

ESTUDIO CITOGENÉTICO Y REPRODUCTIVO EN MUJERES TEMPORERAS EXPUESTAS A PESTICIDAS DE LA VIII REGIÓN DE CHILE

CITOGENETIC AND REPRODUCTIVE STUDY IN EXPOSED SEASONAL WOMEN TO PESTICIDES IN THE VIII REGION OF CHILE

LILIANA ANDREA ZÚÑIGA VENEGAS^{1,2}, CAROLINA GARBIÑE MÁRQUEZ URRIZOLA²,
MARÍA SOLEDAD DUK PALACIOS²

¹Departament de Genètica i de Microbiologia. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona Campus de Bellaterra 08193 Cerdanyola del Vallés, Espanya. Tel. +34 93 581 4707. Fax. +34 93 581 2387. LilianaAndrea.Zuniga@uab.es

²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Genotoxicología, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

RESUMEN

La VIII Región de Chile es un importante productor agrícola, por lo que se ha introducido el uso, cada vez mayor, de sustancias químicas nocivas, tales como plaguicidas, fertilizantes, etc. Esto puede traducirse en un aumento del daño citogenético, que se relaciona también con el incremento en el número de niños con malformaciones y una mayor incidencia de cáncer. Es necesario, entonces, realizar un estudio de salud reproductiva asociándolo al probable daño citogenético que pudiera encontrarse en mujeres laboralmente expuestas. Este estudio consistió en la aplicación de dos técnicas ampliamente usadas en genotoxicología: el ensayo de Micronúcleos (MN) y el ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), utilizando linfocitos de sangre periférica de 87 mujeres expuestas y 54 no expuestas. Se estimó también el riesgo relativo de la exposición utilizando la medida de Odd Ratio. Diferencias altamente significativas entre el grupo de referencia y el expuesto se reflejan en ambos ensayos. La exposición a pesticidas se vio como un factor de riesgo para la salud reproductiva de las mujeres expuestas para la mayoría de los parámetros evaluados. Esta investigación confirma que la exposición laboral a pesticidas resulta en un aumento del riesgo para la salud reproductiva y en un incremento del daño citogenético de las mujeres temporeras expuestas a mezclas de agroquímicos.

Palabras claves: Chile, intercambio cromátidas hermanas, micronúcleos, pesticidas problemas reproductivos, temporeras.

ABSTRACT

The VIII region of Chile is an important agricultural producer. This has led to an increase in the use of chemicals such as pesticides, fertilizers, etc. This could account for an increase of cytogenetic damage, which could also be related to a higher number of birth defects and incidence of cancer. These are the reasons why it has become a necessity to carry out a study about reproductive health and the possible cytogenetic damage in women labouredly exposed. This study consisted in the application of two techniques widely used in genotoxicology: Micronucleus assay (MN) and Sister Chromatid Exchange assay (SCE) using the peripheral blood lymphocytes of 87 labouredly exposed women and 54 non-exposed women. The relative risk of the exposure was also considered using the Odd Ratio measurement. The results showed a highly significant statistical difference between both reference and exposed groups, in the MN and SCE frequency. In relation to reproductive problems for most evaluated parameters, the exposure to pesticides showed to be a risk factor.

Our work confirms that the exposure to pesticides is a risk for reproductive health and also induces an increase in cytogenetic damage for the seasonal women labouredly exposed to agrochemicals mixtures.

Keywords: Chile, sister chromatid exchanges, pesticides, micronuclei, reproductive problems, seasonal female workers.

Recepción: 15/09/06. Revisión: 16/11/07. Aprobación: 22/03/07.

INTRODUCCIÓN

El 60% de la población económicamente activa del tercer mundo depende del trabajo agrícola (Numirmen *et al.*, 1995). La VIII Región de Chile sostiene una gran importancia en la industria frutícola a nivel nacional, por lo que se han introducido en este ámbito laboral el uso, cada vez mayor, de sustancias químicas nocivas, tales como plaguicidas, fertilizantes, solventes, etc. (Márquez *et al.*, 2005).

