken into account in this study.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Population studied

Two groups of individuals were analysed: (1) an exposed and (2) a non-exposed group acting as

control [23–25]. The exposed group was composed of 49 male agricultural workers from Małopolska Region of Southern Poland who worked inside and outside greenhouses, occupationally exposed to different mixtures of pesticides. Table 1 shows the pesticides mostly used by this population, indicating their frequency of use and toxicological classification.

The control group consisted of 50 healthy men from the same area without previous occupational exposure to pesticides or any other agents suspicious of being genotoxic. Earlier to the study, all the individuals filled-in a detailed questionnaire covering standard demographic questions, habits (sports, food, drugs, tobacco, alcohol, coffee, etc.), as well as occupational, medical and family history. The agricultural workers also completed a specific questionnaire, in which the type of working activity, duration of application of the pesticides, kind of pesticides and protective measures used, etc. were recorded [23–25].

All the individuals gave informed consent and blood and buccal cell samples were obtained following the procedure described later, and further manipulated in accordance with ethical standards.

### 2.2. Cytogenetic protocols

#### 2.2.1. Lymphocyte culture and MN analysis

Blood collected in Poland was obtained from each subject by venipuncture using heparinised vacutainers. Lymphocyte cultures were set up in the laboratory of the Department of Environmental and Radiation Biology (DERB) of the H. Niewodniczański Institute of Nuclear Physics (Kraków) by adding 0.5 ml of whole blood to 4.5 ml of RPMI 1640 medium, supplemented with 15% heat-inactivated foetal calf serum, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) and L-glutamine. Lymphocytes were stimulated by 1% of phytohaemagglutinin and incubated for 72 h at 37°C. Two cultures per subject were established. A final concentration of 6 µg/ml of cytochalasin B [26] was added to the cultures 44 h later to arrest cytokinesis. At 72 h of incubation, the cultures were harvested by centrifugation at 800 rpm for 8 min. Next, to eliminate red cells and to preserve cytoplasm, the cell pellet was treated with an hypotonic solution (2–3 min in 0.075 M KCl at 4°C). Cells were centrifuged thereafter and a methanol:acetic acid (3:1 v/v) solution was gently added. This fixation step was repeated

Table 1

Pesticides used by the farmers, frequency of use and mutagenicity (M) and carcinogenicity (C) data<sup>a</sup>

Type	Product	Group	Use (%)	Class (EPA)	Pesticide use	M	C
Insecticides	Deltamethrin	Pyrethroid	38	NA	NA	–	NA
	Dimethoate <sup>b,c</sup>	Organophosphorus	38	II	GUP	–/+	Inc.
	Methomyl <sup>b</sup>	Carbamate	26	I	RUP	–	–
	Carbosulfan <sup>c</sup>	Carbamate	22	NA	NA	–	–
	Lambda-cyhalothrin <sup>b</sup>	Pyrethroid	16	II	RUP	–	Inc.
	Cafenvalerate <sup>b</sup>	Pyrethroid	12	NA	NA	NA	NA
	Pirimicarb	Carbamate	8	I	RUP	–	Inc.
	Acetamiprid	Nicotinoid	6	NA	NA	NA	NA
	Diazinon <sup>b</sup>	Organophosphorus	6	II (III)	RUP	Inc.	–
	Bifenthrin <sup>b</sup>	Pyrethroid	6	II	RUP	Inc.	Pos.
	Permethrin <sup>b</sup>	Pyrethroid	4	II (III)	RUP	–	Inc.
	Alphamethrin	Pyrethroid	4	NA	NA	NA	NA
	Fenazaquin <sup>b</sup>	Unclassified	4	NA	NA	NA	NA
	Clorpyrifos <sup>b,c</sup> + cypermethrin <sup>b</sup>	Organophosphorus/pyrethroid	4	II, II (III)	GUP, RUP	–, –	–, Pos.
	Acephate	Organophosphorus	4	NA	GUP	–	–
	Methamidophos <sup>b</sup>	Organophosphorus	4	I	RUP	+	–
Abamectin <sup>b</sup>	Antibiotic	4	IV	GUP	–	–	
Fungicides	Chlorothalonil	Aromatic	10	II	GUP	–	Pos.
	Propamocarb	Carbamate	10	IV	NA	NA	–
	Vinclozolin	Dicarboximide	10	III	GUP	–	Inc.
	Iprodione	Dicarboximide/imidazole	10	NA	GUP/RUP	NA	Inc.
	Triforine	Unclassified	9	I	RUP	–	–
	Thiophanate-methyl	Benzimidazole/carbamate	9	IV	NA	–	NA
	Bupirimate	Pyrimidine	8	NA	NA	–	–
	Captan	Dicarboximide	6	IV	GUP	Inc.	+
	Copper oxychloride	Copper fungicide	6	NA	GUP	NA	–
	Benomyl <sup>b,c</sup>	Benzimidazole/carbamate	4	IV	GUP	Inc.	NA
	Dichlofluanid <sup>b</sup>	Phenylsulfamide	4	NA	NA	NA	NA
	Metiram	Dithiocarbamate	4	IV	GUP	–/w	NA
	Oxadixyl + mancozeb	Oxazole/dithiocarbamate	4	III, IV	GUP	NA, –/w	Pos., Inc.

