



Universidad de Carabobo



*Salus*

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud

## **Ensayo de micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas.**

### **Autores:**

***Tibisay Matheus Lobo: 1,2***

***Alba Bolaños: 1,3***

1. Universidad de Carabobo. Departamento Ciencias Morfopatológicas. Farmacología. Facultad de Odontología. Valencia. Edo. Carabobo.
2. Universidad de Carabobo. Maestría en Toxicología Analítica. Área de Postgrado. Facultad de Ciencias de la Salud. Valencia. Edo. Carabobo.
3. Universidad de Carabobo. Maestría en Biología Oral. Área de Postgrado. Facultad de Odontología. Valencia. Edo. Carabobo.

Nombre del Autor de correspondencia: ***Tibisay Matheus Lobo***

E-mail: [Tibisay\\_matheus@hotmail.com](mailto:Tibisay_matheus@hotmail.com) Telef: 0414-4156615

Título corto: Ensayo de micronúcleos



## **ENSAYO DE MICRONÚCLEOS: BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDAD EN EXPUESTOS A PLAGUICIDAS.**

### **RESUMEN.**

El uso de plaguicidas, a nivel mundial, ha permitido el control efectivo de plagas, aumentando la productividad agrícola, forestal y ganadera. Sin embargo, muchas de estas sustancias químicas representan peligros potenciales para la salud humana, pudiendo provocar alteraciones en el material genético y el posible desarrollo de algunos tipos de tumores. En consecuencia, se ha hecho necesario la búsqueda de métodos que permitan cuantificar el grado de inestabilidad, que estos productos puedan causar al material genético, entre ellos, el ensayo de micronúcleos (MN), que se basa en la detección y cuantificación de cuerpos citoplasmáticos semejantes al núcleo celular, cuyo origen se deriva de cromosomas, o fragmentos de estos que no se integran al núcleo durante la metafase, esto puede suceder de manera espontánea o por la acción de agentes genotóxicos. El propósito del artículo es presentar una revisión de 33 publicaciones en el período 2000-2013 a nivel mundial en individuos expuestos a plaguicidas, de los cuales 16 utilizaron el ensayo en cultivos de linfocitos en sangre, 13 en células epiteliales bucales y 4 en ambas técnicas. Aún, cuando existen discrepancias entre los autores en relación con la frecuencia de MN y diversos factores, este ensayo constituye una herramienta de monitoreo que permite obtener resultados rápidos y de gran sensibilidad para detectar daño en el ADN y de esta forma poder tomar medidas para el control de los riesgos genéticos asociado con la exposición a agentes tóxicos como los plaguicidas.

Palabras clave: Micronúcleos, Genotoxicidad, Biomarcador, Plaguicidas.

### **MICRONUCLEUS ASSAY: GENOTOXICITY BIOMARKER OF EXPOSED TO PESTICIDES ABSTRACT**

Pesticides use has allowed effective control of pests worldwide, increasing agricultural, forestry and livestock productivity. However, many of these chemicals pose potential risks to human health and it can cause alterations in the genetic material, and the possible development of some types of tumors. Consequently, it has become necessary to search for methods to quantify the degree of instability that these products can produce in the genetic material, including the micronucleus assay (MN), which is based on the detection and quantitation of cytoplasmic bodies similar to the cell nucleus, whose origin is derived from chromosomes or fragments thereof, which are not integrated to the core during metaphase, this could occur spontaneously or by the action of genotoxic agents. The purpose of this article is to present a review of 33 publications in the period 2000-2013 worldwide in individuals exposed to pesticides, which 16 used the assay in cultured lymphocytes in blood, 13 in buccal epithelial cells and 4 in both techniques. Even when there are discrepancies between the authors regarding the frequency of MN and various factors, this essay is a monitoring tool that provides fast results and high sensitivity for detecting DNA damage and thus able to take action for the control of genetic risks associated with exposure to toxic agents such as pesticides.

Key words: Micronucleus, Genotoxicity, Biomarker, Pesticide.



## INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias químicas ampliamente utilizados por el hombre, tanto para proteger de organismos nocivos la producción y calidad de las cosechas como para el control de vectores y plagas importantes en la salud pública. Su aplicación es la medida más efectiva y aceptada para el aumento de la productividad y rendimiento de cultivos (1).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (2).

Actualmente, hay diferentes clasificaciones para estas sustancias químicas, dependiendo del tipo de plagas en las que actúa se puede mencionar los insecticidas, herbicidas y fungicidas, cada una de estas categorías comprende una amplia diversidad de productos químicos con diferentes propiedades, efectos y clases químicas (organofosforados, organoclorados, tiazinas, entre otros) (3).

No obstante, a pesar de los efectos beneficiosos asociados con el uso de plaguicidas, muchos de estos productos químicos pueden presentar peligros potenciales para el medio ambiente y la salud humana (4,5). Sin embargo, las consecuencias de la exposición no



siempre están relacionadas con lesiones inmediatas y aparentes, sino que pueden tardar incluso años en manifestarse, por lo que se requiere de estudios de biomonitorización para evaluar las enfermedades agudas y crónicas ocasionadas por la exposición a plaguicidas (6).