La creciente exportación de fruta en nuestro país ha aumentado considerablemente tanto en el número hectáreas destinadas a la agricultura como en el de trabajadores asociados con esta actividad, el número de trabajadores se estima aproximadamente en 250,000 personas, con una mano de obra predominantemente femenina (Wesseling *et al.*, 1998).

La asociación de daño genético con compuestos químicos data de principios del siglo XX; desde entonces se ha comprobado que la continua exposición a estas sustancias puede producir efectos nocivos sobre la salud humana.

El potencial genotóxico de un compuesto es un factor de riesgo primario para los efectos producidos por una exposición crónica, tales como desordenes a nivel genético y reproductivo.

Los pesticidas representan un grupo importante de contaminantes ambientales a los que estamos diariamente expuestos, principalmente a consecuencia de su amplio uso en la agricultura, con evidente tendencia a incrementar (Lucero *et al.*, 2000).

Una de las principales preocupaciones, como ya hemos mencionado, son sus efectos indeseables sobre la salud humana incluyendo cáncer y variados tipos de otras enfermedades (IARC, 1991), como leucemias (Blair y Zahm, 1995), cáncer de vejiga (Viel y Chailer, 1995) Linfoma no Hodgking (Waddell *et al.*, 2001) y cáncer pancreático (Ji *et al.*, 2001) además de asma, dermatitis alérgica y enfermedades respiratorias (Zuskin *et al.*, 1993) e incluso envejecimiento prematuro.

En relación a malformaciones congénitas asociadas a la exposición a plaguicidas. Rojas *et al.*, (2000), hicieron una primera aproximación, en un estudio retrospectivo.

A pesar del gran interés por los posibles efectos de estos compuestos, en especial en lo referente a su relación con malformaciones congénitas, hay pocos métodos que permitan identificar el daño. El método mas utilizado en la evaluación de riesgo genético es la biomonitorización de poblaciones humanas expuestas (Bolognesi *et al.*, 2003). Una de las principales herramientas de la biomonitorización, son los ensayos citogenéticos siendo los más utilizados los ensayo de Micronúcleos (MN) (Fenech, 2000); e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000)

Los MN son formados por fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas enteros, que han quedado retrasados durante el proceso de división celular. Estos se visualizan, finalmente durante el periodo interfásico de la célula, como un(os) núcleo(s) pequeño(s) distinto(s) del principal. Los MN reflejan eventos clastogénicos o aneugénicos

y puede proveer de información en caso de un evento carcinogénico temprano (Bonassi *et al.*, 2003). En numerosos casos se ha podido establecer una correlación positiva entre exposición a plaguicidas y la frecuencia de MN en linfocitos humanos (Bolognesi *et al.*, 2002; Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2001).

Por otro lado, los ICH fueron descritos por primera vez por Taylor en 1958, quién, bajo el principio de replicación semiconservativa del DNA y marcaje radioactivo, visualizó por primera vez ICH en cromosomas eucarióticos. Posteriormente la resolución del ensayo fue aumentada utilizando el análogo de base Bromodeoxiuridina (BrdU) durante dos ciclos de la célula en estudio. El contenido de BrdU en las hebras del DNA, hace posible que, al teñir las células, puedan diferenciarse ambas cromátidas, y de esta forma visualizar el intercambio que entre ellas exista.

Numerosos estudios han establecido un incremento significativo en la frecuencia de SCE tanto en trabajadores de algunas industrias como en los de la agricultura (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Padmavathi *et al.*, 2000; Shaham *et al.*, 2001).

Ambas técnicas se han convertido en clásicas de la genotoxicología por su fácil aplicación, rapidez y confiabilidad, ambas muestran excelente relación dosis-respuesta para cientos de químicos analizados tanto *in vivo* como *in vitro* (Tucker *et al.*, 1993)

Venegas *et al.*, (1998) realizó uno de los estudios pioneros en Chile, de evaluación de daño por genotoxicidad debido a la exposición a plaguicidas en un grupo de solo 22 personas que utilizaban medidas de protección, por lo que no se encontró diferencias significativas entre el grupo expuesto y el de referencia.

