

Artículo Original

Frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades en células de epitelio bucal en agricultores de frutilla de la ciudad de Areguá**Frequency of micronuclei and other abnormalities in buccal epithelial cells in strawberry farmers in the city of Areguá**

María Eva López Vera¹, Patricia Magdalena Mendoza Centurión¹,
María Marcelina Sánchez Irala¹, Jessica Araceli Gutiérrez¹, Arturo Benítez¹,
Nery López Acosta³, Tomás López Arias² & Virginia Fernández Peralta¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor de correspondencia: mariaeval93@gmail.com.

Resumen: Con el crecimiento mundial se produce un aumento en la producción de alimentos y, en consecuencia, el uso de pesticidas que pueden afectar la salud humana. El estudio del epitelio bucal de agricultores podría revelar evidencias de daño genético por exposición ocupacional. Considerando tales características es importante realizar este estudio para evaluar el efecto de forma sencilla, rápida y económica; mediante la prueba de micronúcleos (MN) y detección de anormalidades nucleares (AN). La población evaluada estuvo constituida por agricultores de frutilla de la Ciudad de Areguá, Central, Paraguay. El grupo control conformado por 26 individuos y el grupo expuesto 22 individuos. Se realizó el conteo de 2000 células por individuo, el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics 23. Se compararon el grupo expuesto con el no expuesto, en relación al comportamiento de cada una de las variables de la encuesta, usando un análisis de varianza univariado. Posteriormente, se aplicó t de Student para comparar la significancia del daño en el ADN entre ambos grupos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos estudiados para las variables como: Broken Egg, Pignosis, Cariorrexis y Binucleadas. Sin embargo, el grupo expuesto presenta una diferencia estadística significativa para Micronúcleos y Cariolisis ($p < 0,05$), esto demuestra un mayor daño celular para dicho grupo. Lo cual puede deberse a factores como el estilo de vida que presenta este grupo social, su exposición prolongada a agroquímicos, al sol y la falta de protección básica durante la manipulación de agentes químicos.

Palabras clave: *genotoxicología, daño celular, micronúcleos, epitelio bucal, agricultores de frutilla.*

Abstract: As the global population grows, food production increases, along with the use of pesticides that can affect human health. Studying the oral epithelium of farmers may provide evidence of genetic damage due to occupational exposure. Given these conditions, it is important to conduct this study to evaluate such effects in a simple, rapid, and cost-effective way, using the micronucleus (MN) test and the detection of nuclear abnormalities (NA). The study population consisted of strawberry farmers from the city of Areguá, Central, Paraguay. The control group included 26 individuals, and the exposed group included 22. A total of 2,000 cells per person were analyzed, and statistical analyses were conducted using SPSS Statistics 23. Comparisons between the exposed and non-exposed groups were made using univariate ANOVA for each survey variable. Subsequently, Student's t-test was applied to determine the significance of DNA damage between the two groups. No statistically significant differences were found between groups for the variables Broken Egg, Pyknosis, Karyorrhexis, and Binucleated cells. However, the exposed group showed significant differences for Micronuclei and Karyolysis ($p < 0.05$), indicating greater cellular damage. These findings may be related to lifestyle factors, prolonged exposure to agrochemicals and sunlight, and the lack of basic protection when handling chemical agents.

Key words: *genotoxicology, cell damage, micronuclei, buccal epithelium, strawberry farmers.*