Cabe destacar, que aunque la población general está expuesta a este tipo de compuestos, los trabajadores de la industria agroquímica y los agricultores constituyen un grupo de alto riesgo de exposición ocupacional y ambiental. Además, existe dificultad para la identificación de los efectos individuales de los plaguicidas, ya que frecuentemente se utilizan mezclas complejas, tanto por la aplicación de diferentes agentes químicos en simultáneo, como por la presencia de aditivos en formas comerciales (7,8), pudiendo ocasionar daños que se han asociado a la exposición crónica como son efectos inmunológicos, alteraciones en la reproducción y desarrollo, efectos carcinogénicos y neurotoxicidad (8).

En este sentido, existen evidencias del potencial impacto de los plaguicidas como disruptores endocrinos en la función reproductiva masculina, pudiendo causar daños en la cromatina de los espermatozoides, disminuyendo la calidad del semen y produciendo alteraciones de las hormonas masculinas que pueden conducir a resultados adversos (9). Las disfunciones reproductivas más reportadas como inducidas por la exposición crónica a plaguicidas son la disminución de la fertilidad en ambos sexos y el aborto involuntario (10).

Adicionalmente, el riesgo de contraer distintos tipos de cáncer, incluidos cáncer de piel y labio, cerebro, próstata, estómago, sistema linfohematopoyético (11), cáncer de ovario (12), y cáncer de mama (13) se asocia a la exposición ocupacional a plaguicidas. Recientemente, revisiones bibliográficas (14,15) han recopilado una variedad de publicaciones que relacionan diferentes tipos de neoplasias: leucemia, mielomas, melanomas, cáncer de pulmón, colón,



recto, páncreas, vejiga con los distintos grupos de plaguicidas, aunque algunos de estos estudios han diferido en la obtención de una conclusión definitiva.

No obstante, en el linfoma no-Hodgkin (NHL) se han asociado las frecuentes anomalías cromosómicas y mutaciones genéticas, en particular la translocación  $t(14; 18)(q32; q21)$  con la exposición a algunos organoclorados (clordano, ddt, lindano, toxafeno), organofosforados (diazinon, diclorvos, malatión) y derivados del ácido fenoxiacético (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (3).

Similarmente, los trastornos neurológicos también se han relacionado con la exposición a plaguicidas mostrando una mayor incidencia de la enfermedad de Parkinson (15-17). Aunque en menor proporción, se ha encontrado asociaciones directas y significativas entre la exposición a organofosforados y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (15,18). Durante la última década, varios informes indican relación entre el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con la exposición a los plaguicidas (15, 19,20).

Las patologías mencionadas anteriormente están relacionadas con el uso indiscriminado de plaguicidas, siendo de particular importancia las que conllevan a alteración en el material genético, el cual puede ocurrir tanto en células somáticas, originando cáncer que es un daño individual; así como en células germinales donde sus consecuencias se transmitirán a la prole. Dada las consecuencias de estas lesiones se debe dirigir la investigación hacia la prevención, ya que resulta imprescindible el empleo de biomarcadores como el ensayo de micronúcleos para la detección temprana de los efectos que pueden provocar estas sustancias. Por lo que el objetivo de esta revisión bibliográfica es presentar una recopilación de 33 publicaciones en el período 2000-2013 en individuos expuestos a plaguicidas, de los



cuales 16 fueron realizados en linfocitos de sangre periférica, 13 en células bucales y 4 con ambas técnicas. Los trabajos revisados conservan un diseño descriptivo y transversal obtenido a través de la base de datos PubMed y EBSCO. Los resultados estadísticos se analizaron con el programa Graphpad prism 5.

## Micronúcleos (MN)

Los MN son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas, este proceso puede producirse equívocamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, roturas cromosómicas, efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas; lo que trae como consecuencia, pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo (21). Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos hijos, estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio óptico (Fig1)

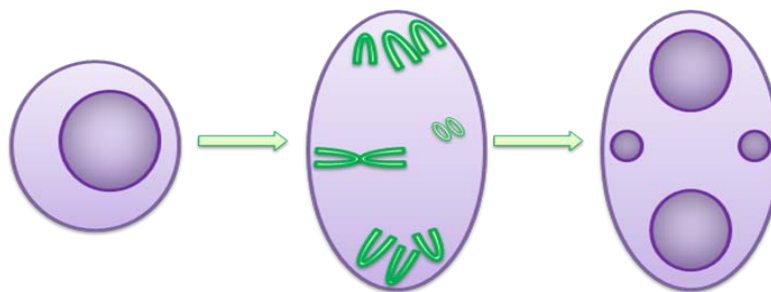


Figura 1. Formación de Micronúcleos en el curso de la división celular.



