

Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts?

Coalova, Isis^{1*}; Mencacci, Santiago²; Fassiano, Anabella V.^{1,3}

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, 2° Pabellón, 4° piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CP 1428), Argentina. TE: 54-11-4576-3342, Fax: 54-11-4576-3342.

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. ³Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET), Rivadavia 1917, Buenos Aires, Argentina.

*icoalova@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 05 de mayo de 2012

Aceptado: 29 de octubre de 2012

Resumen. Un factor decisivo de la Revolución Verde ha sido el desarrollo y aplicación de plaguicidas para combatir una gran variedad de organismos considerados perjudiciales por el hombre, que afectan la productividad de los cultivos de interés agronómico. Sin embargo, el incremento sostenido del uso de pesticidas trajo aparejado un aumento de la presencia de los mismos en el ambiente, llegando a afectar a los ecosistemas y a la salud humana. La exposición de las poblaciones a plaguicidas, se da en forma de mezclas complejas, tanto por la aplicación de distintos plaguicidas en simultáneo como por la presencia de aditivos en las formulaciones comerciales.

Teniendo en cuenta la producción científica relacionada en los últimos años, el objetivo de este trabajo fue evaluar los avances sobre la genotoxicidad de pesticidas y sus mezclas, en concentraciones similares a las encontradas en el ambiente. Además, dada la complejidad de los estudios de monitoreo y la imposibilidad de establecer correlaciones directas, se propone reconocer la utilidad de los ensayos de corto plazo en niveles de evaluación de menor complejidad como una aproximación al contexto real.

Palabras clave: Genotoxicidad; Mezclas; Pesticidas; Monitoreo.

Abstract. A crucial factor of the Green Revolution has been the development and application of pesticides to prevent the potential harm of a variety of organisms that affect crop yields of agronomic interest. However, the sustained increase in the use of these compounds resulted in an enhancement of their presence in the environment, affecting ecosystems and human health. Populations are exposed to complex pesticide mixtures because they are usually combined and commercial formulations content several additives.

Considering the scientific output on the subject in recent years, the aim of this work is to evaluate advancement on the genotoxicity of pesticides and their mixtures at similar concentrations to those found in the environment. Moreover, given the complexity of monitoring studies and the lack of certainty to establish direct correlations, it is proposed to recognize the applicability of short-term tests of minor complexity as an approximation to the real context.

Keywords: Genotoxicity; Mixtures; Pesticides; Monitoring.

INTRODUCCION

Un factor decisivo de la Revolución Verde ha sido el desarrollo y aplicación de plaguicidas para combatir una gran variedad de organismos considerados perjudiciales por el hombre, que afectan la productividad de los cultivos de interés agronómico. Se entiende por "*plaguicida*" o "*pesticida*" cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, duran-

te la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos (Hayes 1974; Food and Agriculture Organization (FAO) y World Health Organization (WHO) 1997). Los plaguicidas pueden clasificarse según su constitución química, su polaridad, su principio activo y/o blanco de acción, entre otros aspectos. Según su

blanco de acción, son usualmente categorizados como herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, raticidas, etc. También son clasificados según la familia química a la cual pertenecen, la cual está basada en la estructura química, el modo de acción y las propiedades físico-químicas. Existe una enorme diversidad de sustancias utilizadas como plaguicidas; la US *Environmental Protection Agency* (EPA) tiene registradas más de 1.500 sustancias activas en alrededor de 50.000 plaguicidas comerciales diferentes (González y col. 2008).

En la Argentina el volumen comercializado de plaguicidas refleja un incremento sostenido, habiendo aumentado un 92% entre los años 1998 y 2007 (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) 2011). Este incremento viene dado por la intensificación en la práctica de monocultivos y la aplicación continua de las mismas formulaciones, que llevan a la aparición de resistencias en los organismos que se pretenden controlar. De esta manera, y dada la ausencia de un plan estratégico que contemple estos eventos, los productores suelen incrementar tanto la cantidad de aplicaciones como las dosis de aplicación (Arias 2005). El incremento sostenido del uso de plaguicidas trae aparejado un aumento en la contaminación acuática, que constituye una de las formas predominantes de contaminación por estos productos, ya que las excesivas concentraciones de plaguicidas ingresan a los cuerpos de agua por escorrentía o percolación (Hoffman y col. 2003; Suter 2007). La llegada de estos compuestos a los cuerpos de agua, como también su depósito en sedimentos y volatilización, promueven su dispersión por el ambiente afectando a toda la biota. Por lo tanto, el hombre se encuentra expuesto a mezclas de distintos pesticidas en su lugar de residencia (a través de los alimentos) y en las zonas rurales. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas (World Health Organization 2012). Se han comprobado de manera fehaciente propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas en muchos de los más utilizados (International Agency For Research On Cancer (IARC) 1976, 1986, 1987, 1991)