Introducción

En los últimos años el uso de plaguicidas en los diferentes cultivos ha aumentado considerablemente, lo que conlleva a diferentes problemáticas, entre las que se encuentra afectada la salud humana. La cavidad oral refleja el estado de salud de los individuos, debido a que la mucosa que la recubre, puede presentar evidencias a nivel microscópico como macroscópico de cambios indicativos de enfermedad local sistémica o por exposición a sustancias tóxicas así como efectos secundarios por tratamientos (Hei y Filipic, 2004). Debido a la exposición ocupacional los agricultores son los que poseen mayor riesgo de presentar daños en su material genético. Por ello la importancia de realizar el estudio en las células de la mucosa oral para evaluar el efecto genotóxico y citotóxico, de forma sencilla, rápida y económica; esto mediante la prueba de micronúcleos (MN) y detección de diversas anormalidades nucleares (AN) (Tolbert et al., 1992). El epitelio de revestimiento oral (60%) es estratificado no queratinizado formado por células con abundante citoplasma, permite la penetración de colorantes y facilita la observación e identificación de características morfológicas del núcleo y membrana celular (Squier & Kremer, 2001). Este epitelio es de fácil acceso, poco invasivo, por lo que al tomar la muestra a los individuos, se les genera mínimo estrés (Bonassi et al., 2011). Por lo tanto el epitelio oral es un tejido excelente para aplicar la técnica de micronúcleos y detección de otras anormalidades nucleares sin necesidad de realizar otros tipos de técnicas más complicadas, lo que representa una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos en poblaciones expuestas constantemente a algún mutágeno (Torres-Bugarín et al., 2000). Los fenómenos genotóxicos o aberraciones más frecuentes son las células binucleadas (BN), los micronúcleos (MN), yemas nucleares (NBUD) y puentes nucleoplasmáticos (NPB) o dicéntricos, mientras que los derivados de fenómenos citotóxicos conllevan a muerte celular como en el caso de apoptosis, cariólisis, picnólisis y necrosis (Tejedor Cassiani, 2011).

El Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental Facultad de Ciencias Exactas y Naturales posee una amplia experiencia en cuanto a estudios de biomarcadores en mucosa bucal en personas expuestas a diferentes mutágenos. Se puede demostrar la trayectoria en evaluación de micronúcleos en los trabajos de monitoreo de poblaciones ocupacionalmente expuestas a otros contaminantes como los de Segovia et al., (2007). Benítez-Leite, et al., (2010) en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas, Gomez Grance et al., (2010) evaluación de micronúcleos en pacientes expuestos a cobaltoterapia y Fernandez, et al. (2012) con la evaluación genotóxica en pacientes con cáncer de tiroides sometidos a iodoterapia.

Metodología

Los grupos a ser evaluados fueron sometidos a una encuesta preliminar y firmaron una nota de consentimiento para participar del proyecto. Cada persona fue encuestada y a la misma se le explicó en detalle la investigación de la cual participa.

Antes a la toma de muestra las personas realizaron un enjuague bucal con agua corriente a fin de eliminar restos de alimentos. Se raspó con una paleta bajalenguas de madera cuidadosamente la parte interna de ambas mejillas, para la extracción de la mucosa bucal de las personas a ser estudiadas. Se realizó el extendido de la muestra tomada sobre un portaobjeto limpio (3 muestras por individuo) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Se fijó el preparado en etanol absoluto durante 30 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se realizó la hidrólisis en HCL 5N durante 30 minutos. Luego se colocó las muestras hidrolizadas, en reactivo de Schiff, siguiendo la técnica de Feulgen, durante 2 horas en ausencia de luz. Se lavaron las láminas con agua corriente, y se dejaron secar a temperatura ambiente. El análisis de las muestras consistió en comparar el grupo expuesto (n=22), grupo control (n=26). Se observaron 2000 células por individuo de cada grupo a ser estudiado (grupo caso y grupo control), en microscopios Ópticos con

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) con *p-valor* = 0,05 de significancia.