Considerando que los plaguicidas pueden ocasionar daño genético y propiciar la transformación celular, la técnica de MN es utilizada por su alta confiabilidad y bajo costo, contribuyendo al éxito y a la adopción de éste biomarcador para estudios, *in vitro e in vivo*, de daños al genoma humano (22).

### **Ensayo de MN en cultivo de linfocitos**

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica (21). Más tarde, en 1985, el ensayo fue mejorado consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) empleando un agente químico (citocalasina-B) a fin de impedir la citocinesis celular (21,23).

La técnica fue validada a nivel mundial en 1999, por el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), con la participación de 42 laboratorios (aproximadamente 16500 individuos de diferentes poblaciones del mundo). El protocolo básico consiste en el aislamiento de los linfocitos, el recuento celular y siembra, bloqueo de la división celular y el sometimiento de la célula a un choque hipotónico, se fijan las células con una solución de metanol: ácido acético glacial y se tiñen las preparaciones con Giemsa para ser visualizadas al microscopio (21).

### **Ensayo de MN en células bucales**

El ensayo de MN también se puede realizar en células bucales. Es considerado un tejido ideal para aplicar la técnica de MN y detectar anomalías nucleares sin necesidad de



cultivos celulares, lo que representa una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos en poblaciones de alto riesgo (24).

La presencia de MN y otras anomalías nucleares dentro de estas células, se asocia con defectos genéticos en el mantenimiento del genoma, envejecimiento acelerado, daño genotóxico y algunas enfermedades degenerativas. En el 2007 en Turquía se realizó el Human Micronucleus Project on exfoliated buccal cells (HUMN<sub>XL</sub>), basado en la experiencia del (HUMN) con la participación de 58 laboratorios de 25 países (25). Cabe destacar que Venezuela país agrícola, donde los plaguicidas son ampliamente utilizados, no participó con ningún estudio en esta validación ni en la del HUMN en linfocitos.

Específicamente, los MN observados en células exfoliadas de tejido epitelial se forman en las células de la capa basal que es donde se lleva a cabo la división celular; la muestra se toma mediante un raspado de mucosa, se realiza el extendido en portaobjetos perfectamente limpios, se fijan en etanol al 80%, se tiñen con colorantes básicos o específicos para ADN y se analizan entre 500 a 4000 células (26). El conteo de los MN se puede realizar fácilmente en cualquier tejido que se divida (25,27).

### **Aportes de la técnica de MN como biomarcador de genotoxicidad en individuos expuestos a plaguicidas.**

En los últimos años se ha utilizado el ensayo de MN para evaluar el efecto genotóxico de los plaguicidas, en una revisión de 49 publicaciones realizadas en diferentes partes del mundo entre 1987-2012 (28), se encontraron 30 estudios con diferencias significativas en comparación con los controles. América Latina también ha sido objeto de revisiones similares una de ellas realizada entre 1985-2013 reporta 24 estudios que utilizaron el ensayo de MN;





14 en linfocitos en sangre periférica y 10 en células del epitelio bucal, de los cuales 19 presentaron diferencias significativas en comparación con el grupo no expuesto (29).

Es notorio el auge del uso del ensayo de MN en el monitoreo de poblaciones expuestas a plaguicidas, por lo que la presente revisión realizada a 33 publicaciones en el período 2000-2013 a nivel mundial, muestra los resultados de 16 estudios realizados en cultivos de linfocitos reportando 14 positivos (87,5%) y 2 negativos (12,5%) (Tabla 1).

En cuanto a los que utilizan el ensayo en células epiteliales bucales se presenta una recopilación de 13 estudios de los cuales 10 tienen un resultado positivo (76,92%) y 3 negativos (23,08%) (Tabla 2). En total la frecuencia de MN en personas expuestas a plaguicidas relacionadas con los grupos no expuestos fue de 24 estudios con resultados positivos (72,73%) y 9 (27,27%) con resultados negativos. Al analizar los estudios donde la diferencia no es significativa, se puede atribuir a la utilización de productos más seguros y mejor uso de los equipos de protección (30); en otro estudio (31) refiere que fue utilizado un solo herbicida (simazina) y por ello una menor toxicidad, ya que existe evidencia que las mezclas de plaguicidas son más tóxicas que individualmente (1,7).

Algunos de estos estudios han tomado en cuenta variables como edad, años de exposición, hábito de fumar, consumo de alcohol, polimorfismos asociados, sexo, uso de equipos de protección, entre otros. Aunque todos estos factores se han relacionado con la incidencia de MN no existen resultados concluyentes.

Al relacionar el aumento de la frecuencia de MN con la edad, algunos autores (32-34) encontraron diferencias significativas, difiriendo con otros (35-40) que no encontraron



relación, esto pudiera atribuirse al incremento en la acumulación de daño en el ADN, deterioro progresivo de la capacidad de reparación y el aumento de radicales libres en las células (33-34) aunque son características propias del incremento de la edad se ha evidenciado un aumento exponencial de la frecuencia de MN con el paso de los años en expuestos a plaguicidas.