Los plaguicidas se comercializan como formulaciones que contienen aditivos, tales como vehículos, emulsionantes, tensioactivos o adyuvantes que se agregan al ingrediente ac-

tivo para mejorar las propiedades físicas y químicas y facilitar la penetración al organismo blanco (Krogh y col. 2003). Para ahorrar tiempo y recursos, en un mismo tanque de aplicación se mezclan varios pesticidas con distintos principios activos, aditivos y para distintos organismos blanco, cuando las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente disueltas en agua. En estas mezclas se desestiman las posibles interacciones no sólo entre los principios activos, sino también entre los aditivos de las distintas formulaciones. La exposición de las poblaciones a plaguicidas, se da en forma de mezclas complejas que son afectadas por distintos factores ambientales, siendo poco factible calcular el grado y la calidad de la exposición (Merletti y col. 1998).

Por lo tanto, en los últimos años ha aumentado la cantidad de trabajos de investigación que pretenden entender y evaluar las posibles consecuencias de la exposición a plaguicidas sobre el ambiente y principalmente sobre el ser humano (Alavanja y col. 2004; Refstrup y col. 2010).

En particular, aquellos trabajos que utilizan biomarcadores de genotoxicidad han resultado buenos parámetros para analizar el potencial riesgo de una sustancia, ya que revelan el daño a la molécula fundamental de transmisión de la información de una generación a la siguiente, el ADN. Por lo tanto, se consideran buenos biomarcadores ya que permiten evaluar el riesgo de una sustancia potencialmente nociva y, además, su potencial carcinogénico (Mudry y Carballo 2006).

Teniendo en cuenta la producción científica relacionada, el objetivo de este trabajo fue evaluar los avances en los últimos años sobre la genotoxicidad de los pesticidas y sus mezclas en concentraciones similares a las encontradas por exposición ambiental. Además, dada la complejidad de los estudios de monitoreo y la imposibilidad de establecer correlaciones directas, se propone reconocer la utilidad de los ensayos de corto plazo, como son los ensayos de monitoreo, ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo*, en niveles de evaluación de menor complejidad, como una aproximación al contexto real.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y AMBIENTALES

Se ha realizado una gran cantidad de trabajos que estudian distintos biomarcadores de genotoxicidad en poblaciones expuestas a

pesticidas. Dentro de los biomarcadores más utilizados se encuentra la frecuencia de micronúcleos (Mn), de aberraciones cromosómicas (AC), el índice de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo Cometa (EC). Los sistemas celulares más utilizados en estos trabajos son los linfocitos de sangre periférica (LSP) y las células de la mucosa bucal ya que son de muy fácil acceso y los protocolos a utilizar están estandarizados. A continuación se presentan algunos de los trabajos publicados en los últimos años en la Argentina y otras partes del mundo.

En la provincia de Córdoba, Peralta y col. (2011) evaluaron el daño genético en pobladores de la ciudad de Marcos Juárez expuestos laboral o ambientalmente a plaguicidas. Para obtener una evaluación del potencial efecto de la exposición realizaron los ensayos de AC, Mn y EC en LSP. Sólo se encontraron diferencias significativas en el daño al ADN (EC) para pobladores expuestos ambientalmente respecto del grupo de referencia. Si bien los otros biomarcadores no presentaron diferencias estadísticas mostraron una tendencia a incrementarse con respecto a los grupos de referencia. Además, en este trabajo se encontró que aquellos individuos que pasan mayor tiempo dedicados a las aplicaciones de plaguicidas, tienen mayores valores de AC, Mn y EC que aquellos individuos que pasan menor tiempo dedicados a esta actividad, aunque dicha diferencia resultó ser significativa sólo para la frecuencia de Mn.

En otro trabajo realizado en la provincia de Santa Fe, se evaluaron alteraciones enzimáticas, modificaciones en el equilibrio oxidativo, daño genotóxico y capacidad del sistema de reparación mediante el EC en trabajadores frutihortícolas clasificados en aplicadores y no aplicadores. Este trabajo reveló que tanto los trabajadores en contacto directo como aquellos que se encontraban en contacto indirecto presentaban alteraciones en los parámetros analizados en relación a los grupos controles. Además, se analizó la influencia de los factores de confusión, como la edad, el sexo, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la utilización del equipo de protección personal (EPP), en el daño genotóxico. Se pudo observar que sólo se encontraron diferencias significativas respecto del control en aquellos grupos que no utilizaban EPP (Simoniello y col. 2008; Simoniello y col. 2010). Este resultado refuerza la relación entre la exposición a plaguicidas y

el daño citotóxico y genotóxico.