<sup>a</sup> EPA toxicity classification: I, highly toxic; II, moderately toxic; III, slightly toxic; IV, practically non-toxic; RUP, restricted used pesticide; GUP, general used pesticide. NA, not available; Inc., inconclusive; –, no observed effects; +, positive effects; w, weakly positive; Pos., possibly carcinogenic.

<sup>b</sup> Also acaricide.

<sup>c</sup> Also nematocide.

twice and the resulting cells were resuspended in a small volume of fixative solution and dropped onto clean slides. Then, slides were transported to the laboratory at the Universitat Autònoma of Barcelona in Bellaterra (Spain) where they were stained it with 10% Giemsa in phosphate buffer (pH 6.8) for 10 min.

To determine the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) and the total number of MN in lymphocytes (MNL), a total of 1000 binucleated cells with well preserved cytoplasm (500 per replicate) were scored for each subject on coded slides. In addition, 500 lymphocytes were scored to determine the percentage of cells with one to four nuclei and the

cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was calculated [27].

### 2.2.2. MN analysis in buccal cells

Buccal cell samples collected as mentioned above in the DERB laboratory in Kraków (Poland), were obtained by rubbing the inside of the cheeks with a toothbrush. The cells were collected in a conical tube containing 20 ml of buffer solution (0.1 M EDTA, 0.01 Tris-HCl and 0.02 M NaCl, pH 7). After three washes in this solution, by centrifugation at 1500 rpm for 10 min. Then, 50 µl of an adequately dense cell suspension was dropped onto preheated (55°C) slides and

allowed to air-dried for 15 min on a slide-warmer. The slides were fixed in 80% cold methanol for 30 min, air-dried overnight at room temperature, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Then, the slides were transported to the laboratory in Bellaterra, where finally, they were stained with a 4',6-di-amidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), fluorescent solution specific for DNA to avoid possible artefacts. A total of 2000 cells per donor were scored under an Olympus BX50 fluorescence microscope. The criteria for MN evaluation were those suggested by Titenko-Holland et al. [28]. The frequency of mononucleated buccal cells with micronuclei (BCM<sub>N</sub>) and the total number of micronuclei in mononucleated buccal cells (MNBC) were determined for each studied individual.

### 2.3. Statistical analysis

Associations between all predictor continuous and categorised variables and cytogenetic endpoints (BNMN, MNL, CBPI) scored in lymphocytes were investigated by using a multiple linear regression analysis. The methods for variable selection stepwise, backward, and forward, with the “pairwise” option for missing data were used. The significant variables obtained from each of the three methods were further evaluated using another multiple regression analysis. The use of transformed outcome variables made it possible to normalise their distributions and homogenise variances. In this sense, the square root transformation was performed to analyse the BNMN and MNL. The dependent variable CBPI was studied directly without any transformation, because it accomplished all the model requirements.

Analyses of the residuals, tolerance limits and homogeneity of variances were checked to evaluate the adequacy of fit for each multiple regression model.

The cytological variables MNBC and BCM<sub>N</sub> were first studied by means of Poisson regression analysis, but an important over-dispersion was observed, possibly due to the heterogeneity between the individuals, thus a negative binomial regression by the backward method was used. Interactions between the most important variables studied were also considered in each model.