Al analizar, estilo de vida, hábitos de fumar y consumo de alcohol, un estudio encuentra que hubo diferencia significativa entre el grupo de fumadores y la frecuencia de MN (41) en contradicción con otros estudios (32, 35-38, 42-44). Esta variable no ha sido concluyente ya que en muchos trabajos no se caracteriza la población estudiada en cuanto a cantidad consumida de cigarrillos o alcohol, estilos de vida, dieta, entre otros. Los participantes no aportan información fidedigna, o no ha sido tomado en cuenta por la diversidad de factores de confusión que se pudieran presentar.

En cuanto a los años de exposición y la frecuencia de MN diferentes investigaciones encontraron una correlación positiva con el grupo no expuesto (5,6, 33,44-46). Es una variable difícil de cuantificar, ya que en muchas ocasiones la exposición no es continua, existiendo intervalos en que no se utilizan los plaguicidas o períodos de descanso entre una siembra y otra, sin embargo, se puede deducir que existe un daño crónico acumulativo, que se va incrementando con el paso del tiempo y los años de exposición coincidiendo con observaciones de otra investigación (6). En el caso de exposiciones crónicas, los efectos que se observan son resultado de una exposición continua a diferentes compuestos y en concentraciones desconocidas, a mayor tiempo de exposición, mayor cantidad de producto que se puede acumular en el organismo con diferentes manifestaciones sobre la salud. Sin



embargo esta variable no ha sido concluyente ya que hay autores que no encontraron relación significativa (35-37,39,40,42,47) y otros estudios no incluyen evidencia de este factor.

Las condiciones de exposición también se han asociado con un aumento en el daño citogenético, con una mayor frecuencia de MN en trabajadores de invernadero en comparación con los sujetos que trabajan al aire libre en los campos (33,44), ya que al estar en espacios cerrados es favorecido el proceso de absorción de sustancias tóxicas.

En cuanto al género diferentes estudios encuentran una mayor incidencia en la frecuencia de MN en mujeres (32,46,48), en contradicción con otros (35,38,49). Adicionalmente se han reportado abortos espontáneos o nacimiento de niños muertos en mujeres con MN elevados atribuyendo este hallazgo a una mayor sensibilidad del sexo femenino a los plaguicidas (50). Al referirse al uso de los equipos de protección (EP) ha sido difícil unificar criterios, pues existen gran variedad de estos y no siempre se especifica los elementos utilizados, además de no tener la certeza que sean utilizados durante todo el proceso de manejo de los plaguicidas. Sin embargo el uso de EP es primordial para reducir el contacto directo con estas sustancias y es recomendado como medida de protección en diferentes estudios. A pesar de ello, algunos autores han referido no encontrar relación con EP (32,39,40).

La susceptibilidad de los individuos a los efectos genotóxicos de plaguicidas puede ser modulada por variaciones genéticas en la detoxificación de xenobióticos y los procesos de reparación del ADN. Se han estudiado polimorfismos que pudieran modificar la susceptibilidad individual a los plaguicidas, algunos fueron realizados en linfocitos (33,51) y otros en células bucales (39).



Los estudios revisados en los que han utilizado el ensayo de MN tanto linfocitos como en células bucales, se evidenciaron diferencias entre las frecuencias de MN como se observa en la tabla 3. Ambos son predictivos de genotoxicidad, sin embargo, la utilización en sangre periférica arrojó en promedio resultados más elevados en la cantidad de MN presentes ( $11,117 \pm 1,4665$ ) en comparación con los encontrados en las células bucales ( $1,565 \pm 0,3196$ ), esto se pudiera explicar por las características del epitelio de la mucosa bucal, el cual es reconocido por su alta proliferación, lo que permite que la población celular se mantenga constante, esta particularidad lo hace más sensible a daños en el ADN por lo que cobra relevancia como predictivo de cáncer, ya que se estima que el 90% de esta patología es de origen epitelial (24,27). Los MN observados en células del tejido epitelial se forman en las células de la capa basal que es donde se lleva a cabo la división celular, estas migran a la superficie en el transcurso de 5 a 14 días (24) por lo que el monitoreo en este tejido puede reflejar una exposición aguda y la obtención de valores más bajos por la menor acumulación de células con MN, comparadas con las obtenidas en sangre periférica donde el tiempo de vida de las células es mayor, por lo que se podría asociar como biomarcador en exposiciones crónicas.