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Micronúcleos	Entre grupos	9,325	1	9,325	4,485	,040
	Dentro de grupos	95,654	46	2,079		
	Total	104,979	47			
Broken Egg	Entre grupos	8,183	1	8,183	1,107	,298
	Dentro de grupos	340,129	46	7,394		
	Total	348,313	47			
Pignosis	Entre grupos	3,591	1	3,591	,366	,548
	Dentro de grupos	451,388	46	9,813		
	Total	454,979	47			
Cariolisis	Entre grupos	577,518	1	577,518	5,515	,023
	Dentro de grupos	4816,962	46	104,717		
	Total	5394,479	47			
Cariorrexis	Entre grupos	,168	1	,168	,005	,945
	Dentro de grupos	1609,748	46	34,995		
	Total	1609,917	47			
Binucleadas	Entre grupos	,507	1	,507	,184	,670
	Dentro de grupos	126,472	46	2,749		
	Total	126,979	47			

aumento de 1000x. Para establecer la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades del núcleo que se pueden distinguir de células normales por sus alteraciones ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo, entre ellas se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexia (CR), núcleo picnótico (NP), cariólisis (CL), núcleo lobulado también llamado prolongación nuclear, “bud cell” o “broken eggs” (NL, BE) y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN).

Análisis estadísticos: el análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS Statistics 23. Se comparó el grupo de personas expuestas con el de las no expuestas, en relación al comportamiento de cada una de las variables de la encuesta, usando un análisis de varianza univariado. Posteriormente, se aplicó una t de Student para

comparar la significancia del daño en el ADN (test de Micronúcleos) entre ambos grupos.

Resultados y discusión

En relación a las anomalías celulares estudiadas mediante las entrevistas y toma de muestras de la mucosa bucal de las personas expuestas y no expuestas a algún tipo de plaguicidas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados para la mayoría de las variables, tales como: Broken Egg, Pignosis, Cariorrexis y Binucleadas. Sin embargo, el grupo de personas expuestas presenta una diferencia estadística significativa en cuanto a Micronúcleos y Cariólisis ($p < 0,05$). Tablas 1 y 2.

Los agricultores de frutilla de la ciudad de Areguá, presentaron mayores signos de daño celular de acuerdo a los análisis estadísticos, el grupo control

Tabla 2. Prueba *T-Student* para comparación de significancia de medias de los grupos control y expuesto.

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias			
		F	Sig.	T	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar
Micronúcleos	Se asumen varianzas iguales	9,677	,003	2,118	,040	,885	,418
	No se asumen varianzas iguales			2,013	,053	,885	,440
Broken Egg	Se asumen varianzas iguales	,080	,778	1,052	,298	,829	,788
	No se asumen varianzas iguales			1,051	,299	,829	,788
Pignosis	Se asumen varianzas iguales	2,831	,099	,605	,548	,549	,907
	No se asumen varianzas iguales			,585	,562	,549	,938
Cariolisis	Se asumen varianzas iguales	2,102	,154	2,348	,023	6,962	2,964
	No se asumen varianzas iguales			2,267	,030	6,962	3,070
Cariorexix	Se asumen varianzas iguales	,041	,840	-,069	,945	-,119	1,714
	No se asumen varianzas iguales			-,071	,944	-,119	1,678
Binucleadas	Se asumen varianzas iguales	,002	,965	,429	,670	,206	,480
	No se asumen varianzas iguales			,431	,669	,206	,479

es una población de trabajo leve, mayoritariamente en oficinas, estilo de vida saludable, sin consumo de alcohol ni exposición a cigarrillos.

Se encontró un mayor número de células con MN (0,075%) y en cariolisis (0,85%) en los individuos expuestos, en comparación

con las células de la población no expuesta a agroquímicos MN (0,03%) y en kariolisis (0,5%) respectivamente, con una $p \leq 0.05$ para la prueba de T-Student con una significancia de 0.040 para MN y 0.023 para kariolisis. Para las demás aberraciones como Kariorrexis ($p=0.945$), Broken egg ($p= 0.298$), Binucleadas ($p= 0.670$), Pignosis ($p= 0.548$) no se obtuvieron valores significativos como se puede observar en la Tabla 2.

En la Figura 1 se puede observar el promedio de las anomalías celulares encontradas tanto en el grupo expuesto (izquierda) como en el grupo control (derecha). En la Figura 2 se observa el diagrama de caja y bigotes de las anomalías celulares.

