

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO GENOTÓXICO DE LOS PLAGUICIDAS EN UNA POBLACIÓN
COSTARRICENSE DE TRABAJADORAS BANANERAS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae.

Vanessa de los Ángeles Ramírez Mayorga

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio"
San José, Costa Rica

1998

DEDICATORIA

A mis padres: Edwin y María de los Ángeles.

A mis hermanos: Edwin Enrique, Fabiola y María del Rocío.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas :

A la doctora Patricia Cuenca Berger, por confiar en mí para llevar a cabo esta investigación, por su apoyo, enseñanzas y sugerencias académicas durante la realización de este trabajo.

Al doctor Jaime García por sus sugerencias y el interés mostrado durante el desarrollo de esta tesis.

Al doctor Ramiro Barrantes por la lectura y sugerencias realizadas a esta. Al doctor Arodís Robles por la asesoría en el manejo estadístico de los datos y por el interés mostrado en el progreso de este trabajo.

A la doctora Patricia Ostroky-Wegman por sus enseñanzas, apoyo, estímulo y amistad.

Al doctor Emilio Rojas por el adiestramiento y asesoría brindada con el manejo del ensayo cometa.

A la doctora María Eugenia Gonsebatt por su orientación con el ensayo de micronúcleos.

Al señor Federico Hernández, por su dedicación en el manejo de las muestras, tanto en el campo como en el laboratorio.

A Fernando Ortiz, Fernando Morales, Guillermo Thiele, por su ayuda en el análisis microscópico de las muestras, así como a Gabriela Briceño, Carolina Chaves, Adriana Pacheco y Jackeline Vargas, quienes además colaboraron en las giras de campo y la colecta de datos.

A Manuel Campos, M.Sc. por las explicaciones del manejo estadístico de los datos y el diseño de algunos de los programas. También por su interés, ayuda y sugerencias a través de mis estudios universitarios.

Al señor Henry Morales por su dedicación en el diseño y manejo de las bases de datos.

Al personal técnico, administrativo y profesional del INISA, que de una u otra forma apoyaron la realización de este proyecto, en especial a la directora Rafaela Sierra M.Sc. por el respaldo brindado.

A los colegas y amigos del Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que aprendí a su lado.

Al Ministerio de Salud; al personal del Hospital y del Centro de Salud de Guápiles, por su valiosa ayuda en la recolección de las muestras. Especialmente a la señora Ana Morales, técnico de salud ocupacional, quién facilitó el acceso a las compañías bananeras del lugar.

A las compañeras de Liga Internacional de Mujeres Pro Paz y Libertad (LIMPAL) por su colaboración en la normalización de la encuestas y por haber facilitado el contacto con algunas mujeres trabajadoras del empaque de banano.

A las trabajadoras bananeras por compartir sus experiencias conmigo y a las mujeres de la comunidad de Guápiles por su participación en este estudio.

A los dueños de las fincas bananeras que nos permitieron el ingreso a las empacadoras y facilitaron el contacto con las trabajadoras.

A la licenciada Mayela Zamora por su apoyo, consejos y muestras de cariño durante mi vida universitaria.

A: Ana María, Élida, Loretta, Milly, Ruth, María Eugenia, Fresia, Marcela, Lidilia, Gustavo y Emilio por sus palabras de aliento y el tiempo compartido durante todos estos años.

A Sergio por su ayuda y compañía durante diferentes etapas de esta tesis.

A Fernando por las horas compartidas en las cuales arreglamos el mundo, por prestarme su hombro para llorar y darme un abrazo para seguir.

A mi amada familia por confiar en mí, por enseñarme a ser libre y apoyar incondicionalmente cada uno de mis actos. Además de darme la fuerza para persistir y a Dios, por mi vida.

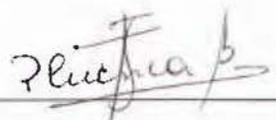
Esta tesis recibió apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica bajo el proyecto No. 742-95-277, de FUNDEVI, de la Organización Panamericana de Salud a través del programa PLAGSALUD/MASICA y del CONICIT.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.



Dr. Alvaro Morales Ramírez

Representante de la Decana
Sistema de Estudios de
Posgrado



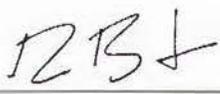
Dra. Patricia Cuenca Berger

Directora de Tesis



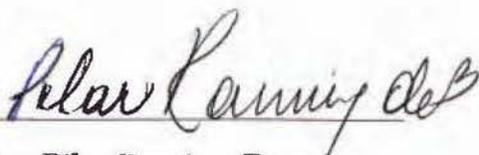
Dr. Jaime García González

Asesor



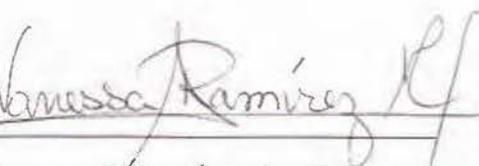
Dr. Ramiro Barrantes Mesén

Asesor



Dra. Pilar Ramírez Fonseca

Directora
Programa en Biología



Vanessa de los Ángeles Ramírez Mayorga

Candidata

INDICE

	Pág.
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	vi
Indice	vii
Resumen	x
Lista de cuadros	xii
Lista de figuras	xv
Lista de abreviaturas	xvi
INTRODUCCION	1
Uso de plaguicidas en Costa Rica	9
HIPOTESIS DE TRABAJO	12
OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Población en estudio	13
Recolección de muestras	15
Marcadores de genotoxicidad	17
Diagnóstico genético	19
Ensayo de micronúcleos	19
Electroforesis de células únicas	19
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	25
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58

BIBLIOGRAFIA	59
APENDICE I	73
Formularios	73
Datos generales	73
Historia de su presente y pasado ocupacional	74
Historial de exposición	77
Historial de fumado	79
Historial médico	80
Historia nutricional	83
Historial genético	86
Información para muestras posteriores	88
Consentimiento informado	90
APENDICE II	91
Materiales	91
Equipo de laboratorio	92
Otros	93
Ensayo de micronúcleos	94
Normalización del ensayo de micronúcleos en linfocitos bloqueados con citocalasina B	94
Protocolo 1 (Micronúcleos de linfocitos usando citocalasina B)	94
Fase I. Establecimiento de los cultivos	94
Fase II. Fijación	95
Fase III. Tinción	96
Criterios para el análisis de células binucleadas y micronúcleos	97
Características de la célula	97
Características de los micronúcleos	98
Ensayo COMETA	99
Normalización del ensayo cometa	99

Protocolo 2 (Electroforesis de células únicas)	99
Fase I. Preparación de las células blancas	99
Fase II. Preparación de la muestra	100
Fase III. Electroforesis	102
Requerimientos para el análisis de las electroforesis de células únicas	104
APÈNDICE III	105

RESUMEN

El uso de plaguicidas en los países en desarrollo es extenso en cantidad y en tiempo. Un gran porcentaje de lo que se aplica queda en el entorno y en los organismos que ahí habitan. Lo cual acarrea tanto problemas de contaminación ambiental como un detrimento en la salud de las personas que están en contacto con ellos. Los efectos se pueden manifestar a corto o a largo plazo y los síntomas pueden variar mucho desde un dolor de cabeza hasta el desarrollo de cáncer. En este sentido, la mayoría de los estudios están orientados hacia los efectos agudos; otros hacia los efectos crónicos y una pequeña cantidad hacia el efecto genotóxico de los plaguicidas.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto genotóxico de los plaguicidas utilizados en las empacadoras de banano. Para esto se utilizaron como marcadores biológicos: el ensayo de micronúcleos de cultivo de linfocitos en células binucleadas y la electroforesis de células únicas en linfocitos aislados de sangre periférica (conocido como ensayo cometa).

Esta investigación se enmarca como un estudio caso: testigo (del inglés case: control). La población en estudio fue de 68 mujeres (32 casos y 36 testigos) para el ensayo de micronúcleos. La electroforesis de células únicas se realizó a 58 mujeres (30 casos y 28 testigos). Las fincas visitadas están ubicadas en el cantón de Pococí, Limón, Costa Rica.

Los resultados obtenidos con el ensayo de micronúcleos, indican que no existe una diferencia significativa entre los casos y los testigos. Sin embargo, las mujeres que trabajan en las empacadoras con hijos nacidos muertos o abortos espontáneos tienen 1,45 veces más probabilidades de tener micronúcleos que sus compañeras de trabajo sin hijos nacidos muertos o abortos espontáneos. Lo que puede ser un indicador de susceptibilidad genética. En el caso de la electroforesis de células únicas, se presenta un daño significativo en la hebra sencilla del ADN después de cinco años de trabajar en el empaque.

En este sentido, existe una relación entre el daño en la hebra sencilla del ADN y la exposición ocupacional a plaguicidas, a pesar de que estos no tienen un efecto sobre la frecuencia de micronúcleos en las trabajadoras. Se desconoce si el daño observado en el ADN se debe a los plaguicidas que se utilizan actualmente en el empaque de banano o a otros plaguicidas, pues no se tiene certeza desde cuando se utilizan estos productos.

Es importante continuar generando información en este campo, de manera que el trabajo se puede orientar en tres frentes: 1. Realizar estudios *in vitro* con los plaguicidas utilizados en la planta empacadora, 2. Monitorear la salud de las personas usando el ensayo cometa, 3. Implementar el uso de biomarcadores de susceptibilidad.