TABLA 1. Estudios de biomonitoreo utilizando cultivo de linfocitos en sangre

Expuestos/ No expuestos	Variable relacionada	Resultados	Frecuencia de MN Expuestos/ No expuestos	Referencia	País
32/37	MN	Negativo $p > 0,05$	4,9/ 5	Ramirez y Cuenca 2001(50)	Costa Rica
107/61	BNMN	Positivo $p < 0,001$	$4,41 \pm 2,14 / 3,04 \pm 2,14$	Bolognesi et al 2002 (44)	Italia
20/20	MN	Positivo $p < 0,05$	$30,5 \pm 8,73 / 3,85 \pm 1,60$	GarajVrhovac V , Zeljezic D 2002 (43)	Croacia
34/26	MN	Negativo	$2,00 \pm 0,19 / 2,64 \pm 0,30$	Suarez et al 2003(52)	España
31/30	MN	Positivo	$2,1 \pm 1,3 /$ No reportada	Varona et al	Colombia



		p = 0,02	2003(53)		
64/30	BNMN MN	Positivo p < 0,001	36,94± 14,47/9,93± 6,17 42,89± 17,72/ 10,90 ±7,01	Márquez et al 2005(47)	Chile
29/35	BNML MN	Positivo p < 0,001	12,62±1,47/6,11±1,95 20,41±4,63/ 9,03±2,46	Bhalli, etal 2006(5)	Pakistan
15/10	MN	Positivo p < 0,05	8,1 ± 1,4 /4,6 ± 0,8	Tope etal 2006(54)	EEUU
33/33	MN	Positivo p < 0,005	9,03± 1,04/3,27± 0,37	Costa et al 2006 (33)	Portugal
29/30	MN BNMN	Positivo p < 0,05	15,81 ± 1,31 / 4,71 ±0,42 15,10 ± 1,22 / 4,62 ± 0,44	Khedy et al 2007(55)	Brasil
137	BNMN	Positivo	8,64± 2,61/1,83± 0,97	Bolognesi et al 2009 (48)	Colombia
108/65	MN	Positivo p < 0,001	7,34±4,82 /4,33± 5,42	Rohr et al 2011(51)	Brasil
17/15	MN	Positivo p < 0,001	7,75±0,61 /7,25±0,52	Peralta et al 2011(45)	Argentina
25/15	MN	Positivo	H:15,9± 2,9/8,1± 1,83 M:18,1±1,7/13,1±17	Zuñiga et al 2012 (46)	México
132	MN	Positivo	M > proporción de MN	Arellano et al 2012(32)	México
20/10	CBMN MN	Positivo p < 0,05	15,15±5,10/ 7,20±1,55 16,60±5,66/ 7,40± 1,35	Gentile, et al 2012(34)	Argentina

MN: Micronúcleo; BNMN /CBMN: Frecuencia de células binucleadas con MN; H:Hombres; M: Mujeres

TABLA 2. Estudios de biomonitorio utilizando Células epiteliales bucales

Expuestos/ No expuestos	Variables relacionadas	Resultados	Frecuencia de MN Expuestos/ No expuestos	Referencia	País
30/30	MN	Positivo p < 0,001	1,01 ± 0,03/0,38 ± 0,021	GómezArroyo et al 2000 (49)	México
40/44	MN	Negativo. p > 0,05	0,0310/0,0380	Castro et al 2004(56)	Costa Rica
54/54	MN	Positivo p < 0,05	1,24 ± 0,72 /0,32± 0,26	Sailaja, et al 2006 (38)	India
32/32	MN	Positivo p < 0,001	2,36 ± 0,31/ 2,00 ± 0,78	Ergene et al 2007(41)	Turquia
37/20	MN	Negativo		Remor et al 2009(36)	Brasil
70/70	MN	Positivo p < 0,05	2,83± 0,35/0,37± 0,10	Martinez et al 2009(35)	México
29/37	MN	Positivo P= 0,01	3,55±2,13 / 1,78± 1,23	Bortoli 2009 (37)	Brasil
118/90	MN	Positivo	4,75±0,33/ 2,16± 0,51 P < 0,05	Larrea 2010 (6)	Bolivia
8/15	MN	Negativo P > 0,05	0,09% /0,11%	Lamadrid et al 2011(57)	Cuba
30/30	MN	Positivo P < 0,001		Kvitko et al 2012 (39)	Brasil
81/46	MN	Positivo P < 0,001	3,4 ± 2,5/ 1,5± 1,7	Benedetti et al 2013 (40)	Brasil
125/125	MN	Positivo P < 0,001	3,6± 0,79 /0,6±0,15	Gomez et al 2013 (58)	México



41/32	MN	Positivo $p < 0,0001$	0,008/0,001	Khayat et al 2013 (50)	Brasil
-------	----	--------------------------	-------------	---------------------------	--------

TABLA 3. Estudios de biomonitoreo en células epiteliales bucales y cultivo de linfocitos en sangre