Un estudio sobre 259 trabajadores agrícolas de distintas zonas de La Paz, Bolivia, evaluó el efecto genotóxico de la exposición ocupacional a pesticidas en LSP, a través de la frecuencia ICH, el índice de proliferación celular (PRI), la frecuencia de Mn, la presencia de AC y el daño al ADN medido con el EC. Se observó que los trabajadores agrícolas presentaron un aumento significativo en la frecuencia de ICH, Mn, AC e índice del EC en relación a los controles. Se realizó también un análisis de correlación entre exposición a plaguicidas y daño genotóxico, resultando que las personas expuestas a plaguicidas tenían 1,49 veces más probabilidad de sufrir daño genotóxico que los no expuestos (Ascarrunz y col. 2005). Otro estudio en otra zona de La Paz, realizado por Poma y col. (2010) mostró que una población de 118 agricultores, expuestos a plaguicidas organofosforados, piretroides o sus mezclas, sin EPP, tenían mayores índices de daño genotóxico que una población control de la misma zona. Esto se vio representado en un aumento del índice de daño al ADN en el EC de LSP y en un aumento en la frecuencia de Mn en células del epitelio bucal, que no se modificó por características individuales (sexo, edad, consumo de tabaco, etc.) de las personas estudiadas. También se puede resaltar de este estudio que aquellos trabajadores expuestos por más tiempo presentaron mayor daño genotóxico, en relación a los que utilizaron agroquímicos menos años o los que no los utilizaron nunca.

Por otro lado, estudios similares en dos comunidades de trabajadores rurales en Río Grande, Brasil, mostraron una relación directa entre la exposición a pesticidas y el daño al ADN (EC), independientemente del consumo de tabaco o la edad (Remor y col. 2009).

Este tipo de estudios no sólo se han llevado a cabo en Latinoamérica, sino que la problemática es de alcance mundial. Se han realizado estudios en otros países como en Croacia (Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2001), India (Yadav y Kaushik 2002), Francia (Gallois y col. 2011), entre otros.

En los trabajos mencionados anteriormente y en otras revisiones bibliográficas (IARC 1991; Bolognesi 2003; Bull y col. 2006) se ha encontrado que existe una asociación positiva entre la exposición ocupacional a las mezclas de plaguicidas y la modificación de los biomarcadores de genotoxicidad. Esta asociación

refuerza la utilidad de los biomarcadores de genotoxicidad en los biomonitoreos de poblaciones humanas expuestas a mezclas de pesticidas.

Los datos obtenidos con estos biomarcadores evidencian que la genotoxicidad asociada a plaguicidas se da en poblaciones expuestas a altos niveles debido al uso intensivo, al mal uso o la falta de medios de control, como por ejemplo, la no utilización de EPP. Además, la mayoría de los biomarcadores estudiados en trabajadores expuestos indican una relación con la duración de la exposición y con su intensidad. A pesar de las asociaciones, no es posible atribuir los resultados observados directamente a un tipo de pesticida o a mezclas definidas, lo cual dificulta los aspectos regulatorios inherentes a las aplicaciones. Con este fin se realizan baterías de estudios en niveles de ensayo de menor complejidad que permitan comprender los efectos y mecanismos de acción de los compuestos individuales y las mezclas.

ESTUDIOS EN OTROS NIVELES

Además de los estudios epidemiológicos, existen estudios a otros niveles que evalúan el efecto genotóxico de pesticidas y sus mezclas.

Ensayos de monitoreo inicial

Dada la gran cantidad de compuestos químicos que sería necesario evaluar a fin de determinar si producen un daño químico, se ha propuesto una serie de ensayos de corto término entre los cuales se incluyen sistemas que permiten observar: mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas (translocación, dicentricismo, inversiones, deleciones terminales) y aneuploidía (número anormal de cromosomas). Dentro de estos tipos de ensayos y con preferencial atención al primer aspecto, se han desarrollado tests microbiológicos que permiten complementar otros ensayos (Mudry y Carballo 2006). Este tipo de ensayos han sido de gran utilidad en la evaluación de la toxicidad de pesticidas y mezclas de los mismos.

Por ejemplo, para investigar los efectos genotóxicos del metolcarb, un insecticida de la familia de los carbamatos, se utilizó el test de Ames en *Salmonella*, con y sin actividad metabólica (mezcla S9). Metolcarb resultó ser mutagénico en *S. typhimurium* TA98 sin S9 (Liman y col. 2010).