Lista de cuadros

	Pág.	
Cuadro 1	Sitios de acción primarios con los que interfieren algunos plaguicidas.	4
Cuadro 2	Plaguicidas utilizados en las fincas visitadas.	16
Cuadro 3	Comparación (en porcentaje) de algunas de las variables en estudio. Mediante el ensayo de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos. En una muestra de mujeres expuestas y no expuestas a plaguicidas (N=69).	26
Cuadro 4	Comparación de las variables investigadas entre las mujeres expuestas y las mujeres no expuestas (N=68, 32 expuestas a plaguicidas y 36 no expuestas).	27
Cuadro 5	Comparación de la frecuencia de las variables estudiadas para micronúcleos de linfocitos entre expuestas y no expuestas, según categoría de exposición.	28
Cuadro 6	Comparación de las variables investigadas entre las mujeres expuestas y las mujeres no expuestas por medio de un análisis de regresión logística (N= 28 470 células expuestas y 33 361 células no expuestas).	30
Cuadro 7	Análisis de regresión logística por grupo (N= 28 740 células expuestas y 33 361 células no expuestas).	30
Cuadro 8	Comparación (en porcentaje) de algunas variables en estudio. Mediante la electroforesis de células únicas (ensayo cometa). En una muestra de mujeres expuestas y no expuestas a plaguicidas (N=58).	32
Cuadro 9	Comparación de las variables en estudio (N=58, 30 mujeres expuestas y 30 mujeres no expuestas), mediante el ensayo cometa.	33

Cuadro 10	Promedio de las distancias de la migración del ADN en micras (largo de la cola del cometa) según categorías por tiempo de exposición en meses.	34
Cuadro 11	Daño en la hebra sencilla del ADN, análisis de la exposición a plaguicidas por medio de una regresión lineal múltiple (N= 1250 células, 625 células expuestas y 625 células no expuestas).	36
Cuadro 12	Análisis de las variables que influyen en la migración del ADN del grupo de expuestas por medio de una regresión lineal múltiple (N=625 células).	37
Cuadro13	Análisis de las variables que influyen en la migración del ADN del grupo de no expuestas por medio de una regresión lineal múltiple (N=625 células).	38
Cuadro 14	Análisis de las variables (N= 1 250: 625 células expuestas y 625 células no expuestas) por medio de una regresión lineal múltiple.	39
Cuadro 15	Análisis de las variables por medio de un análisis de regresión múltiple (N= 1 250 células, 625 células expuestas y 625 células no expuestas).	40
Cuadro 16	Análisis de las variables por medio de una regresión múltiple (N= 750 células, 375 células expuestas y 375 células no expuestas). Grupo con 1 a 60 meses de exposición.	43
Cuadro 17	Análisis de las variables por medio de una regresión múltiple (N=200 células, 100 células expuestas y 100 células no expuestas). Grupo de 61-120 meses de exposición.	43
Cuadro 18	Análisis de las variables por medio de una regresión lineal	44

	múltiple (N=150 células, 75 células expuestas y 75 células no expuestas). Grupo de 121 a 180 meses de exposición.	
Cuadro 19	Análisis de las variables por medio de una regresión lineal múltiple (N= 150 células, 75 células expuestas y 75 células no expuestas). Datos de más de 181 meses de exposición.	44
Cuadro 20	Efectos genéticos de algunos plaguicidas.	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Esquema de la planta empacadora de una finca bananera.	14
Figura 2 Linfocitos de sangre periférica; bloqueados con citocalasina B. A. Célula binucleada normal. B. Célula binucleada con micronúcleo (m).	20
Figura 3 Electroforesis de células únicas. A. Célula sin daño en la hebra sencilla del ADN. B y C. Células con el ADN dañado. La migración de la hebra sencilla es proporcional al daño nuclear.	21

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CEC	Comisión de Comunidades Europeas
DBCP	1,2-dibromo-3-cloropropano
e.	Mujeres expuestas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
F	Estadística F (ANDEVA)
GSTM1	Glutación-S-Transferasa M1
GSTT1	Glutación-S-Transferasa T1
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
n.e.	Mujeres no expuestas o testigos
NAT2	N-acetil transferasa 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
R ²	Coefficiente de determinación
β	Coefficiente de regresión

INTRODUCCIÓN

La necesidad de producir una mayor cantidad de alimentos y proteger al hombre, los animales, las plantas, las viviendas y los productos agrícolas contra la aparición de plagas y enfermedades, indispensable el uso de plaguicidas. Estos se definen como cualquier producto biológico, sustancia o mezcla de sustancias de naturaleza química destinada a luchar, controlar, prevenir, atenuar, repeler o regular la acción de organismos que alcanzan el nivel de plagas que amenazan los cultivos agrícolas, la ganadería o la salud humana (Fernández 1983).

El uso de plaguicidas se ha incrementado dramáticamente en el mundo durante las últimas décadas. Se estima que en 1980 se usaron 50 000 toneladas de plaguicidas en países en desarrollo, lo que equivale alrededor de 10 % del uso total de plaguicidas (Dich *et al.* 1997). En 1994 el mercado mundial de los plaguicidas se valoró en US\$ 25 000 millones y aumentó hasta US\$ 30 560 millones en 1996 (García, 1998). En los últimos años se han producido plaguicidas que son más efectivos a dosis menores. Hay registrados alrededor de 1500 químicos para ser usados en las formulaciones de los plaguicidas (la gran mayoría de ellos no han sido evaluados formalmente), y menos de 50 compuestos son utilizados en 75% de las formulaciones (Dich *et al.* 1997).

Es reconocido que su uso acarrea una serie de efectos indeseables en la salud humana, aparte de la contaminación ambiental (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt 1996, García 1997). Además, todos los años se introducen centenares de productos nuevos en el mercado internacional, lo que ha creado un panorama toxicológico sumamente complejo, ya que los efectos tóxicos de estos productos pueden variar enormemente según sea el grupo químico al cual pertenecen y las propiedades particulares de cada sustancia (Fernández 1983, Hilje *et al.* 1987).

Los plaguicidas tienen diferentes grados de toxicidad; aceptando que una sustancia es tóxica cuando, al ser ingerida, respirada o después de haber entrado en

contacto cutáneo, causa efectos indeseables o anormales en el funcionamiento correcto de algunos órganos o del cuerpo, afectando la salud o bien provocando trastornos de curación lenta o la muerte (Fernández 1983).

Según diversos autores la peligrosidad de un plaguicida está influenciada por factores como:

1. La especie: los diferentes géneros y especies de animales, tienen una susceptibilidad diferente a un mismo producto. Esto constituye uno de los principales problemas para relacionar el grado de peligrosidad con el hombre, ya que la protección humana se basa en datos obtenidos de animales (de Raat *et al.* 1997).
2. El sexo: El envenenamiento varía según se trate de machos o hembras . La diferencia entre la respuesta de machos y hembras a los agentes tóxicos, puede estar relacionada con la toxicodinámica (susceptibilidad incrementada de un órgano crítico) o la toxicocinética (diferencias en la distribución y biotransformación del agente). Estudios realizados con ratas, utilizando plaguicidas organofosforados, indican que las hembras son más susceptibles a algunos plaguicidas, mientras que los machos son más susceptibles a otros. Esta diferencia de susceptibilidad puede ser atribuida a la tasa de metabolismo por las enzimas microsomales del hígado de los compuestos que ingresan al organismo y la toxicidad relativa de estos y sus metabolitos. Cuando los metabolitos son más tóxicos que los compuestos originales, los machos, que poseen una tasa de metabolismo del hígado más rápido, son más susceptibles a la biotransformación enzimática del tóxico: este proceso de desintoxicación se ve influenciado por las hormonas sexuales. Por otro lado, cuando los compuestos originales son más tóxicos que los metabolitos, los machos son más resistentes. Lo anterior se debe a que los estrógenos tienen un efecto estimulador relativamente menor que los andrógenos, de manera que las hembras de las especies son más susceptibles que

- los machos a la detoxificación de los químicos por el metabolismo (Jaffery y Viswanathan 1986).
3. La edad: generalmente los animales más jóvenes y los más viejos son más susceptibles a los plaguicidas.
 4. La ruta de entrada (Amer y Fahmy 1982, de Raat *et al.* 1997): una sustancia aplicada oralmente es más tóxica que si lo es sobre la piel; debido a que se absorbe en mayor cantidad y entra más rápido en contacto con la sangre que cuando es aplicada sobre la piel (Fernández 1983).
 5. Los diluyentes: el plaguicida actúa de manera diferente según sea el diluyente usado en su administración. Por lo general los vehículos aceitosos son mejores que el agua y penetran con más facilidad la piel, en comparación con los polvos solubles en suspensiones acuosas.
 6. Duración de la exposición al veneno (de Raat *et al.* 1997): cuanto mayor es la permanencia en contacto con el mismo, mayores son los riesgos de envenenamiento que se corren (Fernández 1983).
 7. Otros: también son importantes la periodicidad con la que se aplican los plaguicidas, la dosis, la solubilidad, la volatilidad, la persistencia y el efecto residual de éstos; así como la susceptibilidad de los individuos que los aplican. Además la respuesta a un químico en particular puede variar considerablemente de individuo a individuo, los que pueden estar predispuestos por infecciones o malnutrición (Jaffery y Viswanathan 1986, Ostrosky-Wegman y Gonsebatt 1996); de manera que estos factores deben tomarse en cuenta a la hora de desarrollar estudios de monitoreo (Anónimo 1993, Ostrosky-Wegman y Gonsebatt 1996).