Expuestos/ No expuestos	Variables relacionada	Resultados	Frecuencia de MN Expuestos/ No expuestos	Referencia	País
64/50	BNMN MNL MNMC	Negativo	8,72± 0,726 / 7,32 ± 0,641 9,53 ± 0,863/ 7,90± 0,125 1,83± 0,129 / 1,77± 0,125	Lucero et al, 2000 (59)	España
50/66	BNMN MNL BCMNM MNMC	Negativo	11,12± 0,82/ 14,42±1,29 12,22± 0,93/16,38±1,50 1,45± 0,23/1,73 ± 0,19 1,55± 0,26/ 2,00±0,25	Pastor et al 2001 (60)	Grecia
84/65	BNMN MNL BCMNM MNMC	Negativo	9,30± 0,70/9,15±0,91 10,22± 0,81/10,30±0,97 1,62±0,23/1,98± 0,51 1,76± 0,29/2,36± 0,66	Pastor et al 2002(61)	Hungría
239/231	BNMN MNL BCMNM MNMC	Negativo	11,40± 0,49/1,25 ± 0,60 12,5 ± 50,55/13,8± 0,69 1,03± 0,09 / 1,06 ± 0,10 1,12 ± 0,10/ 1,18 ± 0,12	Pastor et al 2003 (62)	Países europeos

BNMN: Frecuencia de células binucleadas con MN en linfocitos; MNL: Micronúcleos en linfocitos; BCMN: Frecuencia de células binucleadas con MN en células bucales; MNMC: Micronúcleos en células bucales.

### Importancia del Ensayo de MN en la detección del riesgo cancerígeno de los plaguicidas.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; datos aportados por la OMS revelan que en el año 2008 causó 7,6 millones de defunciones (63,64), por lo que es necesario implementar técnicas que ayuden a una detección temprana ya que algunos tipos de cáncer pueden ser curables si se inicia el tratamiento oportunamente (64).

En este sentido, investigaciones *in vitro* e *in vivo*, así como los estudios epidemiológicos han demostrado la capacidad de ciertas sustancias, incluyendo los plaguicidas, de producir efectos genotóxicos, los cuales han sido asociados al cáncer y otras patologías crónicas en los seres humanos (65), esto ha conducido al desarrollo de pruebas citogenéticas como el ensayo de MN, que han mostrado aumento significativo de MN en pacientes con cáncer (25).



Los daños genéticos son causados por la interacción directa con el material genético como resultado de daños en el ADN o aberraciones cromosómicas y están considerados como un mecanismo principal en enfermedades crónicas en el contexto de la carcinogénesis y teratogénesis (15). Estos daños genéticos pueden ser: 1. Premutagénicos (rupturas de filamentos de ADN, formación de aductos, o síntesis no programada de ADN), 2. Mutación del gen (inserción o delección de un par de pares de bases), 3. Aberraciones cromosómicas, (incluyendo la pérdida o ganancia de todo el cromosoma, aneuploidía, supresión o rupturas, clastogenicidad, y segmentos cromosómicos o reordenamientos). Los daños premutagénicos pueden ser reparados antes de la división celular, mientras que los daños en el segundo y tercer grupo son permanentes y tienen la capacidad de transmisión a las células hijas tras la división celular (15).

Las mutaciones somáticas (alteraciones en el ADN) se consideran responsables en la fase de iniciación del proceso carcinogénico, producen lesiones en el material genético celular sin llegar a inducir tumores, es decir, solo producen células iniciadas las cuales pueden morir o persistir toda la vida, pero si en esta fase interviene un promotor se desarrolla el efecto carcinogénico (66).

Ciertas observaciones apoyan la posible relación entre la aparición de micronúcleos y la incidencia de cáncer (12,14,15,18,67). A pesar que la relación no es estrictamente lineal: reordenamientos cromosómicos y formación de puentes-anafase, conducen a ciclos de rompimiento-fusión-puente y la generación de más MN; estos eventos se ven comúnmente en las primeras etapas de la carcinogénesis, por lo que elevados niveles de micronúcleos son indicativos de defectos en la reparación del ADN y en los cromosomas segregados, lo cual daría por producto células hijas con alteración en la dosificación de genes o con



desregulación de la expresión génica, lo que podría llevar a la evolución del fenotipo cromosómico inestable observado comúnmente en el cáncer (67).

### **Perspectivas futuras del ensayo de MN en expuestos a plaguicidas.**

La realización de estudios en poblaciones expuestas a plaguicidas, incluyendo su descendencia que puede ser vulnerable a los efectos de estas sustancias, es un desafío de cara al futuro, el ensayo de MN representa una oportunidad para generar cohortes en forma prospectiva y evaluar efectos en la salud. A pesar que esta prueba ha dado importantes aportes en el campo de la genotoxicidad, existen datos que aún no son concluyentes; por lo que resulta imprescindible caracterizar las poblaciones participantes, tener una mayor similitud en los grupos de comparación tanto en los expuestos como en los controles, aumentar el número de participantes, unificar protocolos y criterios utilizados.

### **CONCLUSIONES**

El ensayo de MN es una herramienta valiosa que permite de forma rápida y confiable, la detección de alteraciones en el material genético en poblaciones expuestas a sustancias tóxicas como son los plaguicidas. Es un método que ha sido validado internacionalmente, demostrando que el análisis en sangre periférica es más específico en exposición crónica, mientras que el de células de la mucosa bucal parece ser indicativo de exposición aguda.