Con el objeto de evaluar tanto el riesgo genético como reproductivo, hemos realizado un estudio de biomonitorización en

mujeres temporeras de la fruta en cuatro localidades de la VIII Región, Chile, comparando la frecuencia de daño genético y la incidencia de problemas reproductivos en relación a un grupo no expuesto ni asociado a este tipo de trabajo.

Las aproximaciones estadísticas, en las que se han controlado los factores de confusión tales como edad y consumo de tabaco y alcohol, han demostrado una diferencia altamente significativa del daño cromosómico en el grupo expuesto; y que la exposición a plaguicidas es un factor de riesgo para la salud reproductiva de las mujeres temporeras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

En este estudio se han incluido 87 mujeres temporeras de la fruta de 4 localidades de la VIII Región, Chile. Estas regiones son Mulchén, Negrete, Nacimiento y Coihueco, ellas trabajan en contacto con una compleja mezcla de pesticidas. El grupo control lo forman 38 mujeres residentes en la ciudad de Concepción y se caracterizan por no estar, ni haber estado vinculadas a algún tipo de exposición laboral. Paralelamente a la toma de muestras, se aplicó una encuesta a cada una de las integrantes de ambos grupos, con el fin de homogenizarlos, excluir factores de confusión y de obtener información para realizar análisis estadísticos pertinentes, que nos permitan concluir si los plaguicidas son un factor de riesgo tanto para daño genético como para problemas reproductivos. Cada una de las integrantes de este estudio manifestaron su acuerdo a participar mediante la firma de un consentimiento informado claramente explicado.

Obtención de muestras y ensayos citogenéticos

La obtención de muestras se realizó mediante punción endovenosa en tubos estériles y heparinizados y fueron procesadas dentro de las 24 horas siguientes. Los cultivos, para el ensayo de MN, fueron mantenidos de acuerdo al proceso estándar realizado por Márquez *et al.* (2005). Brevemente, se adicionó 0,5 mL de sangre completa en 4,5 mL de medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomycin), L-Glutamina y fitohemoaglutinina, todo suministrado por Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA). El volumen final de cada cultivo fue de 5 mL y fueron mantenidos por 72 horas en oscuridad a 37°C. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemoaglutinina (Gibco-Invitrogen) y luego de 44 hr de incubación, se bloqueó la citocinesis agregando Citocalacina-B (Sigma, St. Louis, MO). A las 72 hr de iniciado el cultivo, los linfocitos fueron sometidos a un choque hipotónico con KCl 0,075M, posteriormente fijados con Carnoy (3:1 metanol:ácido acético) para luego proceder a la dispersión celular sobre un portaobjetos y finalizar con la tinción Giemsa (Merk, Darmstadt, Germany). Dos portaobjetos por persona y dos de su duplicado, se analizaron bajo microscopio, debidamente codificados, contando un total de 1000 células bien preservadas, con el fin de determinar la frecuencia de células binucleadas con MN (BNMN) y el número total de MN (MNL).

Para el ensayo de ICH, los cultivos fueron mantenidos de acuerdo al proceso estándar realizado por Gómez-Arroyo *et al.*, (2000). Brevemente, al igual que para el ensayo de MN, se adicionó sangre completa en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado, L-Glutamina y antibióticos. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemoaglutinina. Después de 24 hr se adicionó al cultivo 5-

bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma, Cat. No. B5002) para obtener una concentración final de 5mg/mL. Una hora antes de finalizar el cultivo, se adicionó Colchicina. Luego, los linfocitos en metafase, fueron sometidos a un choque hipotónico con KCl 0,075M, fijados en Carnoy y dispersado en portaobjetos. Finalmente se sometieron a una tinción diferencial con Hoechst 33258 (Sigma), seguida de una convencional con Giemsa.

Todas las preparaciones fueron codificadas y se realizó una lectura de 20 metafases por individuo, contando el número de ICH para cada placa metafásica

Cabe mencionar que cada ensayo se realizó en duplicado para determinar diferencias individuales debidas a las condiciones propias de cada técnica.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron procesados en el software estadístico CSS:STATISTICA™.

Para los ensayos citogenéticos, se utilizó el Mann-Whitney (U-test) y correlación de Spearman. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a valores de $p < 0,05$.