A logistic binary regression analysis with the methods stepwise, forward and backward, was used to

evaluate differences in the incidence of miscarriages, considering the possible effects of age, alcohol, cigarettes and exposure to pesticides.

The Student's *t*-test was applied to detect differences between groups with regard to the mean values of the confounding factors (age, tobacco, alcohol, etc.).

Statistical decisions were made with a significance level of 0.05. The statistical computations were performed using SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and SAS system for windows, version 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### 3. Results

The agricultural workers included in this study were exposed to complex mixtures of pesticides (Table 1), mainly insecticides and fungicides [23–25]. As indicated, some of them are possibly or probably carcinogenic and/or mutagenic compounds and, most of them belong to the organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticide families.

The questionnaire data revealed that 84% of the farmers were not exclusively exposed to pesticides, but also to a combination of agents such as dust, paints, solvents, etc. On the other hand, 96% of the farmers were also involved in other agricultural tasks such as farming, harvesting, packaging, etc. besides the regular application of pesticides.

In addition, and with respect to their work activities, 46% of individuals harvested vegetables, 44% ornamental plants and 10% both types of cultures [23–25]. In most cases, pesticides were applied from above the head (92%), which increases the probability of inhalation or direct contact with eyes, mucous membranes (mouth, nose, pharynx, etc.), and the rest of the body. With regard to the use of protective measures, 78% of farmers used more than one kind of protective measure (mask, glasses, gloves, boots, etc.), and only 12% asserted not to use any kind of protection during the application of pesticides. Table 2 shows the habits of farmers during application. It can be observed that agricultural workers spent more hours applying the chemicals during warm seasons, due to the climatic condition. Also, the time spent applying inside or outside the greenhouses is similar.

Table 2  
Habits of pesticide application of the agricultural workers (mean  $\pm$  S.E.)

Application (h per week)	
Spring	1.12 $\pm$ 0.23
Summer	1.37 $\pm$ 0.23
Autumn	0.93 $\pm$ 0.22
Winter	0.13 $\pm$ 0.04
Application (h per week, through out the year)	
Outdoors	0.43 $\pm$ 0.12
Indoors	0.46 $\pm$ 0.08
Total	0.88 $\pm$ 0.16
Latest application (days)	24.06 $\pm$ 5.42

As an indication of the risk of exposure to pesticides, 10% of the exposed subjects reported to have been recently intoxicated by pesticide use, with symptoms such as headache, nausea and vomiting as the most common.

Regarding the average of age, smoking habits, coffee and alcohol consumption, the data are shown in Table 3, and when comparing the control and the exposed group, no statistically significant differences (*t*-test) were found. From Table 4, it can be observed that there are no significant differences between controls and exposed (*t*-test) in the average of consumption of different foodstuffs. On the other hand, almost all the individuals studied had received X-rays in the last 3 years due to medical examinations (95% of the controls and 88% of the exposed).

With regard to the control group, 12% affirmed to be exposed to radiation and 40.8% to a

Table 3  
Age and life style of the groups analysed in the study<sup>a</sup>

	Control	Exposed
Number of subjects	49	50
Age (years) (mean $\pm$ S.E.)	38.53 $\pm$ 1.56	39.14 $\pm$ 1.40
Years of pesticide exposure	–	16.28 $\pm$ 1.10
Smoking habit		
Number of non-smokers	20 (41%)	27 (54%)
Number of ex-smokers	1 (2%)	5 (10%)
Number of smokers	28 (57%)	18 (36%)
Cigarettes per day (mean $\pm$ S.E.)	10.54 $\pm$ 1.56	7.20 $\pm$ 1.47
Coffee (mean $\pm$ S.E.) <sup>b</sup>	1.57 $\pm$ 0.19	1.40 $\pm$ 0.16
Alcohol consumption (grams per week) (mean $\pm$ S.E.)	99.41 $\pm$ 16.37	127.48 $\pm$ 17.73

<sup>a</sup> Non-significant statistical differences between age and life style factors (*t*-test) of both groups.

<sup>b</sup> Cups per day.