En otro trabajo se evaluó la genotoxicidad de 12 plaguicidas encontrados en alimentos (metil azinfos, clorotalonil, metil-clorpirifos, etil-

clorpirifos, cialotrin, cipermetrina, ciprodinil, fenazaquin, fludioxonil, indoxacarbo, iprodiona y penconazol) y sus mezclas para evaluar las posibles interacciones. Se realizaron el test de Ames, en *Salmonella typhimurium* y el ensayo SOS Cromo Test en *Escherichia coli*. Para el caso del test de Ames, la mayoría de los pesticidas en forma individual presentaron efectos mutagénicos y las mezclas, efectos de interacción. Por otra parte, el SOS Cromo Test, no mostró variaciones para la mayoría de los pesticidas individuales y no fue significativo en las mezclas (Isidori y col. 2009).

Sin embargo, estudios realizados con plaguicidas encontrados aguas abajo del río Kotsuki, Japón, utilizando el test de Ames para medir mutagenicidad, mostraron que la contribución de los plaguicidas en la mutagenicidad del agua superficial resultó no significativa (Abiru y col. 2011). Otro trabajo que utilizó los valores de plaguicidas organoclorados encontrados en los sedimentos del lago Taihu, China, evaluó la mutagenicidad con el ensayo de *Salmonella* con y sin S9. Se observó efecto mutagénico de las mezclas, con variaciones entre regiones analizadas, pero no se encontró una correlación fuerte del tipo dosis-respuesta (Zhao y col. 2010).

A partir de estos resultados se puede ver que, si bien los ensayos de monitoreo aportan información del grado de genotoxicidad de los agentes, aunque los resultados son muy variables, sobre todo aquellos que estiman la mutagenicidad de matrices ambientales. Por lo tanto, resulta necesario complementar estos estudios con otros de niveles de complejidad superior.

Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* de genotoxicidad resultan de gran utilidad porque permiten detectar los efectos genotóxicos de diversos agentes en sistemas celulares humanos. Si bien en estos modelos no se tiene en cuenta la toxicocinética de las sustancias (absorción, distribución, metabolismo y excreción) es posible evaluar el potencial efecto de los agentes con una amplia batería de biomarcadores (Mudry y Carballo 2006).

Existen diversos estudios que evalúan la genotoxicidad de los pesticidas y sus mezclas en cultivos de células, tales como cultivos de LSP o líneas celulares establecidas de otros tejidos. Para estudiar el daño al ADN producido por mezclas de pesticidas a los que podría estar expuesto el ser humano, Das y col. (2007) estudiaron el efecto de tres mezclas equimola-

res de distintas clases de insecticidas: un organoclorado (endosulfan), un carbamato (carbofuran) y un organofosforado (monocrotofos). Para evaluar el efecto genotóxico utilizaron la técnica de AC (roturas de cromátides, fragmentos, gaps, aneuploidías y asociación de satélites) y la técnica de EC en LSP y mostraron que, si bien los compuestos por separado producían daño al ADN a altas concentraciones, se obtenía el mismo efecto cuando se utilizaban concentraciones más bajas de las mezclas. Otros estudios realizados en LSP tratados con un insecticida neonicotinoide (imidacloprid) y un fungicida (metalaxil), que son habitualmente aplicados en conjunto, mostraron un incremento de la frecuencia del ICH y de la frecuencia de Mn cuando los compuestos se aplicaron como una mezcla, lo cual podría indicar un posible efecto sinérgico entre ambos (Demsia y col. 2007). Sin embargo, en otros trabajos no se encontró incrementada la inducción de Mn en el mismo modelo expuestos a dosis ambientales de insecticidas organofosforados (metil azinfos, diazinon, dimetoato, metil pirimifos) y un fungicida carbamato (benomilo) (Bianchi-Santamaria y col. 1997). Otros ensayos en cultivos celulares de mamíferos se han realizado para conocer el efecto tóxico de las mezclas. Ensayos realizados en cultivos de timocitos demostraron que mezclas de tres insecticidas, lindano, malation y permetrina, de distinto modo de acción tienen mayor toxicidad que la suma de los efectos inducidos por los compuestos por separado (Olgun y col. 2004). Existen diversos estudios en líneas celulares de roedores, especialmente en la línea de células CHO (células de ovario de ratón chino), que estudian el efecto genotóxico de distintos plaguicidas (Lin y col. 1987; Wagner y col. 2005; Patel y col. 2007; González y col. 2009; Soloneski y Larramendy 2010), sin embargo, pocos estudios se han realizado en los últimos años para evaluar el efecto de las mezclas. Si bien los resultados obtenidos con este modelo se encuentran más alejados de los efectos producidos por las mezclas de pesticidas en el hombre, es de mucha utilidad para los ensayos de genotoxicidad y por lo tanto sería interesante aumentar las investigaciones que estudien el efecto de las mezclas en estas líneas celulares.