Para estudiar el efecto que pueden tener los plaguicidas en las personas que están en contacto con ellos, es necesario conocer el modo de acción y el tipo de sitio en el que interactúan. Estos pueden ejercer su efecto durante la sinapsis, interfiriendo la transmisión del impulso nervioso (inhibiendo la acetilcolinesterasa) o con los receptores sinápticos (produciendo la liberación excesiva de acetilcolina), así como

interfiriendo en el funcionamiento de ciertas enzimas y otros sitios de acción menos definidos (Corbett *et al.* 1984). En el cuadro 1 se mencionan algunos ejemplos de plaguicidas y el sitio con el que interfieren.

Los insecticidas organofosforados han sido clasificados como inhibidores de la acetilcolinesterasa; estos plaguicidas tienen un amplio rango de toxicidad: desde productos extremadamente tóxicos (como el tetraetilpírofosfato con una dosis letal media - LD₅₀ - de 1 mg/kg), hasta compuestos con un bajo grado de toxicidad aguda (como el abate con una LD₅₀ de más de 8 mg/kg). La mayoría de los plaguicidas organofosforados son absorbidos por inhalación, ingestión y a través del contacto con la piel (Steenland 1996).

Cuadro 1: Sitios de acción primarios con los que interfieren algunos plaguicidas (Corbett *et al.* 1984).

Sitio de acción	Plaguicidas
Enzimas	Fungicidas que inhiben la biosíntesis del ergosterol, insecticidas carbamatos (cartap) y organofosforados (malatión, paratión)
Receptores naturales	clordimerform y sus análogos, furecoles y naptalam, ciclodienos (aldrin, clordano, dieldrin, nicotina)
Otros sitios	Insecticidas piretroides, organoclorados (DDT)

La disminución de la actividad colinesterasa total en la sangre, de la acetilcolinesterasa en eritrocitos y de la pseudocolinesterasa en plasma, son usados como indicadores de riesgo e indirectamente de la exposición total. Según Steenland (1996), la exposición prolongada a productos organofosforados conduce a síntomas relacionados con el sistema nervioso autónomo (calambre abdominal, náuseas, diarrea, salivación excesiva y miosis) y el sistema nervioso central (ansiedad, confusión, temblor, mareos); también pueden inducir neuropatías, miopatía y

psicosíndrome orgánico: esto debido a la inhibición de una enzima esterasa neuropática (Jaffery y Viswanathan 1986, Steenland 1996, Song *et al.* 1997).

La enzima acetilcolinesterasa controla la transmisión del impulso nervioso, así como la sinapsis colinérgica en el cerebro, el ganglio autónomo y las uniones mioneurales del músculo esquelético, por hidrolización del neurotransmisor acetilcolina. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa sirven como un sustrato alterno para la acetilcolinesterasa, lo que da como resultado la acumulación de acetilcolina en las uniones neuronales y de esta manera aparece el síndrome colinérgico. Los carbamatos forman un complejo con la acetilcolinesterasa menos estable que el complejo formado por los organofosforados y no pasan con facilidad la barrera sanguínea del cerebro; de manera que los envenenamientos con carbamatos son de más corta duración y menos severos que los envenenamientos con organofosforados (Wesseling 1997).

Gran cantidad de trabajadores están expuestos, de alguna u otra forma, a los efectos de los plaguicidas. Entre ellos se encuentran:

- Trabajadores de fábricas formuladoras.
- Personas que cargan y transportan plaguicidas.
- Personal de ventas de productos agroquímicos.
- Aplicadores (peones en grandes empresas, pequeños y medianos agricultores, pilotos de aviones aspersores, aplicadores sanitarios del Ministerio de Salud).
- Trabajadores de apoyo para los aplicadores (bodegueros, mezcladores, banderilleros, personal de limpieza y mantenimiento).
- Trabajadores de plantas empacadoras de productos agrícolas.
- Otros: mujeres que abren bolsas plásticas impregnadas con insecticidas en las compañías bananeras (Hilje *et al.* 1987) A nivel internacional, las mujeres constituyen una fuerza laboral agrícola, bastante variada, llegando en Japón a 60% de los trabajadores en fincas y ocupaciones relacionadas. De manera que están expuestas a químicos agrícolas y virus animales sinoidales (McDuffie 1994).

El uso de productos agroquímicos muy tóxicos ha sido la causa de numerosas intoxicaciones mortales o incapacitantes en todo el orbe y en especial en los países en desarrollo (Hilje *et al.* 1987). Los envenenamientos por plaguicidas, constituyen un gran problema de salud pública (Wesseling 1997) en los países pobres (McConnell y Hruska 1993). Algunas estimaciones sugieren que cada año ocurren alrededor de tres millones de envenenamientos graves y agudos por plaguicidas y más de 200 000 muertes (Hilje *et al.* 1987, McConell y Hruska 1993). Alrededor de 3% de la población que trabaja con plaguicidas sufre síntomas de envenamiento con organofosforados cada año (Steenland 1996).

La gran mayoría de los envenenamientos y más de 99% de las muertes ocurren en los países en desarrollo, sin tomar en cuenta que el tercer mundo consume apenas entre 20 y 25% de los plaguicidas a nivel mundial (McConnell y Hruska 1993, Kogevinas *et al.* 1994).

Los efectos de los plaguicidas sobre la salud humana pueden ser a corto o a largo plazo. Una única exposición a estos puede producir intoxicaciones sistémicas agudas, dermatitis de contacto, lesiones oculares por contacto y, en algunos casos, reacciones alérgicas generalizadas o de tipo anafiláctico. Si las exposiciones se repiten por períodos más o menos largos, pueden producir intoxicaciones sistémicas crónicas, dermatitis y problemas alérgicos de tipo crónico (Hilje *et al.* 1987, Wesseling 1997). Las reacciones de inmunotoxicidad directa pueden incrementar la susceptibilidad a las infecciones o aumentar la incidencia de algunos tipos de cánceres; tales como linfoma, sarcoma de Kaposi y cáncer de piel. Además se exacerban los procesos de hipersensibilidad, de autoinmunidad y de otras enfermedades, tales como, efectos neurológicos crónicos, neuropatías, nefropatías, hepatopatías, enfermedades cardiovasculares y oculares. Los efectos a largo plazo se relacionan con cáncer, malformaciones congénitas, esterilidad y abortos (Jaffery y Viswanathan 1986, Hilje *et al.* 1987, Saracci *et al.* 1991, Soto *et al.* 1994, McDuffie 1994, Brouwer *et al.* 1994, Boffetta

et al. 1994, Sherman 1995, 1996, León 1996, Steenlad 1996, Vial *et al.*, 1996, Dich *et al.* 1997).

También se sugiere que la exposición repetida a organofosforados puede tener efectos en el sistema reproductivo femenino (datos en animales) . La administración de altas dosis afecta la reproducción y la progenie de los animales (Jaffery y Viswanathan 1986, Soto *et al.* 1994). Estudios realizados en Japón relaciona algunos casos de muerte fetal y malformaciones con el envenenamiento agudo por el rocío de organofosforados en el campo (Jaffery y Viswanathan 1986). Por otra parte mujeres embarazadas que han estado expuestas al fungicida zineb, mostraron un riesgo aumentado de abortos y de complicaciones en el parto (Jaffery y Viswanathan 1986).

Los plaguicidas organoclorinados son fuertes inductores enzimáticos y por tanto pueden causar disturbios en el balance hormonal, de manera que a largo plazo el sistema nervioso central es el más afectado (Jaffery y Viswanathan 1986).

La exposición materna al clorpirifós durante el embarazo ha sido asociada a un síndrome de polimalformaciones en recién nacidos. Malformaciones similares en animales de laboratorio se han informado en la literatura publicada y no publicada de la EPA, lo que ha llegado a proponer el síndrome causado por la exposición a este plaguicida (Sherman, 1995, 1996).

La exposición ocupacional a clordecona resulta en una alta producción de estrógenos, la cual se manifiesta como oligospermia y esterilidad en hombres (Soto *et al.* 1994). Por otra parte la exposición laboral al DBCP produce azoospermia y esterilidad (Ramírez y Ramírez 1980). El DBCP esta clasificado por la IARC como un posible carcinógeno humano. Este compuesto causa cáncer en múltiples sitios en varios ensayos animales; pero la evidencia en estudios epidemiológicos es inadecuada y limitada a estudios pequeños; que sugieren un riesgo aumentado para cáncer respiratorio. Otros productos utilizados en las plantaciones de banano que tienen un potencial carcinogénico son el maneb, el mancozeb, el benomil, el clorotalonil y el formaldehído (Wesseling 1997).

En relación al cáncer, existen diversos estudios epidemiológicos con evidencia positiva (un exceso en la incidencia y mortalidad) entre el contacto ocupacional con plaguicidas y algunos tipos de cánceres; principalmente sarcoma del tejido blando, linfomas malignos (linfoma no-Hodgkin y enfermedad de Hodgking), mieloma múltiple, leucemia y cáncer de piel, próstata, testículos, pulmón y cerebro (Saracci *et al.* 1991, Soto *et al.* 1994, Browner *et al.* 1994, Vial *et al.* 1996, Dich *et al.* 1997, Wesseling 1997). También han sido ocasionalmente asociados con cánceres de mama, endometrio, hígado, riñón, vejiga, ovario, estómago y tiroides (Soto *et al.* 1994, Dich *et al.* 1997). Diversos estudios indican que las mujeres que trabajan en actividades agrícolas tienen un exceso de linfomas no-Hodgkins, leucemia, mieloma múltiple, sarcoma del tejido blando, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cervix y cáncer de las cavidades sinoidales (McDuffie 1994). Sin embargo, los resultados de otras investigaciones similares no han logrado establecer ninguna relación entre la exposición ocupacional a plaguicidas y el desarrollo del cáncer (Maroni y Fait 1993, Vial *et al.* 1996, Dich *et al.* 1997). En este sentido, la evidencia que indica que el uso de plaguicidas produce un aumento en el riesgo de cáncer, usualmente se considera inadecuada. Tanto con datos obtenidos en los laboratorios como los generados en poblaciones expuestas a estos agentes. Esto es válido, según la IARC para poblaciones expuestas a mezclas de plaguicidas. De manera que con excepción de los compuestos arsenicales, que están clasificados como carcinógenos para el hombre (clase 1); el fungicida captafol y los insecticidas en aerosol, que fueron clasificados como probables carcinógenos (clase 2A); el resto de los plaguicidas son predominantemente de clase 2B (posibles carcinógenos) o clase 3 (no clasificable) (Vainio *et al.* 1994, Wesseling 1997). Al respecto vale la pena aclarar que para la mayoría de los plaguicidas existen pocos estudios toxicológicos.