Table 4  
Dietary factors in the two groups: frequency of consumption of different foods (times per week  $\pm$  S.E.)<sup>a</sup>

Food	Control	Exposed
Red meat	3.30 $\pm$ 0.24	3.84 $\pm$ 0.20
White meat	2.02 $\pm$ 0.18	2.18 $\pm$ 0.18
Fish	1.08 $\pm$ 0.11	1.18 $\pm$ 0.10
Raw vegetables	4.25 $\pm$ 0.36	4.90 $\pm$ 0.32
Cooked vegetables	3.39 $\pm$ 0.35	4.40 $\pm$ 0.32
Fruit (g per day)	212.96 $\pm$ 22.14	200.80 $\pm$ 23.78

<sup>a</sup> No statistical difference between both groups (*t*-test).

Table 5  
Mean values ( $\pm$ S.E.) of the cytogenetic parameters analysed<sup>a</sup>

Parameters	Control		Exposed	
	<i>N</i>	Mean $\pm$ S.E.	<i>N</i>	Mean $\pm$ S.E.
MNL	49	20.10 $\pm$ 1.34	50	20.16 $\pm$ 1.39
BNMN	49	17.67 $\pm$ 1.14	50	18.28 $\pm$ 1.28
MNBC	48	2.10 $\pm$ 0.40	49	1.88 $\pm$ 0.35
BCMN	48	1.92 $\pm$ 0.36	49	1.59 $\pm$ 0.23
CBPI	49	1.62 $\pm$ 0.03	50	1.57 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup> A total of 1000 cells per donor were scored.

combination of several environmental agents in their current job, and 25% of them lived in the proximity of farms.

Table 5 summarises the mean data of the cytogenetic variables studied and the cell proliferation index. Concerning the variables studied, the multiple regression analysis did not reveal significant differences between the control and the exposed groups.

Table 6  
Summary of the results obtained in the multiple linear regression analysis<sup>a</sup>

	<i>N</i>	<i>B</i>	$\beta$	<i>P</i>	Tolerance	<i>R</i> <sup>2</sup>
BNMN						
Intercept		4.361		0.000		0.065
Alcohol consumption (grams per week)	99	-0.002	-0.001	0.011	1	
MNL						
Intercept		4.605		0.000		0.060
Alcohol consumption (grams per week)	99	-0.002	-0.245	0.015	1	
CBPI						
Intercept		1.781		0.000		0.065
Age	99	-0.004	-0.255	0.011	1	

<sup>a</sup> *B*, non-standardised coefficient;  $\beta$ , standardised coefficient; *R*<sup>2</sup>, coefficient of determination.

Table 7  
Summary of the results obtained in the negative binomial regression analysis<sup>a</sup>

	<i>N</i>	<i>B</i>	<i>P</i>	Scale deviance	Value per d.f.
MNBC					
Intercept		0.246	0.458	102.911	1.083
Red meat	97	0.119	0.134		
BCMN					
Intercept		0.004	0.904	104.555	0.100
Red meat	97	0.139	0.064		

<sup>a</sup> d.f., degrees of freedom; *B*, non-standardised coefficient.

The multiple linear regression analysis did not show any effect of the exposure on the cytogenetic parameters studied. However, it did show that, from the selected lifestyle and dietary variables included in the analysis, only alcohol consumption appeared to be associated with a slight decrease in the frequency of MN (Table 6), being a negative relationship for both the BNMN and the total number of MNL. It can also be observed that the average number of hours per week spent applying pesticides was associated with a weak increase in BNMN. Nevertheless this association did not reach a significant level ( $P = 0.112$ ) and, consequently, the pesticide application variable was not included in the final model.

On the other hand, the multiple linear regression analysis indicated a negative relationship between the age of the individuals and the proliferation index ( $P = 0.011$ ).

The negative binomial analysis of epithelial buccal cells data (Table 7) shows that the total number of micronuclei in MNBC, as well as the frequency of BCMN were slightly affected by the ingestion of red meat in a positive direction.

The number of miscarriages in the control group was of 2/49, whilst in the exposed group it was of 11/50 (Fig. 1). The logistic binary regression analysis in which we studied the effect of exposure to pesticides, cigarettes, alcohol and age on the number of miscarriages, showed that only the exposure factor was directly associated with the number of miscarriages.