Ensayos *in vivo*

Los estudios de genotoxicidad *in vivo* proveen un marco fisiológico a la acción de distintos

agentes con potencial genotóxico. Éstos, entonces, permiten evaluar de forma controlada una respuesta sistémica al agente en cuestión, así como también discernir efectos provocados según la vía de ingreso del agente al organismo. Estos estudios aportan resultados un paso más cerca de las exposiciones reales humanas.

Dado el surgimiento de la soja resistente a glifosato (RR), en primer lugar, y luego de otros cultivos resistentes, el glifosato ha sido un herbicida en foco de estudios durante mucho tiempo. Se han planteado distintos estudios de genotoxicidad de una de las formulaciones más vendidas a nivel mundial, el Roundup®, en concentraciones de aplicación a campo. Estudios en eritrocitos de médula ósea de ratones macho mostraron que, al ser administrada por vía oral, esta formulación no indujo Mn o AC (Dimitrov y col. 2006). Sin embargo, al exponer renacuajos de rana toro, *Rana catesbeiana*, por vía dérmica, se observó un aumento significativo del daño al ADN, visualizado a través del EC, con una relación dosis respuesta (Clements y col. 1997). Asimismo, en huevos de caimán (*Caiman latirostris*) expuestos en condiciones controladas de laboratorio y en ensayos a campo, se observó una frecuencia de Mn aumentada así como un mayor índice de daño al ADN analizado por EC, lo que se acompañó por malformaciones y alteraciones metabólicas en los caimanes neonatos (Poletta y col. 2011). Por otra parte, estudios llevados a cabo en plantas mostraron que en el meristema de raíz de la planta *Crepis capillaris* no hubo inducción de Mn o AC (Dimitrov y col. 2006), mientras que en el modelo de meristema de raíz de *Allium cepa* se encontró un aumento en las alteraciones de la mitosis (Rank y col. 1993). Estos antecedentes indicarían que tanto el modo de exposición como la sensibilidad del sistema juegan un rol fundamental en la determinación de la genotoxicidad y que, como ya habían resaltado Dimitrov y col. (2006), los ensayos de plantas y animales son diferencialmente sensibles a algunos pesticidas, y estas diferencias pueden deberse al metabolismo de cada tipo celular. Este tipo de variaciones también se encontró en ensayos realizados en *Tradescantia* sp. expuesta al insecticida malation por distintas vías y en distintos estados (líquido/vapor) (Ma y col. 1983).

Por otra parte, Rank y col. (1993) también evaluaron la sal isopropilamina de glifosato (principio activo de la formulación Roundup) sin encontrar alteraciones en la mitosis de *Allium cepa*. Estudios sobre el herbicida Arse-

nal 250NA, cuyo principio activo es el imazapir, mostraron que la formulación y el principio activo no modificaron la frecuencia de Mn de médula ósea de ratón, ni provocaron fragmentación del ADN en *Allium cepa*. Sin embargo, sí se observó un aumento de cromosomas rezagados en *Allium cepa*, siendo significativo para la formulación a concentraciones más bajas que la del principio activo, además de una disminución en el índice mitótico sólo para la formulación (Koppe Grisolia y col. 2004). Otro caso es el del herbicida trifluralin y su formulación comercial Treflan para la que se observó una menor frecuencia de Mn inducida por la formulación que la inducida por el principio activo en el pez *Oreochromis niloticus*, (Könen y Çava 2008). El efecto de la atrazina y su formulación comercial Gesaprim se estudió en el pez *Carassius auratus L.* utilizando los tests de Mn y EC en eritrocitos de sangre periférica, encontrándose un aumento en la frecuencia de Mn y un mayor índice de daño al ADN (EC) sólo para Gesaprim (Cavas 2011). Cabe destacar que el análisis de los principios activos de formulaciones comerciales de pesticidas no es representativo de la situación real que se da a campo, ya que las formulaciones contienen aditivos que interaccionan con los principios activos, modificando su toxicidad y genotoxicidad, como ya se ha demostrado (IARC 1991). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la realidad del campo no se reduce a una única formulación y es por ello que se ha intensificado en los últimos años el estudio de la toxicidad de las mezclas. Se evaluó el efecto genotóxico de mezclas de plaguicidas usualmente utilizadas en el campo en huevos de caimán (*Caiman latirostris*). Los resultados mostraron que la mezcla de formulaciones de glifosato (Roundup), endosulfán (Galgofan) y cipermetrina (Atanor) presentaron mayores índices de genotoxicidad (frecuencia de Mn, daño al ADN por EC y malformaciones), acompañados de alteraciones metabólicas, que la aplicación de la formulación Roundup sola (Poletta y col. 2011). Estudios realizados en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón, tratados con un insecticida (imidacloprid) y un fungicida (metalaxil), habitualmente aplicados en conjunto, revelaron un aumento de la frecuencia de Mn al administrar los pesticidas por separado y un efecto sinérgico de los pesticidas administrados en conjunto (Demsia y col. 2007). Asimismo, una mezcla compleja de pesticidas (alaclor, metolacloro, atrazina, terbutilazina, diuron, fosetil de alumi-