Uso de plaguicidas en Costa Rica

La población de Costa Rica y de los países en desarrollo de América Central, con una economía basada fuertemente en la exportación de productos agrícolas, tiene una exposición excesiva a plaguicidas. En 1989, se utilizaron seis kilogramos de ingrediente activo (i. a.) por hectárea de tierra cultivable, lo que equivale al doble de plaguicidas (Wesseling *et al.* 1993). Su uso continua extendiéndose, de forma que, en 1993, el consumo de plaguicidas per cápita fue de 2 kg de producto formulado (p. f.); para los trabajadores agrícolas esta cifra corresponde a 22 kg de p. f. y en los trabajadores de las compañías bananeras, esta cantidad asciende a 64 kg de p. f. (Wesseling 1997).

El banano es uno de los principales productos de exportación del país en el cual se consumen grandes cantidades de plaguicidas. Algunos de los plaguicidas empleados en su cultivo (ej. carbofurán, etoprofós, fenamifós, oxamil y terbufós) están clasificados como altamente peligrosos en otros países (ej. Estados Unidos) y su uso es restringido, mientras que en Costa Rica su aplicación se hace de manera no controlada (Vega y Maroto 1984, Wesseling 1992).

Costa Rica, al igual que la mayoría de los países en desarrollo tiene serios problemas para regular y vigilar el uso y la aplicación de plaguicidas, así como un sistema de vigilancia epidemiológico inadecuado.

El caso más relevante es la esterilidad de trabajadores bananeros de la zona de Río Frío debido al uso intensivo del nematicida 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP), durante la década del 70. Este químico produce disfunción testicular caracterizada por un decrecimiento en el conteo espermático, que en los casos más graves progresa a la azoospermia y esterilidad; además de un aumento en los niveles de la hormona folículo-estimulante y de la hormona luteinizante en suero (Maroni y Fait 1993).

Una investigación realizada por Ramírez y Ramírez (1980) con aplicadores de DBCP en las compañías bananeras demostró, con datos de laboratorio y epidemiológicos, una estrecha correlación ($r= 0,99$) entre las horas de aplicación y el

porcentaje de esterilidad; así como una relación inversa ($p= 0,05$) entre las horas de aplicación y el conteo espermático.

La información provenientes de tres registros nacionales (accidentes ocupacionales, informes de enfermedades, hospitalizaciones y muertes) indicó que durante 1986 ocurrieron 1800 accidentes ocupacionales por plaguicidas. Entre 1980 y 1986 se hospitalizaron por dicha causa 3330 personas y fallecieron 429. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa causaron 71% de estos accidentes, 63% de las hospitalizaciones y 36% de las muertes (Wesseling *et al.* 1993). Entre 1992 y 1994 el paraquat causó entre 19 y 26 % de las intoxicaciones por plaguicidas (Anónimo 1996).

Las hospitalizaciones y las muertes por envenenamientos con plaguicidas son de 13 a 11 veces más frecuentes en los trabajadores agrícolas que en el resto de la población costarricense. Entre los grupos de alto riesgo por envenenamientos ocupacionales están los trabajadores agrícolas cuyas edades oscilan entre los 15 y los 29 años, mujeres trabajadoras y trabajadores de las plantaciones bananeras (Wesseling *et al.* 1993). Los trabajadores envenenados con plaguicidas organofosforados tienen como secuela un marcado aumento en los síntomas neuropsiquiátricos (Wesseling 1997).

La asociación entre la exposición ocupacional y el riesgo aumentado de desarrollar cáncer fué investigada en plantaciones bananeras costarricenses por Wesseling *et al.* (1997). Los resultados muestran un incremento en la tasa de incidencia estandarizada para melanoma y cáncer de pene en hombres, y para cáncer de cervix y leucemia en las mujeres. Sin embargo, los mismos autores consideran que estos resultados representan una subvaloración de la realidad, debido a las deficiencias en las fuentes que sirvieron de base para la investigación. Estudios más recientes, indican que el uso de plaguicidas organofosforados y n-metil carbamatos producen efectos adversos en un amplio ámbito de funciones neurológicas, en los trabajadores envenenados por estos productos. Entre estas se incluye un

decrecimiento sustancial de la percepción vibrotáctil del dedo gordo del pie, así como una disminución en la intensidad del agarre y el pellizco (Wesseling 1997).

En Costa Rica el control del uso y manejo de plaguicidas no es lo suficientemente bueno. Existen pocos recursos para la investigación y hay pocos investigadores capacitados en la toxicología ambiental, la medicina laboral y la toxicología genética. Con los antecedentes que existen, es importante hacer estudios sobre el efecto que los plaguicidas pueden tener sobre el ADN humanos, ya que a largo plazo existe un riesgo mayor de padecer de cáncer o de que la progenie padezca de enfermedades congénitas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La exposición ocupacional prolongada a plaguicidas, a dosis que no producen signos de intoxicación aguda, ocasiona daños al ADN; los cuales pueden ser visualizados como un incremento en la frecuencia de micronúcleos de linfocitos, y como rupturas en hebras sencillas del ADN de los individuos expuestos.

OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO

Evaluar el efecto genotóxico de los plaguicidas utilizados en las empacadoras de banano en la población femenina que ahí labora; usando como marcadores biológicos el ensayo de micronúcleos de cultivo de linfocitos en células binucleadas y la electroforesis de células únicas en linfocitos aislados de sangre periférica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la posible utilidad del ensayo de micronúcleos de linfocitos como marcador de daño temprano al ADN producido por la exposición a plaguicidas.
2. Determinar la posible utilidad de las electroforesis de células únicas como marcadores de genotoxicidad producidos por la exposición a plaguicidas.
3. Observar y evaluar la frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos de los individuos en estudio para establecer si existe una correlación con la exposición a plaguicidas.
4. Determinar el efecto de los plaguicidas en la hebra sencilla del ADN en células únicas de los mismos individuos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

La muestra consta de mujeres voluntarias, con edades entre los 16 y 57 años, procedentes del cantón de Pococí (Limón, Costa Rica). Todas las personas que participaron en el estudio firmaron una hoja de consentimiento informado y respondieron un cuestionario estandarizado, probado en el campo y ajustado para nuestra población que toma en cuenta las recomendaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud (Carrano y Natarajan 1988, Anónimo 1985) (ver apéndice 1).

El grupo expuesto corresponde a las mujeres que laboran en la planta empacadora de banano y que tienen un tiempo mínimo de trabajo de 4 meses consecutivos en compañías bananeras del lugar, quienes están en contacto principalmente con fungicidas, durante el proceso de selección, atomización y sellado de la fruta antes de colocarlas en las cajas para su exportación (Fig. 1). Las testigos corresponden a un grupo de mujeres voluntarias de la misma región, sin exposición ocupacional a plaguicidas, lo más similar posible a las expuestas, en variables como: edad, fumado, dieta, infecciones virales, vacunación, alcohol, ingesta de drogas, exposición a rayos X (Anónimo 1985, Carrano y Natarajan 1988, Sorsa *et al.* 1992, Fenech 1993a, Bolognesi *et al.* 1997).

La investigación puede enmarcarse dentro del diseño de un estudio caso : testigo (del inglés case : control).

Las mujeres expuestas a plaguicidas participantes en el estudio fueron captadas por visitas directas a diferentes fincas bananeras del cantón de Pococí. Para obtener el acceso a las fincas y poder trabajar con las mujeres, se contó con el apoyo del Departamento de Sustancias Tóxicas y Medicina del Trabajo del Ministerio de Salud.