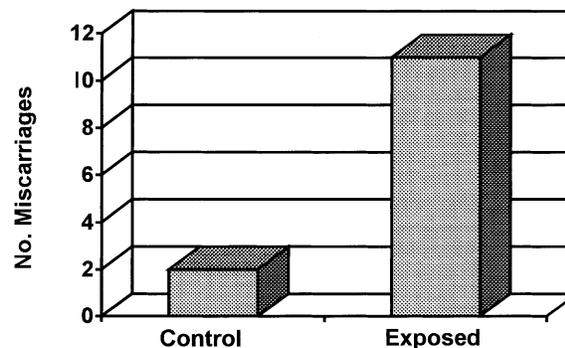


Fig. 1. Number of miscarriages in the study-groups. Significant effect of exposure to pesticides on miscarriage incidence ( $P = 0.019$ , logistic binary regression).

Table 8  
Final result of the logistic binary regression analysis of miscarriages<sup>a</sup>

	<i>N</i>	<i>B</i>	S.E.	<i>P</i>	<i>R</i>
Intercept		−3.135	0.806	0.000	0.219
Exposure	93	1.882	0.722	0.019	

<sup>a</sup> *B*, non-standardised coefficient; S.E. standard error.

The other variables were eliminated from the analysis due to the lack of relation (Table 8). When analysing the probability of miscarriages in both groups, using the logistic binary regression, 4% probability was observed in the control versus 22% in the exposed group.

#### 4. Discussion

The aim of this investigation was to determine if there is an increase in genetic damage in the particular group of farmers included in this study, that are usually exposed to complex mixtures of pesticides, when compared with a non-exposed control group with similar characteristics. Most biomonitoring studies choose peripheral lymphocytes as the representative target cell for analysis, whereas this study also includes buccal epithelial cells. It must be reminded that more than 90% of cancers are reported to have an epithelial origin [29,30] and that epithelial buccal cells have widely been used in human biomonitoring studies [31–33].

The results obtained in the present evaluation do not show any significant increase in the frequency of micronuclei (used as biomarkers of genetic damage) in neither peripheral blood lymphocytes nor epithelial buccal cells. This finding would indicate a lack of clastogenic and/or aneugenic effects related to the particular pesticide exposure of these farmers.

Biomonitoring studies of populations exposed to pesticides are quite difficult and rather specific because each population has a different lifestyle, nutritional habit, lives in different areas under different climatic and environmental conditions, and uses different mixtures of pesticides. This could explain why some studies find an increase of genetic damage in populations exposed to pesticides [16,17,34], whilst in other studies the results are negative [11,13,14]. The farmers monitored in the present study mainly

used 30 different chemical pesticides. Out of these, the US Environmental Protection Agency has classified nine of them as practically non toxic or slightly toxic, eight as moderately toxic, four as highly toxic, whilst the rest have not been classified. Although the exposure level can be considered significant, and information is available on the genotoxicity of several of the particular pesticides used, it must be recalled that there is a lack of information concerning the genotoxic effects of complex mixtures.

Another explanation for the lack of genotoxic damage observed can be the protective measures usually taken by the farmers. In the present study, and according to the questionnaire [24,25], 78% of the farmers used more than two kinds of protective measures which can reduce the actual exposure.

Despite the lack of cytogenetic damage related to the exposure to pesticides in both kinds of cells evaluated, the multiple linear and negative binomial regression analyses reveal that some of the confounding factors show a relationship with the cytogenetic variables analysed.

Thus, from the statistical analysis of data, alcohol consumption appeared to be associated with a slight decrease in the frequency of BNMN and MN in lymphocytes. The literature regarding alcohol consumption and MN induction in lymphocytes show both positive [35,36] and negative effects [37,38]. Alcohol might be related with another variable that would explain the effect observed in our study; in particular, age was inversely related with alcohol consumption (Spearman's coefficient of rank correlation,  $r_s = -0.217$ ,  $P = 0.031$ ). Therefore, it appears that young people, ingesting more alcohol, had a lower number of MN than older people. Nevertheless, the age effect was very low and this variable was not considered in the final analysis.