nio, carbarilos y glifosato), preparada según lo detectado en aguas donde habita *Crassostrea gigas*, el molusco en estudio, mostró un aumento en el daño al ADN por aductos en hemocitos acompañado por un estado de estrés oxidativo marcado (Geret y col. 2011). La genotoxicidad de la combinación de los insecticidas deltametrina y tiacloprid fue estudiada en médula ósea de ratón a través del test de Mn, determinación del índice mitótico y AC. Los resultados arrojaron un aumento en la frecuencia de Mn así como en las AC, mayor que las formulaciones por separado, indicando una interacción aditiva/sinérgica (Şekeroğlu y col. 2011).

CONCLUSIONES

Todos estos resultados, en los distintos niveles de estudio, apoyan la importancia de realizar ensayos que evalúen el efecto genotóxico de las mezclas de pesticidas, ya que, por lo general, tienen efectos distintos a los de los compuestos por separado. La caracterización de las mezclas de pesticidas en las exposiciones ambientales resulta de vital importancia para lograr una reproducción en ensayos controlados, que reflejen la realidad lo mejor posible. Teniendo en cuenta la controversia encontrada en los estudios relacionados al efecto genotóxico de las mezclas, es evidente la necesidad de seguir investigando en esta área.

Si bien los análisis de mutagenicidad en organismos unicelulares (por ej. test de Ames) no son escalables para definir el potencial genotóxico de ciertos agentes en organismos de mayor complejidad, pueden ser aplicados para evaluar el perfil mutagénico de muestras complejas como un monitoreo inicial. Además, aportan información de los componentes individuales para clasificar mutágenos químicos. Estudios *in vitro* que analicen el efecto de distintos pesticidas en LSP en las concentraciones a las que el hombre está expuesto serían enriquecedores a la hora de analizar los efectos encontrados en los programas de biomonitorio en poblaciones que se encuentran expuestas de forma crónica.

Si bien los sistemas utilizados en estudios *in vivo* contemplan una respuesta sistémica, que involucra la toxicocinética del agente, los resultados obtenidos en otros organismos no son suficientes para determinar el efecto sobre el ser humano. Por lo tanto, es evidente la necesidad de armar baterías de ensayos que consideren varios niveles de distinta complejidad en distintos modelos y así poder tener una aproxi-

mación más certera de la capacidad genotóxica del agente sobre la población humana.

En Argentina la legislación prohíbe las aplicaciones a distancias menores a los 500 a 1500 metros de donde habitan comunidades, no obstante, no se contemplan las viviendas aisladas que persisten en las áreas rurales y que pueden ser alcanzadas por los plaguicidas (Ley Nacional de Plaguicidas N° 20.418; Sistema Nacional de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos, Resolución del SENASA 500/2003, bajo el marco de la Ley de Política Ambiental Nacional N° 25.675; Ley N° 10.699 de la Provincia de Buenos Aires; Ley N° 3378 de la Provincia de Chaco; Ley N° 5665 de la Provincia de Mendoza; Ley N° 6291 de la Provincia de Tucumán). De la misma manera, el transporte de los plaguicidas por aire, agua y suelo contribuye a la dispersión más allá de donde son aplicados. Asimismo, la legislación relativa al registro, comercialización, aplicación de plaguicidas es incompleta, permisiva y obsoleta. No existe participación del Ministerio de Salud en la aprobación del registro de los plaguicidas de uso agrícola. El problema sanitario derivado del uso de plaguicidas como consecuencia de un sub registro de las intoxicaciones no es atendido de forma suficiente en el sistema de salud nacional. También plaguicidas prohibidos o restringidos en los países de origen, son permitidos en la Argentina. Es el caso del fipronil e imidacloprid que fueron retirados del mercado en Alemania por su probado efecto contra la supervivencia de las abejas (Souza Casadinho 2007).