Para el análisis de antecedentes reproductivos se realizó un estudio retrospectivo para estimar el Riesgo Relativo (RR) de la exposición a plaguicidas utilizando la medida de Odd Ratio (OR).

RESULTADOS

Ensayo de MN

Para el grupo expuesto se contabilizó un total de $8,7 \cdot 10^4$ células binucleadas correspondiente a 87 mujeres, obteniéndose una frecuencia de BNMN/1000 células de $32,95 \pm 14,85$ y una frecuencia de MNL/1000 células de $38,08 \pm 18,13$.

Para el grupo de referencia se contabilizó un total de $5,4 \times 10^4$ células binucleadas correspondiente a 54 mujeres, obteniéndose una frecuencia de BNMN/1000 células de $9,11 \pm 5,64$ y una frecuencia de MNL/1000 células de $9,87 \pm 6,31$. Se aplicó el test de Mann-Whitney para verificar diferencias significativas entre edades de ambos grupos y sus respectivas frecuencias de MN (Tabla I). El análisis no arrojó diferencias significativas entre las edades de ambos grupos, pero sí entre las frecuencias de MN (Fig. 1).

Se evaluó edad y algunos aspectos del estilo de vida, como consumo de tabaco y alcohol. Se estratificó la población en fumadores y no fumadores; bebedores y no bebedores. En la Figura 2 se observa una correlación entre frecuencia de MN y edad siendo estadísticamente significativa solo para el grupo control. Para los hábitos de consumo, la Tabla II muestra que no existen diferencias significativas.

Ensayo ICH

Se realizó un recuento de 20 metafases por individuo. Para el grupo expuesto se analizó un promedio de 1.060 placas metafísicas correspondiente a 53 mujeres, obteniéndose una media de intercambios de $6,41 \pm 1,3$. Para el grupo de referencia se analizó un promedio de 760 placas correspondiente a 38

mujeres, donde se obtuvo una media de $5,45 \pm 1,33$ (Tabla III). El test estadístico Mann-Whitney no arrojó diferencias significativas entre las edades de ambos grupos a diferencia de lo que se observa para el análisis de la frecuencia de ICH donde si observamos una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 3). La correlación de Spearman entre al edad y el promedio de ICH, no mostró diferencias significativa para ninguno de los dos grupos en estudio (Fig. 4). Finalmente, la Tabla IV muestra que para los hábitos de consumo de alcohol y tabaco, el test estadístico no arrojó diferencias significativas.

Análisis antecedentes reproductivos

Se realizó un estudio retrospectivo para estimar el Riesgo Relativo (RR) de la exposición a plaguicidas. Se determinó en ambos grupos (96 expuestos y 57 controles) la tasa de incidencia de problemas reproductivos (PR), dentro de los cuales están: problemas de fertilidad, complicaciones durante el embarazo, abortos espontáneos y malformaciones congénitas. La Odds Ratio (OR), y fue calculada como lo muestra la fórmula de la Tabla V. Los intervalos de confianza nos permitieron establecer que los valores de OR fueron estadísticamente significativos.

Tabla I. Análisis estadístico para edad y frecuencia de micronúcleos para ambos grupos.

Sujetos	N	Edad (años)	BNMN/1000 células Promedio ± DS	MNL/1000 células Promedio ± DS
No expuestos	87	$37,93 \pm 12,60$	$9,11 \pm 5,64$	$9,89 \pm 6,31$
Expuestos	54	$38,64 \pm 8,00$	$32,95 \pm 14,85$	$38,08 \pm 18,13$
p		0.69 ns	8,4E-19**	5,283E-19**

ns: No existe diferencia significativa entre las edades de ambos grupos ($p > 0.05$; U-test).

** Diferencias altamente significativas ($p < 0.05$; U-test).

Tabla II. Valores medios (\pm D.S) de la frecuencia de BNMN con respecto a los hábitos de consumo de tabaco y alcohol.