With regard to the buccal cells, both parameters studied (MNBC and BCMN) showed a positive relationship with the consumption of red meat, although not attaining a statistically significant level. There are few data on the influence of nutrition on cytogenetic damage, although some studies [39–41] emphasise the importance of dietary factors in modulating the induction of chromosome damage. Although the available data do not confirm that a vegetarian diet reduces the levels of MN in lymphocytes, a reduction of MN levels in male vegetarians between 40- and 60-year-old

was shown, while no differences were detected for other age groups [39]. In addition, the frequency of MN in a group of life-long vegetarians was significantly lower when compared to meat-eaters [41].

Unlike the lack of effect of pesticide exposure on MN of lymphocytes and buccal cells found in the present investigation, other studies on the same population conducted by Cebulska-Wasilewska et al. [23–25] showed that the level of various biomarkers in non-smokers exposed to pesticides were significantly higher than those detected in non-smoker controls (SCE,  $P < 0.015$ ; HFC,  $P < 0.022$ ; DNA comet tail moment,  $P < 0.007$ ) [42,43].

On the other hand, the reduction observed in the CBPI related to age, could indicate a delay in the cell cycle due to physiological aspects. Other studies on cell proliferation kinetics, measured by the replication index (RI), have found a correlation between age and RI [44], which reflect an age-related decline in the rate of blastogenesis [45].

An interesting point is the adverse effect of pesticide exposure on reproduction. It is well known that such exposure can reduce fertility [46], and increase the frequency of congenital malformations [47] and spontaneous abortions [48]. The results obtained in this investigation can be added to the list of effects of pesticides on reproduction, because we observed a significant increase in the number of miscarriages in farmers. This supports the results of Petrelli et al. [48] that showed an association between the increase of miscarriages and the father's exposure to pesticides.

Summing up, we cannot assert that pesticides did not induce any adverse effects in the specific group of farmers included in this study. We can only say that no increase in cytogenetic damage was found when evaluated by the MN assay, neither in lymphocytes nor in buccal epithelial cells, though an increase in the number of miscarriages associated with the exposure to pesticides was observed. Apart from the particular results reported here, two final considerations could also be made. Firstly, due to the assumptions and uncertainties associated with genotoxic evaluation of complex mixtures, the assessment is more problematic when the number of compounds in the mixture increases and, when insufficient empirical data are available, the characterisation of risk could be confounded by several factors. Secondly, it should be also taken into account that when the genotoxic agent(s)

is(are) considered to induce slight effects on the genotoxic endpoints analysed, the sample size needs to be large enough to efficiently detect such effects.

## Acknowledgements

We would like to gratefully acknowledge the technical assistance of G. Umbert and A. Corral, the statistical advice of Dr. P. Puig and L. Badiella (Servei d'Estadística, UAB), and the secretarial skills of M. McCarthy. This research was supported in part by a grant of the European Union (CT96-0300, INCO-COPERNICUS), awarded to Dr. S.M. Piperakis, from the National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece.

## References

- [1] M.M. Amr, Pesticide monitoring and its health problems in Egypt, a third world country, *Toxicol. Lett.* 107 (1999) 1–13.
- [2] W.W. Au, C.H. Sierra-Torres, N. Cajas-Salazar, B.K. Shipp, M.S. Legator, Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 501–505.
- [3] F. López, J. Obiols, P.J. Subias, 1998. Plaguicidas agrícolas y salud. In: I. Morell, L. Candela (Eds.), *Plaguicidas, Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*, Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, pp. 273–295.
- [4] M. Kishi, N. Hischhorn, M. Djajadisastra, L.N. Satterlee, S. Strowman, R. Dilts, Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers, *Scand. J. Work Environ. Health* 21 (1995) 124–133.
- [5] A. Blair, S.H. Zahm, Agricultural exposures and cancer, *Environ. Health Perspect.* 103 (S8) (1995) 205–208.
- [6] A. Blair, S.H. Zahm, N.E. Pearce, E.F. Heineman, J. Fraumeni Jr., Clues to cancer etiology from studies of farmers, *Scand. J. Work Environ. Health* 18 (1992) 209–215.
- [7] J.F. Viel, B. Challier, Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part? *Occup. Environ. Med.* 52 (1995) 587–592.
- [8] IARC, International Agency for Research on Cancer, Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. Vol. 53, 1991, IARC Monographs, Lyon, France.
- [9] A.V. Carrano, A.T. Natarajan, Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, *Mutat. Res.* 204 (1988) 379–406.
- [10] L. Hagmar, A. Brøgger, I.L. Hansteen, S. Heim, B. Högstedt, L. Knudsen, B. Lambert, K. Linnainmaa, F. Mitelman, I. Nordenson, C. Reuterwall, C. Salomaa, S. Skerfving, M. Sorsa, Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage, *Cancer Res.* 54 (1994) 2919–2922.