Estos defectos en la legislación y en el control, se suman a la deficiencia de medidas que contemplen los efectos de las mezclas de pesticidas. Es por ello que consideramos que es necesario incrementar la evidencia científica respecto a la toxicidad y genotoxicidad de las mezclas aplicadas en nuestro país. Esto permitirá ampliar la legislación, adecuándola a la problemática real y modificar los niveles permitidos de pesticidas y mezclas en el ambiente. Por otra parte, la realización de biomonitoreos que evidencien el grado de impacto por malas prácticas de los trabajadores, sirven de herramienta para ejercer el control, un aspecto fundamental del cumplimiento de la legislación.

Agradecemos: a la Dras Marta Mudry, Nancy Andreoli y Eliana Steinberg por incentivarlos a realizar esta revisión bibliográfica. También queremos reconocer el aporte de información de parte de la Dra. Gisela Poletta.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aburi K., Takanashi H., Kishida M., Nakajima T., Ohki A. Mutagen formation potential (MFP) of Kotsuki River water and contribution of pesticides to MFP. *J Water Environ Technol.* 2011;9(4):349-357.

Alavanja M., Hoppin J., Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 2004;25:155-197.

Arias, S. Transformaciones en la estructura agraria de la región pampeana causadas por el proceso de agriculturización de la década del 90. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, UBA. 2005.

Ascarrunz M.E., Tirado N., González A.R., Cuti M., Cervantes R., Huici O., Jors E. Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Cuadernos del Hospital de Clínicas.* 2005;50(2):27-37.

Bianchi-Santamaria A., Gobbi M., Cembran M., Arnaboldi A. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutat Res.* 1997;388:27-32.

Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2003;543:251-272.

Bull S., Fletcher K., Boobis A.R., Battershill J.M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis.* 2006;21(2):93-103.

Cavas T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1431-1435.

Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29:277-288.

Das P., Shaik A., Jamil K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on

human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 2007;23(8):449-458.

Demsia G., Vlastos D., Goumenou M., Matthopoulos D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res.* 2007;634:32-39.

Dimitrov B.D., Gadeva P.G., Benova D.K., Bineva M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis.* 2006;21(6):375-382.

Food and Agriculture Organization (FAO), Naciones Unidas y World Health Organization (WHO). *Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual*, Roma, Italia. 1997.

Gallois J., Pottier D., Houssin M., Le Goff J., André V. DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides? *Environ Toxicol Pharm.* 2011;32:1-9.

Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology.* 2001;165:153-162.

Geret F., Burgeot T., Haure J., Gagnaire B., Renault T., Communal P.Y., Samain J.F. Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol.* 2011;doi:10.1002/tox.20764.

González N., Soloneski S., Larramendy M. Dicamba-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *J Hazard Mater.* 2009;163(1):337-343.

Gonzalez N.V., Molinari G., Solonesky S., Larramendy M.L. Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina. *Theoria.* 2008;17(2):27-45.

Hayes W.J. *Toxicology of pesticides*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975.

Hoffman D., Rattner B., Burton G., Cairns J. *Handbook of Ecotoxicology*. Second ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2003.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some carbamates, thiocarbamates and carbazides. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1976:282.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1986:434.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, 1987;1 a 42:440.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1991:612.

Isidori M., Caterino E., Criscuolo E., Fatigati V., Liguori G., Parrella A. Antimutagenic and antigenotoxic effects of vegetable matrices on the activity of pesticides. *Food Addit Contam.* 2009;26(7):1049-1062.

Könen S., Çavaş T. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 2008;49:434-438.

Koppe Grisolia C., Rolim Bilich M., Menezes Formigli L. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotox Environ Safe.* 2004;59:123-126.

Krogh K., Halling-Sorensen B., Mogensen B., Vejrup K. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere.* 2003;50:871-901.

Ley 20.418. Reglamentación y definiciones de tolerancias y límites administrativos de residuos de plaguicidas en productos y subproductos animales y vegetales. Ley Nacional 20.418. Sanc. 18/05/1973; promul. 18/05/1973; publ. 22/06/1973.

Ley 10.699. Regula la utilización de productos químicos en la producción para la protección de salud humana. Ley Provincial 10.699 de la Provincia de Buenos Aires. Sanc. 21/10/1988; promul. 21/10/1988; publ. 17/11/1988.