		No expuestos		Expuestos	
		Sí	No	Sí	No
BNMN	Fumador	8,72 \pm 5,86 ^{ns}	9,56 \pm 5,34 ^{ns}	32,27 \pm 12,28 ^{ns}	33,84 \pm 15,89 ^{ns}
	Bebedor	8,74 \pm 5,76 ^{ns}	9,75 \pm 5,21 ^{ns}	36,23 \pm 12,38 ^{ns}	30,75 \pm 16,04 ^{ns}
Edad	Fumador	37,38 \pm 11,69	38,56 \pm 13,51	37,7 \pm 7,96	39,22 \pm 8,13
	Bebedor	36,76 \pm 11,73	39,9 \pm 13,43	39,43 \pm 7,07	38,12 \pm 8,60

ns: No existe diferencia significativa entre las edades de ambos grupos ($p > 0.1$; U-test).

Tabla III. Análisis estadístico para edad y promedios de SCE para ambos grupos.

Sujetos	N	Edad (años)	Intercambio entre cromatidas hermanas Promedio \pm DS
Controles	53	42,69 \pm 13,89	5,45 \pm 1,33
Expuestos	38	40,38 \pm 9,98	6,41 \pm 1,30
P		0,54 ^{ns}	0,0013 ^{**}

ns: No existe diferencia significativa entre las edades de ambos grupos ($p > 0.05$; U-test)

** Diferencias altamente significativas ($p < 0.05$; U-test).

Tabla IV. Valores medios (\pm D.S) del promedio de ICH con respecto a los hábitos de consumo de tabaco y alcohol.

		No expuestos		Expuestos	
		Sí	No	Sí	No
Promedio ICH	Fumador	5,43 \pm 1,20 ^{ns}	5,48 \pm 1,49 ^{ns}	6,35 \pm 1,33 ^{ns}	6,48 \pm 1,29 ^{ns}
	Bebedor	5,67 \pm 1,31 ^{ns}	4,99 \pm 1,36 ^{ns}	6,53 \pm 1,39 ^{ns}	6,32 \pm 1,20 ^{ns}
Edad	Fumador	37,59 \pm 12,62	40,7 \pm 12,46	37,72 \pm 7,11	44,59 \pm 9,90
	Bebedor	37,12 \pm 12,08	43,75 \pm 12,53	40,75 \pm 8,75	43,92 \pm 10,32

ns: No existe diferencia significativa entre las edades de ambos grupos ($p > 0.1$; U-test).

Tabla V. Tablas de contingencia para todos los parámetros evaluados en el estudio reproductivo.

Problemas reproductivos (PR)						
Exposición	Sí	No	Total	Odds Ratio (OR)		Intervalo de confianza (IC) (α=0.05)*
Sí	P ₁	q ₁	M ₁	$\frac{p_1 / q_2}{q_1 / p_2}$	$\ln \Psi \pm z_{\alpha/2}$	$\sqrt{1/p_1 + 1/q_1 + 1/p_2 + 1/q_2}$
No	P ₂	q ₂	M ₂			
Total	N ₁	N ₂	N			
Problemas de fertilidad (PF)						
Exposición	Sí	No	Total	Odds Ratio (OR)		Intervalo de confianza (IC)
Sí	18	78	96	1.23		[1,95 ; 2,96]
No	9	48	57			
Total	27	126	153			
Complicaciones en el embarazo (CE)						
Exposición	Sí	No	Total	Odds Ratio (OR)		Intervalo de confianza (IC)
Sí	17	78	95	1.02		[2,31 ; 2,38]
No	11	46	57			
Total	28	125	152			
Abortos espontáneos (AB)						
Exposición	Sí	No	Total	Odds Ratio (OR)		Intervalo de confianza (IC)
Sí	22	74	96	1.59		[1,48 ; 3,71]
No	9	48	57			
Total	31	122	153			
Malformaciones congénitas (MC)						
Exposición	Sí	No	Total	Odds Ratio (OR)		Intervalo de confianza (IC)
Sí	9	87	96	5.80		[1,39 ; 46,99]
No	1	56	57			
Total	10	143	153			

*: Dado que la medida tiene una distribución asimétrica, en el cálculo de los límites de confianza se utilizó una transformación logarítmica.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas laboralmente expuestas a diferentes agentes constituyen, en la actualidad, el objetivo de numerosas investigaciones. En este trabajo se ha estudiado un grupo de mujeres temporeras de cuatro localidades de la VIII Región de Chile, con el objetivo de evaluar asociaciones entre exposición a plaguicidas y daño citogenético y si

esta exposición es un factor de riesgo a la salud reproductiva de éstas.