- [11] R. Scarpato, L. Migliore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Miligi, N. Loprieno, Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure, *Mutat. Res.* 367 (1996) 73–82.
- [12] W. Venegas, Y. Zapata, E. Carbonell, R. Marcos, Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción (Chile), *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 18 (1998) 123–129.
- [13] L. Lucero, S. Pastor, S. Suárez, R. Durbán, C. Gómez, T. Parrón, A. Creus, R. Marcos, Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells, *Mutat. Res.* 464 (2000) 255–262.
- [14] L.P. Gregorio D'Arce, I.M. Colus, Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil, *Teratog. Carcinogen. Mutagen.* 20 (2000) 161–170.
- [15] M. De Ferrari, M. Artuso, S. Bonassi, S. Bonatti, Z. Cavalieri, D. Pescatore, E. Marchini, V. Pisano, A. Abbondandolo, Cytogenetic monitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes, *Mutat. Res.* 260 (1991) 105–113.
- [16] C. Bolognesi, M. Parrini, S. Bonassi, G. Ianello, A. Salanito, Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 285 (1993) 239–249.
- [17] E. Carbonell, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides, *Mutagenesis* 8 (1993) 511–517.
- [18] J. Surrallés, E. Carbonell, R. Marcos, F. Degrossi, A. Antoccia, C. Tanzarella, A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 7 (1992) 407–410.
- [19] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Humelen, The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* 392 (1997) 19–30.
- [20] R.T. Przygoda, R.H. McKee, M.A. Amoroso, J.J. Freeman, Assessment of the utility of the micronucleus test for petroleum-derived materials, *Mutat. Res.* 438 (1999) 145–153.
- [21] S. Gómez-Arroyo, Y. Díaz-Sánchez, M.A. Meneses-Pérez, R. Villalobos-Pietrini, J. De León-Rodríguez, Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 466 (2000) 117–124.
- [22] L.G. da Silva Augusto, S.R. Lieber, M.A. Ruiz, C.A. de Souza, Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides, *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1997) 46–52.
- [23] A. Cebulska-Wasilewska, Z. Drag, E. Kasper, W. Dyga, A. Wierzewska, Monitoring of genotoxic effects in lymphocytes of people exposed to pesticides (Polish Group), Report INP No. 1831/B, 1999, 49–60.
- [24] A. Cebulska-Wasilewska, W. Dyga, A. Wierzewska, Z. Drag, C. Siffel, M. Horvath, W. Au, Monitoring of occupational exposure to pesticides (Polish Group), Report INP No. 1845/B, 2000, pp. 39–54.
- [25] A. Cebulska-Wasilewska, W. Dyga, A. Wierzewska, Z. Drag, C. Siffel, M. Horvath, W. Au, Induction of DNA and cytogenetic damage in lymphocytes of Polish workers exposed to pesticides, *Eur. J. Occup. Med.*, (2001) in press.
- [26] J. Surrallés, A. Antoccia, A. Creus, F. Degrossi, F. Peris, C. Tanzarella, N. Xamena, R. Marcos, The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories, *Mutagenesis* 9 (1994) 347–353.
- [27] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 341 (1995) 169–184.
- [28] N. Titenko-Holland, R.A. Jacob, N. Shang, A. Balaraman, M.T. Smith, Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of post-menopausal women with dietary changes in folate, *Mutat. Res.* 417 (1998) 101–104.
- [29] J. Cairns, Mutational selection and the natural history of cancer, *Nature* 255 (1975) 197–200.
- [30] M.P. Rosin, A. Gilbert, Modulation of genotoxic effect in humans, in: M.L. Mendelson, R.I. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment*, Part E. Wiley, New York, NY, 1990, pp. 351–359.
- [31] O. Torres-Bugarín, A. de Anda-Casillas, M. Ramírez-Muñoz, J. Sánchez-Corona, J. Cantú, G. Zúñiga, Determination of diesel genotoxicity in the fire-breathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa, *Mutat. Res.* 413 (1998) 277–281.
- [32] S.A. Salama, M. Serrana, W.W. Au, Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment, *Mutat. Res.* 436 (1999) 99–112.
- [33] B. Karahalil, A. Karakaya, S. Burgaz, The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mutat. Res.* 442 (1999) 29–35.
- [34] R.H.C. Son, M. Rosin, R.H. See, B.P. Dunn, H.F. Stich, Use of urine for monitoring human exposure to genotoxic agents, in: R. Wang, C.A. Franklin, J.C. Reinert (Eds.), *Biological Monitoring for Pesticide Exposure*, American Chemical Society, Washington, 1989, pp. 98–116.
- [35] E. Castelli, P. Hrelia, F. Maffei, C. Fimognari, F.G. Foschi, F. Caputo, G. Cantelli-Forti, G.F. Stefanini, G. Gasbarrini, Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence, *Hepatogastroenterology* 46 (1999) 1664–1668.
- [36] A.D. da Cruz, A.G. McArthur, C.C. Silva, M.P. Curado, B.W. Glickman, Human micronucleus counts are correlated with age, smoking and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident, *Mutat. Res.* 313 (1994) 57–68.
- [37] J. Surrallés, K. Autio, L. Nylund, H. Jarventaus, H. Norppa, T. Veidebaum, M. Sorsa, K. Peltonen, Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers, *Carcinogenesis* 18 (1997) 817–823.
- [38] R. Barale, L. Chelotti, T. Davini, S. Del Ry, M.G. Andreassi, M. Ballardini, M. Bulleri, J. He, S. Baldacci, F. Di Pede, F. Gemignani, S. Landi, Sister chromatid exchanges and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population. Part II. Contribution of sex, age and lifestyle, *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (1998) 228–242.