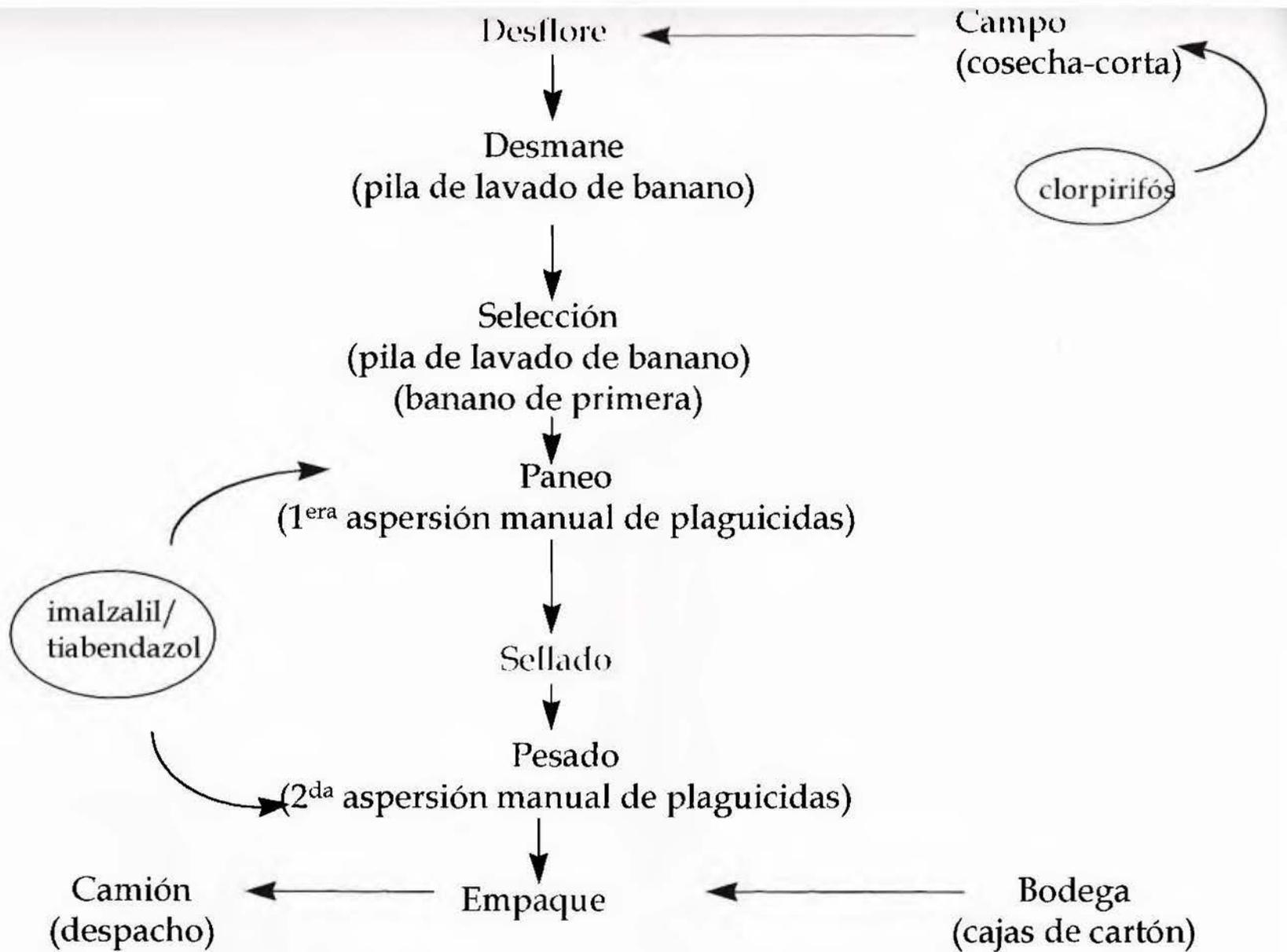


Fig. 1: Esquema de la planta empacadora de una finca bananera
Tomado con modificaciones de: Vaquerano, 1995.

Con el fin de conseguir mujeres testigos, se realizaron varias visitas al Hospital de Guápiles y al Centro de Salud de la localidad. Estas consistieron principalmente en mujeres oficinistas, personal de nutrición, de archivos, etc. del hospital y madres que llevaron a sus hijos a control del niño sano en el Centro de Salud. Una vez obtenida la colaboración de las personas participantes en el estudio, se llenó el mismo cuestionario por medio de una entrevista que se pasó a las mujeres expuestas y se les tomó la muestra de sangre.

Los datos obtenidos mediante la encuesta, están almacenados en un banco diseñado con el programa FOXPRO. La información es manejada con estricta confidencialidad y no será asociada con nombres de personas o de fincas en ningún documento público.

Se hizo un listado de los plaguicidas utilizados en las 15 fincas bananeras estudiadas (ver cuadro 2). Para lo cual se recurrió a los registros del Departamento de Sustancias Tóxicas y Medicina del Trabajo, del Ministerio de Salud, esto con el fin de conocer exactamente a que sustancias están expuestas las mujeres.

Recolección de muestras

Se colectó una muestra de sangre de 10 ml por persona, en tubos Vacutainer estériles con heparina de sodio. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su transporte al laboratorio de citogenética ubicado en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), de la Universidad de Costa Rica (UCR). Una vez ahí se dividió la sangre, para realizar, por un lado, los cultivos de sangre periférica durante las 24 horas siguientes. Por otra parte, la sangre que no se cultivó fue tratada con Histopaque 1077, para aislar linfocitos (ver apéndice II). Estos fueron criogenizados (congelados en nitrógeno líquido), hasta su posterior utilización en el ensayo cometa. El medio de cultivo, el suero y los reactivos son de un mismo lote, como lo recomienda la OMS (Anónimo 1985).

Cuadro 2: Plaguicidas utilizados en las fincas visitadas.

Tipo de plaguicida	Nombre genérico
Insecticidas impregnados en la bolsa	clorpirifós
Fungicidas aplicados a la fruta	alumbre, imazalil y/o tiabendazol
Nematicidas	cadusafós, carbofurán, terbufós, oxamil
Herbicidas	glisofato, paraquat, ametrina, diurón
Insecticidas	<i>Bacillus thuringiensis</i> , diazinon
Control del moko	formalina, bromuro de metilo
Control de la sigatoka	mancozeb, benomil, tridemorph, maneb, clorotalonil, propiconazol

Fuente: Departamento de Sustancias Tóxicas y Medicina del Trabajo, Ministerio de Salud

Marcaadores de genotoxicidad.

Se evaluó la frecuencia de micronúcleos presentes en linfocitos utilizando la técnica de células binucleadas, así como el daño de hebra sencilla al ADN en linfocitos aislados de sangre periférica.

La técnica de micronúcleos en linfocitos es fácil de aplicar (Marzin 1997) porque no presenta mayores dificultades ni consume mucho tiempo.

Los micronúcleos se forman por la condensación de fragmentos cromosómicos acéntricos o por cromosomas enteros que tienen un movimiento retardado durante la anafase. Estos son excluidos postmitóticamente de las células hijas y forman pequeños núcleos o micronúcleos (Sorsa 1984, Carrano y Natarajan 1988, Sorsa *et al.* 1992, Da Cruz *et al.* 1994, Surrallés *et al.* 1995, Tucker y Preston 1996). Esta técnica permite el tamizaje de aberraciones cromosómicas en metafases de una población, detecta agentes clastógenos o sea que producen rupturas cromosómicas y agentes aneuploidógenos que afectan el funcionamiento del huso (Sorsa y Yager 1987, Carrano y Natarajan 1988, Eastmond y Tucker 1989, Sorsa *et al.* 1992, Fenech 1993a y 1993b, Tucker y Preston 1996).

En poblaciones expuestas a radiaciones ionizantes, fumadores, en trabajadores expuestos a plaguicidas, a estireno, óxido de etileno, trabajadores de las gasolineras, se han realizado estudios sobre el aumento en la frecuencia de micronúcleos. También se han usado para evaluar efecto de mutágenos ambientales (Heddle *et al.* 1978, Mavournin *et al.* 1990, Au *et al.* 1991, Wuttke *et al.* 1993, Bolognesi *et al.* 1993, Ribeiro *et al.* 1994, Da Cruz *et al.* 1994, Carere *et al.* 1995, Anwar y Shamy 1995, Sutou 1996, Scarpatto *et al.* 1996a, Scarpatto *et al.* 1996b, Titenko-Holland *et al.* 1997).

El conocimiento en el campo de la vigilancia genética humana es muy limitado. Hasta hace diez años solo siete agentes ocupacionales (alquilantes citostáticos, benceno, estireno, epíclorohidrina, óxido de etileno, radiaciones ionizantes y cloruro de vinilo) han sido confirmados como causa de **daño cromosómico en humanos**. Sin

embargo, día a día se genera nueva información al respecto. Para establecer que la exposición ocupacional a un agente conlleva un daño cromosómico es necesario el uso de diferentes parámetros genéticos para analizar el mismo grupo de exposición. Una vez que se establezca dicha relación se deben tomar medidas para minimizar la exposición. Para lo cual se hace indispensable contar con personal capacitado en monitoreo genético (Sorsa 1984).

El ensayo de electroforesis de células únicas es rápido, simple, visual y sensible que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN de virtualmente todas las células eucariotas. También detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación. Requiere de células solas en suspensión lo que constituye una limitante, pues existen tejidos que son difíciles de disgregar (Tice *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994, Hartmann *et al.* 1995a, Klaude *et al.* 1996, Collins *et al.* 1997a, Collins *et al.* 1997b, Hellman *et al.* 1997). Las muestras que se necesitan son pequeñas (de 1 a 10 000 células) y los resultados se obtienen en un día (Vijayalaxmi *et al.* 1992, McKelvey-Martin *et al.* 1993). Por esto es un método que tiene una gran aplicación para el tamizaje de poblaciones grandes. Es una metodología reciente, que aún está a prueba, sin embargo, por las ventajas citadas se puede decir que tiene un gran futuro (Ross *et al.* 1995, Collins *et al.* 1997a).

Este ensayo ha sido utilizado para evaluar el daño en el ADN en poblaciones expuestas a radiaciones ionizantes, fumadores, quimioterapia, ozono, así como en trabajadores expuestos a arsénico. Además se ha utilizado en individuos con cáncer. También se ha usado para evaluar el efecto de mutágenos ambientales. Tiene una aplicación para evaluar reparación por escisión y apoptosis (Tice *et al.* 1990, Vijalaxmi *et al.* 1992, Tice *et al.* 1992, Green *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994, Valverde 1994, Tice 1995, Sardas *et al.* 1995, Collins *et al.* 1997b).