Existen numeroso estudios que avalan nuestros resultados (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001; Bolognesi *et al.*, 1993) en los que se ha demostrado que trabajadores expuestos a mezclas de plaguicida, presentan un incremento significativo en la frecuencia de MN al ser comparados con un grupo control.

Los análisis estadísticos también nos permiten concluir que nuestras poblaciones son

homogéneas, por lo tanto, comparables entre sí ya que según Surrallés y Natarajan (1997) la edad y sexo son factores de confusión. Este último factor no incide en nuestros resultados ya que las poblaciones corresponden solo a mujeres.

En la mayoría de los estudios de biomonitorización que han utilizado estos tipos de test, se ha encontrado una correlación positiva para la frecuencia de MN en función de la edad (Bukvic *et al.*, 2001; Fenech, 1998; Bolognesi *et al.*, 1993) tendencia que también es observada en nuestro grupo control. En cuanto al grupo expuesto esta correlación no es estadísticamente significativa, por lo que podemos decir que existe otro factor diferente a la edad, que está incidiendo en la alta frecuencia de MN de este grupo. En base a estos resultados y tomando en cuenta una frecuencia de MN de casi 3 veces mayor en el grupo expuesto, concluimos que es la exposición a plaguicidas la que está induciendo mayor daño citogenético en las mujeres temporeras de la VIII Región de Chile.

La presencia de otros factores, que inciden en la frecuencia individual de las alteraciones citogenéticas, pueden modificar los resultados o dificultar su interpretación. Sin embargo, nuestros resultados en cuanto a los hábitos de consumo de alcohol y tabaco, no muestran diferencias significativas, lo que se corrobora con otros estudios realizados utilizando la misma técnica (Bukvic *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 1997).

Para el ensayo de ICH nuestros resultados concuerdan en su mayoría con los obtenidos para el bioensayo de MN. En primer lugar obtuvimos diferencias significativas para el promedio de ICH entre ambas poblaciones, lo que nos permite reafirmar que existen alteraciones en el material genético de las mujeres temporeras. Esto lo apoyan numerosos estudios de ICH relacionados con la exposición a plaguicidas de todo el

mundo (Shaham *et al.*, 2001; Padmavathi *et al.*, 2000; Gomez-Arroyo *et al.*, 2000).

El promedio de edad de los grupos estudiados no muestra diferencias significativas lo que nos permitió un correcto análisis de los datos. No encontramos una correlación positiva entre la edad y el promedio de ICH para ninguna de las dos poblaciones. Los estudios realizados con este bioensayo muestran resultados contradictorios para el efecto de la edad. Bender *et al.*, (1988); Scarpato *et al.*, (1996) y Bukvic *et al.*, (2001), no relacionan la edad con los ICH; mientras que Lazutka *et al.*, (1994) y Soper *et al.*, (1984) si lo hacen.

Un factor que influye significativamente en la mayoría de los trabajos realizados con esta técnica, es el consumo de cigarrillos, el que aumenta considerablemente el promedio de ICH (Lazutka *et al.*, 1994). Como resultado de nuestro estudio, no hemos encontrado un aumento significativo de la frecuencia de ICH dentro de los consumidores de tabaco, lo que concuerda con el trabajo publicado por Mäki-Paakkanen (1987). En nuestro estudio confirmamos que estos factores de confusión son variables y difíciles de manejar. Por otra parte las mujeres de nuestro país, y sobretodo las mujeres que formaron nuestro estudio, no tienen hábitos de consumo de cigarrillos excesivo lo que pudo haber influido en nuestros resultados.

Muchas veces la exposición aguda o crónica a contaminantes ambientales causa efectos adversos que se presenta de manera diferida, varios años después de producirse la exposición. Alguno de los efectos de manifiestan en la descendencia de los sujetos expuestos. Entre estos podemos mencionar la teratogenicidad. En Chile ha llamado la atención el incremento de embarazos gemelares siameses que ha afectado a la VI y VII Regiones, según lo planteado por Tchernitchin (1998) el que concluye que sería otro de los tantos ejemplos de teratogenicidad

atribuida a la exposición a plaguicidas. Por esta razón es que nuestro estudio tuvo también como objetivo establecer la relación de exposición de plaguicidas y problemas reproductivos de nuestras mujeres.