- [39] M. Fenech, J. Rinaldi, A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians, *Carcinogenesis* 16 (1995) 223–230.
- [40] M. Fenech, Chromosomal damage rate, ageing, and diet, *Ann. NY Acad. Sci.* 854 (1998) 23–26.
- [41] H.W. Davies, S.M. Kennedy, K. Teschke, P.J.E. Quintana, Cytogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes, *Mutat. Res.* 416 (1998) 101–113.
- [42] A. Cebulska-Wasilewska, W. Dyga, Variability in the repair of UV-induced DNA damage in lymphocytes from unexposed and exposed to pesticides group, Report INP No. 1831/B, 1999, pp. 85–92.
- [43] A. Cebulska-Wasilewska, W. Dyga, Z. Drag, Variability in the susceptibility to UV-induced DNA damage and repair capacity observed in lymphocytes from unexposed and exposed to pesticides Polish donors, Report INP No. 1845/B, Influence of occupational exposure to pesticides on lymphocyte responses to environmental and UV, 2000, pp. 55–70.
- [44] J.R. Lazutka, V. Dedonyte, D. Krapavickaitė, Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking, *Mutat. Res.* 306 (1994) 173–180.
- [45] G. Lucivero, G. Surico, G. Mazzini, A. Dell’Osso, L. Bonomo, Age-related changes in the proliferative kinetics of phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. Analysis by uptake of tritiated precursors of DNA, RNA and proteins, and by flow cytometry, *Mech. Ageing Dev.* 43 (1988) 259–267.
- [46] A. Abell, S. Juul, J.P. Bonde, Time to pregnancy among female greenhouse workers, *Scand. J. Work Environ. Health* 26 (2000) 131–136.
- [47] A. Rojas, M.E. Ojeda, X. Barraza, Congenital malformations and pesticide exposure, *Rev. Med. Chil.* 128 (2000) 399–404.
- [48] G. Petrelli, I. Figa-Talamanca, R. Tropeano, M. Tangucci, C. Cini, S. Aquilani, L. Gasperini, P. Meli, Reproductive male-mediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applications, *Eur. J. Epidemiol.* 16 (2000) 391–393.

### **Artículo 3**

Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus *analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells*

**Susana Pastor**, Sara Gutiérrez, Amadeu Creus, Noel Xamena, Stylianos Piperakis, Ricard Marcos

Mutagenesis, 16 (2001) 539-545