El ensayo de electroforesis de células únicas, bajo condiciones alcalinas (pH >13) es capaz de detectar rupturas de hebra sencilla, y lesiones álcali-lábiles en el ADN de células únicas, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica para detectar el

daño inducido en el ADN. Puesto que casi todos los agentes genotóxicos inducen una mayor cantidad de rupturas de hebra sencilla y lesiones álcali-labiles que de rupturas de doble hebra.

Es una técnica para el monitoreo de exposición a clastógenos, mutágenos y otras sustancias que inducen daño al ADN (Sardas *et al.* 1995, Speit *et al.* 1996). Las células muestran un incremento en la migración del ADN del núcleo la que es proporcional al daño en la molécula (Tice *et al.* 1992, Vijayalaxmi *et al.* 1992, Sardas *et al.* 1995, Speit *et al.* 1996, Hellman *et al.* 1997). Sin embargo, el daño absoluto en el ADN es modulado por componentes genéticos intrínsecos (ej. competencia metabólica y capacidad de reparación del ADN) y por factores ambientales extrínsecos (ej. dieta, hábitos personales) (Tice *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994).

La naturaleza no específica del ensayo, en combinación con una estabilidad relativa obtenida bajo condiciones estandarizadas, la hacen atractiva para propósitos de biomonitoreo de poblaciones humanas (Collins *et al.* 1997b, Hellman *et al.* 1997).

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Ensayo de micronúcleos

De cada muestra se realizó un cultivo según la técnica para micronúcleos, descrita en el apéndice II. El análisis al microscopio se realizó contando los micronúcleos (Fig. 2) localizados en 800 células binucleadas, con citoplasma relativamente intacto (Schmid 1975, Fenech y Morley 1985a, 1985b, Fenech 1993a) (apéndice II).

Ensayo de electroforesis de células únicas.

Para determinar la posible utilidad del ensayo cometa (Fig. 3) como marcador de genotoxicidad, se constituyó un grupo de 58 mujeres (30 expuestas a plaguicidas y 28 testigos), a las que se les midió la migración de la hebra sencilla del ADN.

La preparación de las muestras se realizó mediante la técnica utilizada por Singh *et al.* 1988, Valverde 1994 con modificaciones (apéndice II).

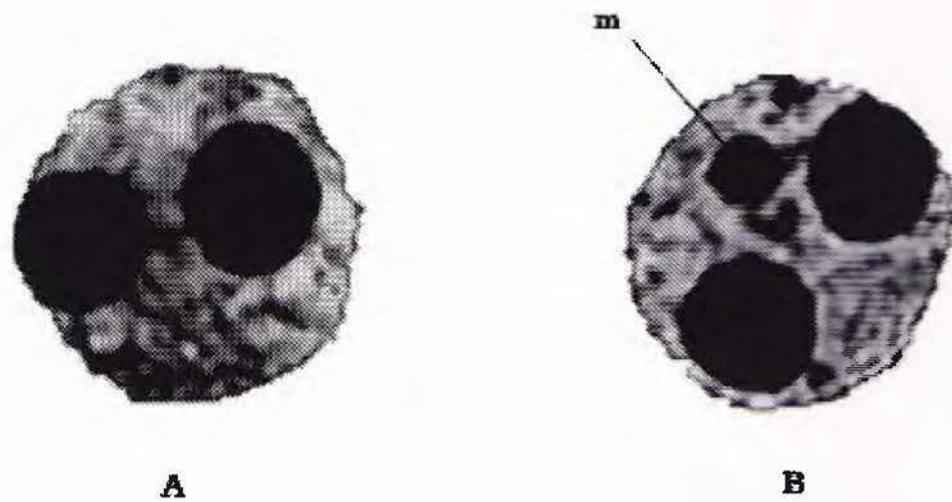


Fig. 2: Linfocitos de sangre periférica; bloqueados con citocalasina B.
A. Célula binucleada normal; B. Célula binucleada con
micronúcleo (Células aumentadas aproximadamente 600 veces).

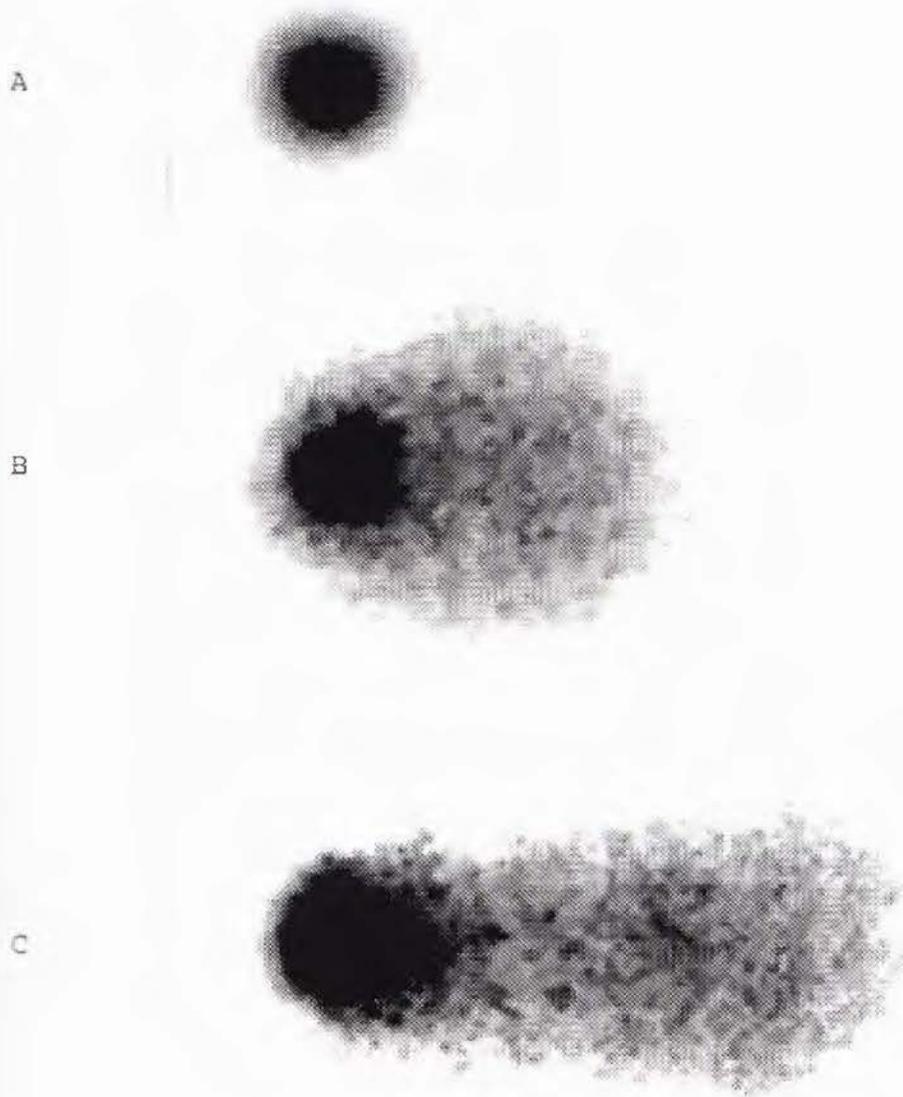


Fig. 3: Electroforesis de células únicas. A. Célula sin daño en la hebra sencilla del ADN. B y C. Células con el ADN dañado. La migración de la hebra sencilla es proporcional al daño nuclear (Células aumentadas aproximadamente 600 veces).

La observación de las preparaciones teñidas con el fluorocromo bis-benzidina (Hoechst 33258) se hizo con un microscopio de epifluorescencia (Leitz DIAPLAN) equipado con un filtro de excitación de 340-380 nm, una bombilla de 100 W y un filtro de barrera de 430 nm.

De cada muestra se tomaron fotografías al azar de 25 células, usando una cámara (WILD MPS46/52) acoplada al microscopio. La toma fue hecha con el objetivo de 25X, usando película Ilford de 35 mm, ASA 400, en blanco y negro. Posteriormente se midió la migración del ADN por medio de una tabla digitalizada Summa Sketch y el programa de cómputo Sigma Scan. Para cada individuo se calculó el promedio de migración de las 25 células medidas (McKelvey-Martin *et al.* 1993).

Las células extremadamente dañadas (con apariencia de nube, o con más del 95% del ADN en la cola), se excluyeron de la evaluación, debido a que representan células muertas (Hartmann y Speit 1997).

Para todos los análisis se rotularon las preparaciones con un código para realizar el tamizaje y las determinaciones a doble ciego, de manera que al hacer los análisis de laboratorio, se ignoraba si pertenecían a material proveniente de una mujer expuesta o de una testigo.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa estadístico SPSS (Norusis 1990a y 1990b).

Con el fin de comparar el grupo de mujeres expuestas con el de las testigos, en relación al comportamiento de cada una de las variables de la encuesta, se hizo un análisis de varianza univariado.

Para comparar la frecuencia de micronúcleos de linfocitos encontrados en ambos grupos, se realizó la prueba Mann Whitney-Wilcoxon. Además para conocer

cuales de las variables estudiadas en la encuesta (variables independientes) influyen la frecuencia de micronúcleos (variable dependiente) , se recurrió a una regresión logística con el total de células analizadas. En la regresión logística se estudian los siguientes parámetros: el coeficiente de regresión β y se estima el riesgo relativo ("odds ratio") con base a la siguiente ecuación: $e^{\beta x}$ (βx corresponde al coeficiente de regresión de cada una de las variables dependientes). La hipótesis nula se pone a prueba con la estadística de Wald y la significancia establecida es una $p < 0,05$.