Los hábitos de no usar equipos de protección como: guantes, tapabocas, chalecos exclusivos para fumigación, sombreros durante la exposición prolongada al sol y calzados apropiados podrían inducir a la formación de micronúcleos y otras anomalías nucleares, siendo la más frecuente la kariolisis. Según estudios de Martínez et al., (2017) personas ocupacionalmente expuestas a ciertos agentes químicos y que no utilizan equipos de protección básica marcan un incremento significativo en frecuencias de células con anomalías nucleares comparando con las de

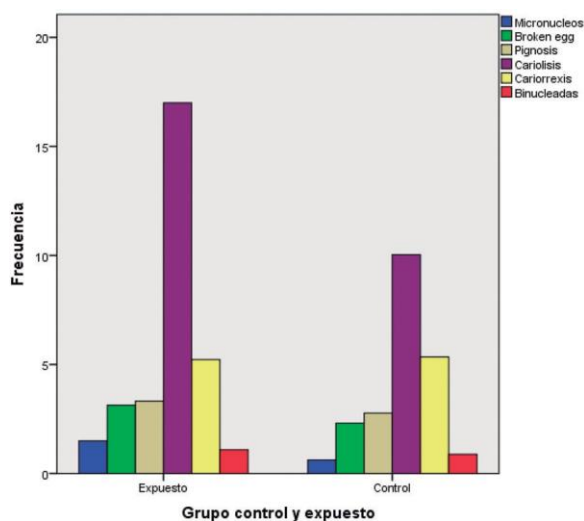


Figura 1. Promedio de anomalías celulares de personas grupo control y expuesto.

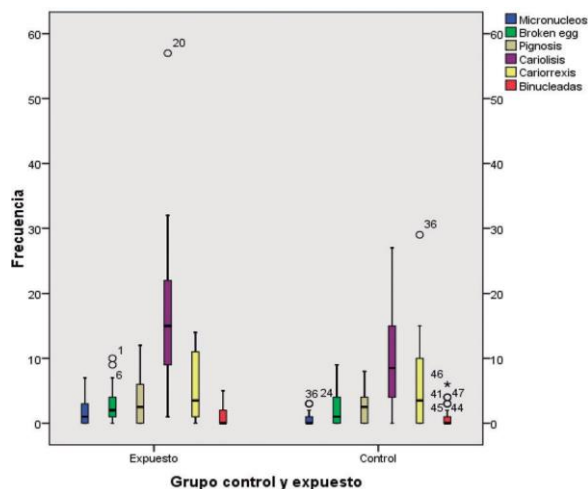


Figura 2. Diagrama de cajas y bigotes de las anomalías celulares.

los controles, según estos autores la inhalación de los vapores de plaguicidas rociados en invernaderos influye en el resultado.

Conclusión

Basado en los resultados de los análisis estadísticos se verifica un incremento en el daño celular en personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, si bien, la presencia de no garantiza que las personas desarrollarán algún tipo de enfermedad, es indicador de una inestabilidad celular, que sirve como monitoreo del daño genético ante este por riesgo ocupacional.

Además, cabe mencionar que el estilo de vida y la falta de rigurosidad en la implementación de equipos de protección pueden estar generando estos desfases entre el grupo control y el grupo expuesto. Los datos obtenidos también ayudaron a evaluar la calidad del ambiente laboral, así como concientizar a la población expuesta a adquirir buenas prácticas de manejo laboral en el momento de la fumigación.

Agradecimientos

Agradecemos al CONACYT y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el financiamiento del Proyecto PINV16-718, así también, a los agricultores de frutilla por la cordialidad y el

diálogo abierto que tuvieron con el equipo investigador, además, a las personas que fueron parte del grupo no expuesto (funcionarios de diversas universidades de la UNA).

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento CONACYT PINV16-718.