Existen numerosos factores que han sido relacionados con el aumento en la frecuencia de MN: edad, años de exposición, hábito de fumar, consumo de alcohol, polimorfismos asociados, sexo, uso de equipos de protección, entre otros, sin embargo, hay discrepancia entre los estudios no pudiendo ser concluyentes.





Este ensayo permite predecir riesgo de cáncer y otras patologías crónicas cuando afecta la línea somática. Y si el daño se induce en células germinales puede tener efectos sobre la fertilidad y su progenie, por lo que los agricultores deben tomar conciencia en el uso de plaguicidas menos tóxicos además de instaurar programas de vigilancia epidemiológica en todas las zonas agrícolas, educar a la población que es la base de la prevención y así proteger a las personas expuestas, su entorno familiar, inclusive su descendencia.

Finalmente, se recomienda la realización en el país el monitoreo de las poblaciones expuestas a estas sustancias, ya que los plaguicidas son ampliamente utilizados sin un estricto control y vigilancia sanitaria, por lo que este ensayo, aún cuando no se encontraron publicaciones nacionales en esta área existen referencias con otras sustancias tóxicas, lo que permitiría que Venezuela se encuentre a la par en investigaciones en el campo de los plaguicidas.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la Profesora Yalitzka Aular de la Universidad de Carabobo, Valencia, por sus sugerencias e incondicional apoyo.

### **REFERENCIAS**

1. Martínez C, Gómez S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient* 2007; 23:185-200.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1996. Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w1604s/w1604s04.htm#TopOfPage>. (Acceso 18 de diciembre 2013).
3. Brian C, Aaron B. Pesticides, Chromosomal Aberrations, and Non- Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Agromedicine* 2009; 14: 250-255.
4. Muñoz M. Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. *Acta Bioeth* 2011; 17: 95-104.



5. Bhalli J, Khan Q, Haq M, Khalid A, Nasim A. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis* 2006; 2: 143–148.
6. Larrea M, Tirado N, Azcarruns M. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. *Biofarbo* 2010; 18: 31-43.
7. Coalova I, Mencacci S, Fassiano A. Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta Toxicol Argent.* (2013) 21: 5-14
8. Simoniello M, Kleinsorge E, Carballo M. Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (B Aires)* 2010; 70: 489-498
9. Miranda L, Gómez R, Rojas G, Cruz I, Berrueta L, Salmen S, et al. Occupational Exposure to Organophosphate and Carbamate Pesticides Affects Sperm Chromatin Integrity and Reproductive Hormone Levels among Venezuelan Farm Workers. *J Occup Health* 2013; 55:195-203.
10. Frazier LM. Reproductive disorders associated with pesticide exposure. *J Agromedicine* 2007; 12: 27-37.
11. Partanen T, Monge P, Wesseling C. Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense* 2009; 51: 195-205.
12. Alavanja M, Sandler D, Lynch C, Knott C, Lubin J, Tarone R, et al. Cancer incidence in the agricultural health study. *Work Environ Health* 2005; 31:39-45.
13. Santamaría C. El impacto de la exposición a plaguicidas sobre la Incidencia de Cáncer de mama. Evidencia de Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica* 2009; 7: 1-35.
14. Weichenthal S, Moase C, Chan P. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort. *Cien Saude Colet.* 2012; 17: 255-70.
15. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268: 157-77.
16. Freire C, Koifman S. Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology* 2012; 33: 947-71.
17. Van Maele-Fabry G, Hoet P, Vilain F, Lison D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Int* 2012; 46: 30-43.
18. Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 256: 379-85.
19. Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J. Are environmental exposure to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis?. *Rev Environ Health* 2012; 27:19-41.
20. Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case control study. *Ann Ist Super Sanita* 2010; 46: 284-7.
21. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist Sanit Navar* 2005; 28: 227-236.
22. Benítez-Leite S, Macchi ML, Fernández V, Franco D, Ferro E, Mojoli A, Cuevas F, Alfonso J, Sales L. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr (Asunción)* 2010; 37: 97-106.
23. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455: 81-95.