El daño en la hebra sencilla del ADN, se comparó aplicando una t de Student . Para evaluar la asociación entre las rupturas en la hebra sencilla del ADN (variable dependiente) y las otras variables en estudio (variables independientes), se hizo una regresión lineal múltiple. Además para comprobar que la muestra presenta una distribución normal se hizo el análisis de residuos.

La exposición y la edad fueron recodificadas para facilitar el manejo de los datos en las pruebas de estadística multivariada (regresión logística y regresión lineal múltiple) y tener un patrón fijo de comparación. De esta forma :

Edad 1: mujeres con más de 35 años

Edad 2: mujeres entre 25 y 35 años.

Edad de referencia: mujeres menores de 25 años.

Para el análisis de la totalidad de los datos:

Expuesto 1: mujeres con más de 120 meses de exposición

Expuesto 2: mujeres con 1 a 120 meses de exposición

Exposición de referencia: mujeres sin exposición a plaguicidas.

En el análisis de regresión lineal múltiple, se estimó el coeficiente de determinación (R^2). Para comprobar la linealidad del modelo, se realiza una prueba estadística F (ANDEVA) con una significancia de $p < 0,05$. Adicionalmente para conocer el tipo de relación lineal (directa o inversa), se analiza cada variable con una t-student, con una $p < 0,05$.

El análisis de los datos se hizo apareando por edad a las mujeres expuestas con las testigos; de manera que la diferencia de edad fue de +/- dos años.

Para cada grupo se hizo un análisis de regresión múltiple, con las variables que más mostraban su influencia de manera individual y con aquellas que no mostraban estar influenciadas por otras variables. Pero, en caso de existir colinearidad entre dos variables, sólo se incluyó una dentro de la ecuación, a criterio del investigador.

III. RESULTADOS

Las mujeres que trabajan en la empacadora están principalmente expuestas a los fungicidas postcosecha tiabendazol (168-211 ml/200 gal de agua) e imazalil (316 ml/100 gal de agua); y al insecticida organofosforado clorpirifós (0,5 a 2%) que se encuentra impregnado en las bolsas con las que se cubre el banano en el campo. El contacto con estos fungicidas se hace en la planta empacadora, durante el proceso de selección, atomización y sellado de la fruta, antes de colocarlas en las cajas para su exportación. La exposición al clorpirifós ocurre semanalmente durante el período en el que no hay corta, durante el cual abren bolsas, hacen limpieza de las fajas y realizan otras labores de campo, por lo que no se descarta la posibilidad de que estén en contacto indirecto con otros plaguicidas utilizados en la producción de banano.

Se expone en el cuadro 3 la estadística descriptiva de la población en estudio y en el cuadro 4 una comparación entre el grupo de trabajadoras expuestas a plaguicidas y el grupo de mujeres testigos; para algunas variables que pueden interferir con la interpretación de los datos en este tipo de estudio. No hay diferencias estadísticamente significativas para algunas variables como: edad, fumado, enfermedades infecciosas, radiografías dentales, rayos X y otras. Sin embargo, para la variable dermatitis, hay una diferencia significativa, siendo el grupo de las mujeres expuestas a plaguicidas, quienes presentan una mayor frecuencia de dermatitis (12 expuestas versus 4 testigos). Este fenómeno puede ser un indicador de enfermedad causada por la exposición a plaguicidas.

En relación a otras variables en la que difieren ambas poblaciones, se encontró que el uso de anticonceptivos orales (10 versus 2) es mayor en las mujeres expuestas. También en estas es más frecuente la presencia de dermatitis (11 versus 3), de otras enfermedades (3 versus 1) y de fiebre en el último año (13 versus 5).

Se evaluó la frecuencia de micronúcleos; y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las expuestas y las testigos (cuadro 5). Luego se

Cuadro 3: Comparación (en porcentaje) de algunas variables en estudio.

Mediante el ensayo de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos. En una muestra de mujeres expuestas y no expuestas a plaguicidas (N=69).

Variable	Expuestas n=32 (%)		No expuestas n=37 (%)	
	Sí	No	Sí	No
Alergias	17 (53,1)	15 (46,9)	13 (40,6)	24 (59,4)
Automedicación	21 (65,6)	11 (34,4)	22 (59,5)	15 (40,5)
Café	29 (90,6)	3 (9,4)	30 (81,1)	7 (18,9)
Cáncer	0 (0,00)	32 (100,0)	0 (0,0)	37 (100,0)
Cerveza	12 (37,5)	20 (62,5)	12 (32,4)	25 (67,6)
Dermatitis	12 (37,5)	20 (62,5)	4 (10,8)	33 (89,2)
Diabetes	0 (0,0)	32 (100,0)	0 (0,0)	37 (100,0)
Enfermedades cardiovasculares	8 (25,0)	24 (75,0)	4 (10,8)	33 (89,2)
Enfermedades virales/bacterianas	16 (50,0)	16 (50,0)	19 (51,4)	18 (48,6)
Familiares con malformaciones genéticas	10 (31,3)	22 (68,7)	11 (29,7)	26 (70,3)
Fiebre	14 (43,8)	18 (56,2)	8 (21,6)	29 (78,4)
Fuma	2 (6,3)	30 (93,7)	5 (13,5)	32 (86,5)
Gestagenos	11 (34,4)	21 (65,6)	6 (16,2)	31 (83,8)
Hepatitis	2 (6,3)	30 (93,7)	2 (5,4)	35 (94,6)
Herpes simplex	7 (21,9)	25 (78,1)	3 (8,1)	34 (91,9)
Hijos con malformaciones	6 (18,8)	26 (81,2)	3 (8,1)	34 (91,9)
Medicamentos con receta	19 (59,4)	13 (40,6)	15 (40,5)	22 (59,5)
Meningitis	1 (3,1)	31 (96,9)	0 (0,0)	37 (100,0)
Mononucleosis	0 (0,0)	32 (100,0)	0 (0,0)	37 (100,0)
Mortinatos/abortos	6 (18,8)	26 (81,2)	9 (24,3)	28 (75,7)
Operación el año pasado	2 (6,3)	30 (93,7)	1 (2,7)	36 (97,3)
Otras enfermedades	14 (43,8)	18 (56,2)	9 (24,3)	28 (75,7)
Otro licor	5 (15,6)	27 (84,4)	4 (10,8)	33 (89,2)
Problemas para concebir	7 (21,9)	25 (78,1)	4 (10,8)	33 (89,2)
Radiografía dental	4 (12,5)	28 (87,5)	11 (29,7)	26 (70,3)
Rayos X	21 (65,6)	11 (34,4)	16 (43,2)	21 (56,8)
Sida	0 (0,0)	32 (100,0)	0 (0,0)	37 (100,0)

Porcentaje entre paréntesis.

Cuadro 4: Comparación de las variables investigadas entre las mujeres expuestas y las mujeres no expuestas (N =68, 32 expuestas a plaguicidas y 36 no expuestas a plaguicidas).

Variable	Valor de F	Significancia
Alergias	0,7960	N.S. (a)
Antecedentes de : cáncer	0,0000	N.S.
Anticonceptivos orales	2,8696	N.S.
Consumo de café	1,1950	N.S.
Consumo de cerveza	1,1964	N.S.
Dermatitis	7,0429	p=0,01
Diabetes	0,0000	N.S.
Edad	0,4078	N.S.
Enfermedad cardiovascular	2,2572	N.S.
Familiares con malformaciones	0,0037	N.S.
Fiebre en el último año	3,6758	N.S.
Fumado	1,0557	N.S.
Hepatitis	0,0143	N.S.
Herpes	2,4947	N.S.
Hijos con malformaciones	1,7668	N.S.
Hijos muertos o abortos espontáneos	0,3101	N.S.
Infecciones (bacterianas y/o virales)	0,5080	N.S.
Medicamentos con receta médica	2,1290	N.S.
Medicamentos sin receta médica	0,1444	N.S.
Meningitis	1,1271	N.S.
Mononucleosis	0,0000	N.S.
Operación en el último año	0,4735	N.S.
Otras enfermedades	2,6878	N.S.
Otros licores	0,0132	N.S.
Problemas para concebir o esterilidad	1,7526	N.S.
Radiografía dental	3,2724	N.S.
Rayos X en la última década	3,1141	N.S.
Sida	0,0000	N.S.

(a) N.S. = no significativo

Cuadro 5: Comparación de la frecuencia de las variables estudiadas para micronúcleos de linfocitos entre expuestas y no expuestas, según categorías de exposición.

	Grupo total		Grupo apareado		1-60 meses		61-120 meses		121-180 meses		mas de 181 meses	
	n = 68		n = 56		n = 20		n = 6		n = 18		n = 12	
	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.
Edad promedio	35,7	32,8	34,2	34,1	31,7	31,2	29,3	29,6	35,8	36,2	38,3	38,0
Exposición promedio (meses)	118,9	—	125,6	-	35,4	-	104,0	-	162,0	-	232,0	-
Micronúcleos de alta certeza	0,32	0,28	2,9	2,5	2,8	1,8	4,3	4,0	3,3	3,2	1,8	1,8
Micronúcleos de media certeza	0,17	0,22	2,3	2,4	2,0	2,2	2,0	1,7	2,2	1,8	2,8	3,8
Micronúcleos de totales	0,48	0,21	5,2	4,9	4,8	4,0	6,3	5,7	5,5	5,0	4,6	5,6
<i>Broken-Eggs</i>	0,91	0,51	10,7	9,2	11,1	9,9	19,7	12,0	7,0	10,0	11,6	4,2
Promedio de células analizadas	890	925	878	914	878,7	875,0	909	886	897,6	891,2	832	1029

La prueba U de Mann-Whitney no encontró diferencias significativas entre expuestas y no expuestas en ninguna categoría de exposición.

e. = expuestas; n.e. = no expuestas.

separaron las mujeres por categorías de exposición: de 1 a 60 meses, de 61 a 120 meses, de 121 a 180 meses y más de 180 meses. Se caracterizó la población para cada una de las variables de manera que el primer grupo (1-60 meses), presenta diferencias estadísticamente significativas en relación a las siguientes variables: uso de anticonceptivos orales, dermatitis, y fiebre en el último año.