En el análisis de PR, la medida de riesgo utilizada (OR) nos indica que los pesticidas son un factor de riesgo para las temporeras y es estadísticamente significativo. Pastor *et al.*, (2001), observó un número importante de abortos espontáneos tal como se puede observar en este trabajo, donde el número de estos en el grupo control fue de 2/49, mientras que en el grupo expuesto fue de 11/50, obteniéndose una elevada significación. Esto concuerda con resultados de numerosos estudios (Engel *et al.*, 2000; Arbuckle y Server, 1998; Petrelli *et al.*, 2000). También hemos encontrado diversos estudios que corroboran la incidencia de malformaciones congénitas debido a exposición (Medina *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2000; Cordier y Goujard, 1994; White *et al.*, 1998).

Finalmente es preciso justificar los resultados obtenidos, en el contexto de la regulación en la aplicación de los plaguicidas. En nuestro país, este aspecto es muy reciente e incluso en la mayoría de los casos, no se cumple con las normas mínimas de seguridad y sanidad lo que se puede validar al haber verificado que las trabajadoras que formaron parte de este estudio no utilizan elementos de protección personal adecuados.

REFERENCIAS

- ARBUCKLE T, SERVER L (1998) Pesticide exposure and fetal death: a review of the epidemiologic literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 28:2065-2069.
- BENDER M, PRESTON R, LEONARD R, PYATT B, GOOCH P, SHLEBY M (1988) Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat. Res.* 204:421-433.
- BLAIR A, ZAHM SH (1995) Agricultural exposures and cancer. *Environ. Health Perspect.* 103:205-208.
- BOLOGNESI C, PERRONE R, LANDINI E (2002) Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis* 18(5):391-397.
- BOLOGNESI C, PARRINI M, BONASSI S IANELLO G, SALANITTO A (1993) Cytogenetic analysis of human population occupationally exposed to pesticides. *Mutat Res* 285:239-249.
- BOLOGNESI C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543:251-272.
- BONASSI S NERI M, LANDO C, CEPPI M, LIN Y, CHANG W, HOLAND N, KIRSHVOLDRES M, ZEIGER E, FENECH M (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the human micronucleus project. *Mutat Res* 543:155-166.
- BUKVIC N, GENTILE G, SUSCA F, FANELLI M, SERIO G, BUONADONA L CARPUSO A, GUANTI G (2001) Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatids Exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res* 498:159-167.
- CORDIER S, GOUJARD J (1994) Occupational exposure to chemical and congenital anomalies: state of the art. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.* 42:144-159.
- DA SILVA AUGUSTO LG, LIEBER SR, RUIZ MA, SOUZA CA (1997). Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. *Environ Molecular Mutagenesis* 29:46-52.
- ENGEL L, O'MEARA E, SCHWARTZ S (2000) Maternal occupation in agriculture and risk limb defect in Washington State 1980-1993. *Scan J. Work Environ. Health.* 26(3):193-198.
- FENECH M (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human population. *Mutat Res* 404:155-165.
- FENECH M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81-95.