24. Torres O, Ramos M. Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *Int. J. Morphol* 2013, 31:650-657.
25. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNxl): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res* 2011; 728:88-97.
26. Ceppi M, Gallo F, Bonassi S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis* 2011; 26: 247-52.
27. Holland N, Bolognesi C, Kirsh-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008; 656: 93-108.
28. Aiassa D, Mañas F, Bosch B, Gentile N, Bernardi N, Gorla N. Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta biol. Colomb* 2012; 17: 485 – 510.
29. Gómez S, Martínez C, Calvo S, Villalobos R, Waliszewski S, Calderon M, et al. Assessing the genotoxic risk for mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications. *Rev Int Contam Ambie* 2013; 29: 217-225.
30. Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: esse of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003; 18: 249-58.
31. Suárez S., Rubio A., Sueiro R, Garrido J. Sister chromatid exchanges and micronuclei analysis in lymphocytes of men exposed to simazine through drinking water. *Mutat. Res* 2003; 537: 141–149.
32. Arellano M, Camarena O, Von-Glascoe C, Ruiz B, Zuñiga E, Monraño T. Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos en cuatro localidades de Baja California. En: Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naryrales (SEMARNAT). Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas. México 2012; p. 95-113.
33. Costa C, Texeira J, Silva S, Roma-Torres J, Coehlo P, Gaspar J, et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 2006; 21: 343-350.
34. Gentile N, Mañas F, Bosch B, Peralta L, Gorla N, Aiassa D. Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 88: 816-22.
35. Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R, at al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, México. *Environ Int* 2009; 35: 1155-9
36. Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD, Boeira JM. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int.* 2009; 35: 273-8.
37. Bortoli GM, Azevedo M, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res* 2009; 675: 1-4.



38. Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi P, Mahbooba M, Rahmana M, Saleha B, et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat. Res* 2006; 609: 74–80.
39. Kvitko K, Bandinelli E, Henriques JA, Heuser VD, Rohr P, da Silva FR, et al. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genet Mol Bio* 2012; 35: 1060-8.
40. Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Dos Santos CE, Dias JF, da Silva J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assay. *Mutat Res* 2013; 752: 28-33.
41. Ergene S, Celik A, Cavas T, Kaya F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int* 2007; 33: 877- 85.
42. Khayat CB, Costa EO, Gonçalves MW, da Cruz e Cunha DM, da Cruz AS, de Araújo Melo CO, et al. Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013;20: 7334-40.
43. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 249-5.
44. Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis* 2002; 17: 391-7.
45. Peralta L, Mañas F, Gentile N, Bosch B, Méndez A, Aiassa D. Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio de un caso en Córdoba, Argentina. *Diálogos. Revista científica de psicología, ciencias sociales, humanidades y ciencias de la salud* 2011; 2: 7-26.
46. Zúñiga E, Arellano E, Camarena L, Daesslé W, Von-Glascoe Ch, Leyva C, Ruiz B. Daño genético y exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas del Valle de San Quintín, Baja California, México. *Rev Salud Ambient* 2012; 12: 93-101.
47. Márquez C, Villalobos C, Poblete S, Villalobos E, de Los Angeles García M, Duk S. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environ. Mol. Mutagen* 2005; 45: 1–7.
48. Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A*. 2009; 72:986-97.
49. Gómez-Arroyo S, Díaz-Sánchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, De León-Rodríguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res* 2000; 466:117-24.
50. Ramírez V, Cuenca P. Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Rev Biol Trop* 2001; 49: 1-8.
51. Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antônio Pêgas Henriques J, et al. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52: 20-7.
52. Suárez S., Rubio A., Sueiro R. y Garrido J. Sister chromatid exchanges and micronuclei analysis in lymphocytes of men exposed to simazine through drinking water. *Mutat. Res* 2003; 537: 141–149.



53. Varona M, Cárdenas O, Crane C, Rocha S, Cuervo G, Vargas J. Alteraciones citogenéticas en trabajadoras con riesgo ocupacional de exposición a plaguicidas en cultivos de flores en Bogotá. *Biomédica* 2003; 23: 141-152.
54. Tope A, Bebe F, Panemangalore M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *J Environ Sci Health* 2006; 41: 843-853.
55. Kehdy FS, Cerqueira EM, Bonjardim MB, Camelo RM, Castro MC. Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. *Genet Mol Res* 2007; 6: 581-93
56. Castro R, Ramírez V, Cuenca P. Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev biol trop* 2004; 52: 611-621.
57. Lamadrid A, Romero I, González J, Mandina T. Biomonitorio de trabajadores expuestos a plaguicidas. *Rev Cubana Invest Biomed* 2011; 30: 235-244.
58. Gómez S, Martínez C, Calvo S, Villalobos R, Waliszewski S, Calderon M, et al. Assessing the genotoxic risk for mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications. *Rev Int Contam Ambie* 2013; 29: 217-225.
59. Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish green house workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res* 2000; 464: 255-262.
60. Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001; 16: 539-45.
61. Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C, Marcos R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ Mol Mutagen* 2002; 40: 101-109.
62. Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: essay of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003; 18: 249-58.
63. Organización Mundial de la Salud, 2013. Cáncer. Nota descriptiva N°297. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. (Acceso 18 de diciembre 2013).
64. Organización Mundial de La Salud, 2006. Cancer Control: knowledge into action. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/modules/Modules%20Flyer.pdf>. (Acceso 18 de diciembre 2013).
65. Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 2011; 26: 19-26.
66. Hoyos L. Genotoxicidad de los plaguicidas: Mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad. . En: Córdoba D. Toxicología. Bogotá: Manual Moderno; 2001. p. 197-226.
67. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 3: 625-31.