Ley N° 3.378. Determina normas sobre el expendio, aplicación, transporte, almacenamiento, fraccionamiento, distribución y toda operación que implique manejo de biocidas, tanto en el ámbito urbano como en el rural. Ley Provincial 3.378 de la Provincia de Chaco. Sanc. 22/06/1988; promul. 05/07/1988; publ. 15/07/1988.

Ley 5.665. Régimen para la fabricación y comercialización de productos agroquímicos. Ley Provincial 5.665 de la Provincia de Mendoza. Sanc. 21/03/1991; promul. 21/03/1991; publ. 03/05/1991.

Ley 6.291. Normas Reglamentarias para el uso de agroquímicos. Ley Provincial 6.291 de la Provincia de Tucumán. Sanc. 21/10/1991; promul. 21/10/1988; publ. 05/12/1988.

Ley 25.675. Ley general de Política Ambiental. Ley Nacional 25.675. Sanc. 06/11/2002; promul. 27/11/2002; publ. 28/11/2002.

Liman R., Akyil D., Eren Y., Konuk M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere*. 2010;80(9):1056-1061.

Lin M., Wu C., Wang T. Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*. 1987;188(3):241-250.

Ma T.-H., Anderson V. A., Harris M. M., Bare J. L. *Tradescantia*-micronucleus (trad-MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environ Mutagen*. 1983;5:127-137.

Merletti M., Solkolne, C. L., Vineis P. Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo. Volumen I. Capítulo 28: Epidemiología y estadística. Herramientas y enfoques. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones. Madrid, España, 1998.

Mudry M., Carballo M. Genética Toxicológica. Buenos Aires, Argentina: Ed. De Los 4 Vientos, 2006.

Olgun S. Gogal R. M.Jr., Adeshina F., Choudhury H., Misra H P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology*. 2004;196:181-195.

Patel S. Bajpayee M., Kumar Pandey A., Parmar D., Dhawan A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol in Vitro*. 2007;21(8):1409-1418.

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*. 2011;2(1):7-26.

Poletta G. L., Kleinsorge E., Paonessa A., Mudry M.D., Larriera A., Siroski P. A. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris*. *Ecotox Environ Safe*. 2011;74:852-859.

Poma M.L., Tirado Bustillos N., Ascarrunz M.E. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biofarbo*. 2010;18(2):31-43.

Rank J., Jensen A.-G., Skov B., Pedersen L.H., Jensen K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutat Res*. 1993;300(1):29-36.

Reffstrup T.K., Larsen J.C., Meyer O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul Toxicol Pharm*. 2010;56:174-192.

Remor A.P., Totti C.C., Moreira D.A., Pimentel Dutra G., Dahlström Heuser V., Boeira J.M. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*. 2009;35:273-278.

Resolución 500/2003 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Creación del Sistema Nacional de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos: Objetivos

y Organización. Sanc. 22/08/2003.

Şekeroğlu V., Şekeroğlu Z.A., Kefelioğlu H. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environ Toxicol.* 2011;doi: 10.1002/tox.20746.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Carballo M.A. Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010;70:489-498.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Scagnetti J.A., Grigolato R.A., Poletta G.L., Carballo M.A. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J Appl Toxicol.* 2008;28:957-965.

Sistema de Indicadores de desarrollo sostenible (SIDSA). Informe de SIDSA de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 5ta ed. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Ministerio de Producción. 2010.

Soloneski S., Larramendy M.L. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with the insecticide pirimicarb. *J Hazard Mater.* 2010;174(1-3):410-415.

Souza Casadinho J. La problemática del uso de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente: Estudio colaborativo multicéntrico. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina. 2007.

Suter G. *Ecological Risk Assessment*. Second ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2007.

Wagner E.D., McMillan S.M., Plewa M.J. Cytotoxicity of organophosphorus ester (OP) insecticides and cytotoxic synergism of 2-acetoxyacetylaminofluorene (2AAAF) in chinese hamster ovary (CHO) cells. *B Environ Contam Toxicol.* 2005;75(2):329-334.

World Health Organization (WHO). *Health Topics: Pesticides*. 2012. [En línea] [actualizado al 2012; consulta 7 de Mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>

Yadav J., Kaushik V. Studies on the genotoxicity of an organophosphorous pesticide Baytex-1000. *Int J Health Geogr.* 2002;2(1):19-25.

Zhao Z., Zhanga L., Wua J., Fana C., Shanga J. Assessment of the potential mutagenicity of organochlorine pesticides (OCPs) in contaminated sediments from Taihu Lake, China. *Mutat Res.* 2010;696(1):62-68.