Literatura citada

- Benítez-Leite, S., Macchi, M.L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E.A., Mojoli, A., Cuevas, J.A. & Sales, L. (2010). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatría (Asunción)*, 37(2): 97–106.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. & Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1): 93–100. <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>>.
- Fernández, V., Gómez, F., Jara York, J., Gómez, A., Fernández, D.R., Sales de Lima, L., Bobadilla, N., Benítez, M., López, D. & Barboza, C. (2012). Evaluación genotóxica en pacientes con cáncer de tiroides sometidos a iodoterapia. *BAG Journal of Basic and Applied Genetics*, 23(Supl. 1): 344–345.
- Gómez Grance, F.J., Fernández, V., Guggiari, G., Resquin, T., Cabañas Duarte, F., Gómez, A. & Alfonso, J. (2010). Dosimetría biológica basada en la detección de micronúcleos en pacientes expuestos a cobaltoterapia en Paraguay. Reportes Científicos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 1(1): 80–89.
- Hei, T.K. & Filipic, M. (2004). Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5): 574–581. <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.003>>.
- Ortega Martínez, L.D., Martínez Valenzuela, C., Waliszewski, S.M., Ocampo Mendoza, J., Huichapan Martínez, J., El Kassis, E., Soto Ruiz, G. & Pérez Armendáriz, B. (2017). Nivel tecnológico de invernadero y riesgo para la salud de los jornaleros. *Nova Scientia*, 9(18): 21–42. <<https://doi.org/10.21640/ns.v9i18.730>>.
- Segovia, J., Castiglioni, D., Fernández, V. & Franco, D. (2007). Evaluación citotóxica y genotóxica de células de mucosa bucal de personas ocupacionalmente expuestas a contaminantes de fotocopiadoras. *Investigaciones y Estudios de la Universidad Nacional de Asunción*, 3: 45–52.
- Squier, C.A. & Kremer, M.J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs*, 2001(29): 7–15. <<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003443>>.
- Tejedor Cassiani, L. (2011). Biomonitorio de células bucales a partir de micronúcleos en soladores de metales en Cartagena. (Tesis doctoral). Cartagena: Universidad Nacional de Colombia. 140 pp. <<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/7796/598925.2011.pdf>>.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M. & Allen, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1): 69–77. <[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-I](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-I)>.
- Torres-Bugarín, O. & Ramos-Ibarra, M.L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2): 650–657. <<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>>.

Anexos

Tabla A-1. Valores de las desviaciones y media de las anomalías del grupo control y expuesto.

	Grupo control y expuesto	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Micronúcleos	Expuesto	22	1,50	1,871	,399
	Control	26	,62	,941	,185
Broken Egg	Expuesto	22	3,14	2,731	,582
	Control	26	2,31	2,710	,531
Pignosis	Expuesto	22	3,32	3,759	,801
	Control	26	2,77	2,487	,488
Cariolisis	Expuesto	22	17,00	12,383	2,640
	Control	26	10,04	7,992	1,567
Cariorrexis	Expuesto	22	5,23	5,080	1,083
	Control	26	5,35	6,536	1,282
Binucleadas	Expuesto	22	1,09	1,630	,348
	Control	26	,88	1,681	,330



Figuras A-1 y A2. Agricultores de frutilla en sus actividades habituales. **A-1)** Agricultores sin calzados adecuados en el cultivo. **A-2)** Agricultores sin protección apropiada durante su exposición al sol.



Figuras A-3–A-8. Investigación de campo y laboratorio del equipo. **A-3)** Toma de muestra a los individuos de estudio. **A-4)** Encuesta a los agricultores en la Ciudad de Areguá. **A-5)** Encuesta a los agricultores en la Ciudad de Areguá. **A-6)** Microscopio con cámara indexada. Adquisición de la cámara fotográfica por medio del proyecto. **A-8)** Observación de células del epitelio bucal con micronúcleos. Aumento 100x. **A-7)** Células con alteraciones: Binucleadas (izquierda), Broken egg (medio), Cariorrexis (derecha).