- GARAJ-VRHOVAC V, ZELJEZIC D (2001) Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165:153-162.
- GÓMEZ-ARROYO S, DIAZ-SANCHEZ Y, MENESES-PEREZ MA, VILLALOBOS-PIETRINI R, DE LEON-RODRIGUEZ J (2000) Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res* 466:117-124.
- IARC (1991) International Agency for Research on Cancer, Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides, Vol 53, IARC Monographs, Lyon, France.
- JI BT, SILVERMAN DT, STEWARD PA, BLAIR A, SWANSON GM, BARIS D GREENBERG RD, HAYES R, BROWN LM, LILLEMOR KD, SCHOENBERG JB, POTTERN LM, SCHWARTZ AG, HOOVER RN (2001) Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am. J. Ind. Med.* 40:225-226.
- LAZUTKA J, DEDONITÉ V, KRPAVIČKAITÉ D (1994) Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat. Res.* 306:173-180.
- LUCERO L, PASTOR S, SUÁREZ S, DURBÁN R, GÓMEZ C, PARRÓN T, CREUS A, MARCOS R (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mut. Res.* 464:255-262.
- MÄKI-PAKKANEN J (1987) Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchange in blood lymphocytes after occupational exposure to low level of styrene. *Mut. Res.* 189:399-406.
- MÁRQUEZ C, VILLALOBOS C, POBLETE S, VILLALOBOS E, GARCIA MA, DUK S (2005) Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45:1-7.
- MEDINA L, RIVAS F, FERNÁNDEZ R (2002) Risk for congenital malformations in pregnant women exposed to pesticides in the State of Nayarit, México. *Ginecol. Obstet. Mex.* 70:538-544.
- NUMIRMEN T, RANTALA K, KURPPA K, HOLMBERG P (1995). Agriculture work during pregnancy and selected structural malformations in Finland. *Epidemiology* 6(1):23-30.
- PADMAVATHI P, PRABHAVATHI P, REDDY P (2000) Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticides workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:155-160.
- PASTOR S, GUTIÉRREZ S, CREUS A, CELBULSKA-WASILEWSKA A, MARCOS R (2001) Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 495:147-156.
- PETRELLI G, FIGA-TALAMANCA I, TROPEANO R, TANGUCCI M, CINI C, AQUILANI S, GASPERINI L, MELI P (2000) Reproductive male-mediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applications. *Eur. J. Epidemiol.* 16:391-393.
- ROJAS A, OJEDA M, BARRAZA J (2000) Malformaciones congénitas y exposición a plaguicidas. *Revista Médica de Chile.* 128:399-404.
- SCARPATO R, MIGLIORE L, ANGOTZI G, FEDIA, MILIGI L, LOPRIENO N (1996) Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturist: no evidence of DNA damage related to pesticides exposure. *Mutat. Res.* 367:73-82.
- SHAHAM J, KAUFMAN Z, GURVICH R, LEVI Z (2001) Frequency of sister chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 491:71-80.
- SOPER K, STOLLEY P, GALLOWAY S, SMITH J, NICHOLS W, WOLMAN S (1984) Sister-chromatid exchange (SCE) report on control subjects in a study of occupationally exposed workers. *Mutat. Res.* 129:77-88.
- SURRALLÉS J, NATARAJAN A (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res* 392:165-174.
- TAYLOR J (1958) Sister-chromatids exchanges

- in tritium labels chromosomes. *Genetics* 43:515-529.
- TCHERNITCHIN N, TCHERNITCHIN A, MENA M, VILLARROEL L, GUZMÁN C and POLONI P (1998) *Bull Environ Contam Toxicol.* 60: 759-765.
- TUCKER J, AULETTA A, CIMINO M DEARFIELD K, JACOBSON-KRAM D, TICE R, CARRANO A (1993) Sister-chromatid exchange: Second report of the Genotox program. *Mutat Res* 297:101-180.
- VENEGAS W, ZAPATA I, CARBONELL E, MARCOS R (1998) Micronuclei analysis of pesticide sprayers from Concepción Chile. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 18:123-129.
- VIEL JF, CHAILER B (1995). Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides vineyard play a part?. *Occup. Environ. Med.* 52:587-592.
- WADDELL G, BURTON AK (2001) Occupational health guidelines for the management of low back pain at work: evidence review. *Occup Med* 51:124-35.
- WESSELING C, PARRA M, ELGSTRAND K (1998) Fruits production, pesticides and the health of women workers. *Int Report IDC 4.* National Institute for Working Life. International Development Cooperation. S-17184. Solna, Sweden.
- WHITE F, COHEN F, SHERMAN G, MaCCURDI R (1988) Chemicals, Birth defects and stillbirths in New Bruswick: Assosiatons with agricultural activity. *CMAJ.* 138:117-124.
- ZUSKIN E, SCHACHTER EN, MUSTAJBEGOVIC J (1993). Respiratory function in greenhouse workers. *Int. Arch. Environ. Health.* 64:521-552.