Para determinar la utilidad del ensayo de micronúcleos en linfocitos como marcador de daño temprano al ADN, se evaluó la frecuencia de micronúcleos en ambos grupos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. El siguiente grupo no presentó diferencias estadísticamente significativas, tampoco se encontró una diferencia en la frecuencia de micronúcleos. Lo mismo ocurrió con el grupo de mayor exposición. En el grupo de 121 a 180 meses, existe una diferencia significativa en relación a la exposición a rayos X, sin embargo, no hay diferencias en la frecuencia de micronúcleos.

Las variables que influyen en la aparición de micronúcleos para las poblaciones en estudio (cuadro 6, ecuación 1) son la exposición a radiografías dentales y la exposición a rayos X en la última década ($p < 0,05$). Esto indica que las mujeres que han estado expuestas a radiografías dentales tienen un riesgo relativo de 1,7 en comparación con las que nunca han estado expuestas a radiografías dentales. Lo anterior significa que por cada 100 mujeres que tienen micronúcleos y que no se han hecho radiografías dentales, hay 170 mujeres que tienen micronúcleos y que si se han hecho radiografías dentales. En relación con las mujeres expuestas a rayos X estas tienen un riesgo relativo de 1,3. Ahora bien cuando se incluye dentro de la ecuación la exposición y la edad (cuadro 6, ecuación 2) los valores se mantienen casi idénticos.

Cuando se analizan estas mismas variables por separado expuestas a plaguicidas versus testigos (ver cuadro 7) los resultados varían un poco. Las mujeres expuestas a plaguicidas que han tenido hijos nacidos muertos o abortos espontáneos tienen 1,45 veces más probabilidades de tener micronúcleos que las mujeres que han estado expuestas a plaguicidas y que no tienen hijos nacidos muertos o abortos

Cuadro 6 : Comparación de las variables investigadas entre las mujeres expuestas y las mujeres no expuestas por medio de un análisis de regresión logística (N = 28 470 células expuestas y 33 361 células no expuestas).

Variable	Ecuación 1			Ecuación 2		
	β (a)	Sig ^(b)	RR ^(c)	β (a)	Sig ^(b)	RR ^(c)
Hijos muertos o abortos espontáneos	0,1291	0,3721	-	0,1355	0,3152	-
Radiografía dental	0,5356	0,0000 ^(*)	1,7	0,5731	0,0000 ^(*)	1,77
Rayos X	0,2691	0,0219 ^(*)	1,3	0,2493	0,0435 ^(*)	1,28
Exposición 1				0,1143	0,4500	-
Exposición 2				0,1863	0,2137	-
Edad 1				-0,0833	0,7438	-
Edad 2				-0,2039	0,4138	-

(a) Coeficiente de regresión.

(b) Significancia (estadística de Wald).

(c) Riesgo relativo (odds ratio $\sim e^{\beta x}$).

(*) Estadísticamente significativo, $p < 0,05$.

Cuadro 7: Análisis de regresión logística por grupo (N =28 470 células expuestas y 33 361 células no expuestas).

Variable	Células expuestas (n=28470)			Células no expuestas (n=33361)		
	β (a)	Sig ^(b)	RR ^(c)	β (a)	Sig ^(b)	RR ^(c)
Hijos muertos o abortos espontáneos	0,3733	0,0586 ^(*)	1,45	0,0231	0,9012	-
Radiografía dental	0,6581	0,0033 ^(*)	1,9	0,3326	0,0558 ^(*)	1,39
Rayos X	0,1012	0,5593	-	0,3596	0,0350 ^(*)	1,43
Edad 1	-0,3232	0,3108	-	0,9627	0,1113	-
Edad 2	-0,5142	0,0705	-	0,7894	0,1825	-

a) Coeficiente de regresión.

b) Significancia (estadística de Wald).

c) Riesgo relativo (odds ratio $\sim e^{\beta x}$).

(*) Estadísticamente significativo, $p < 0,05$.

espontáneos. No existe este riesgo en la mujeres con hijos nacidos muertos o abortos espontáneos que no están en contacto con plaguicidas. Tanto en las mujeres expuestas a estos como en las testigos, la exposición a radiografías dentales tiene un efecto en la frecuencia de micronúcleos ; sin embargo este riesgo es un poco mayor en las trabajadoras del empaque de banano. En relación a los rayos X, solo las mujeres testigos tienen un mayor riesgo relativo de tener micronúcleos.

En el cuadro 8 se muestra la estadística descriptiva de la población estudiada mientras que en el cuadro 9 se observa la caracterización de las variables estudiadas. Estas últimas presentan diferencias estadísticamente significativas sólo para las radiografías dentales (8 testigos y 1 expuesta). Cuando se comparó el tamaño de la cola del ADN no se encontró ninguna diferencia significativa (cuadro 10). Cuando se aparearon las mujeres por edad, con una diferencia de +/- 2 años, aparecieron diferencias estadísticamente significativas solo para las radiografías dentales ; con 7 mujeres testigos a plaguicidas con radiografías dentales y una mujer expuesta a plaguicidas y a radiografías dentales. Tampoco en este caso, se presentaron diferencias significativas en la migración del ADN.

Posteriormente se dividió el grupo por categorías de exposición, en: 1-60 meses, de 61 a 120 meses, de 121 a 180 meses y más de 181 meses. A cada grupo se le hizo un análisis de varianza univariado, para determinar las características de cada uno. En el primer grupo de exposición, ambos grupos difieren en las radiografías dentales (6 testigos y 1 expuesta) y en la exposición a rayos X en la última década (11 testigos y 4 expuestas). El siguiente grupo difiere en relación a las alergias (3 expuestas versus 0 testigos). Los otros dos grupos, no difieren en ninguna de las variables estudiadas.

En el cuadro 10, se presentan los promedios de la migración del ADN por categoría de exposición. Si se observan los valores de la migración promedio del ADN, analizando cada grupo por separado a través del tiempo, se verá que existe una pequeña tendencia a aumentar el largo de la cola (a partir de los 5 años de exposición)

Cuadro 8: Comparación (en porcentaje) de algunas variables en estudio.
Mediante la electroforesis de células únicas (ensayo cometa). En una muestra de mujeres expuestas y no expuestas a plaguicidas (N=58).

Variable	Expuestas n=30 (%)		No expuestas n=28 (%)	
	Sí	No	Sí	No
Alergias	11 (36,7)	19 (63,3)	12 (42,9)	16 (57,1)
Automedicación	22 (73,3)	8 (26,7)	17 (60,7)	11 (39,3)
Café	27 (90,0)	3 (10,0)	21 (75,0)	7 (25,0)
Cáncer	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Cerveza	10 (33,3)	20 (66,7)	7 (25,0)	21 (75,0)
Dermatitis	7 (23,3)	23 (76,7)	4 (14,3)	24 (85,7)
Diabetes	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Enfermedades cardiovasculares	10 (33,3)	20 (66,7)	6 (21,4)	22 (78,6)
Enfermedades virales/bacterianas	13 (43,3)	17 (56,7)	14 (50,0)	14 (50,0)
Familiares con malformaciones genéticas	8 (26,7)	22 (73,3)	10 (35,7)	18 (64,3)
Fiebre	15 (50,0)	15 (50,0)	9 (32,1)	19 (67,9)
Fuma	6 (20,0)	24 (80,0)	4 (14,3)	24 (85,7)
Gestagenos	9 (30,0)	21 (70,0)	5 (17,9)	23 (82,1)
Hepatitis	1 (3,3)	29 (96,7)	1 (3,6)	27 (96,4)
Herpes simplex	5 (16,7)	25 (83,3)	2 (7,1)	26 (92,9)
Hijos con malformaciones	4 (13,3)	26 (86,7)	2 (7,1)	26 (92,9)
Medicamentos con receta	12 (40,0)	18 (60,0)	12 (42,9)	16 (57,1)
Meningitis	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Mononucleosis	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Mortinatos/ abortos	6 (20,0)	24 (80,0)	9 (32,1)	19 (67,9)
Operación el año pasado	3 (10,0)	27 (90,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Otras enfermedades	11 (36,7)	19 (63,3)	8 (28,6)	20 (71,4)
Otro licor	3 (10,0)	27 (90,0)	5 (17,9)	23 (82,1)
Problemas para concebir	5 (16,7)	25 (83,3)	5 (17,9)	23 (82,1)
Radiografía dental	1 (3,3)	29 (96,7)	8 (28,6)	20 (71,4)
Rayos X	14 (46,7)	16 (53,3)	14 (50,0)	14 (50,0)
Sida	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	28 (100,0)

Porcentaje entre paréntesis.

Cuadro 9: Comparación de las variables en estudio (N = 58, 30 mujeres expuestas y 28 mujeres no expuestas), mediante el ensayo cometa.

Variable	Valor de F	Significancia
Alergias	0,2248	N.S. (a)
Antecedentes de cáncer	0,0000	N.S.
Anticonceptivos orales	1,1491	N.S.
Consumo de café	0,4933	N.S.
Consumo de cerveza	0,4704	N.S.
Dermatitis	0,7548	N.S.
Diabetes	0,0000	N.S.
Edad	0,3218	N.S.
Enfermedad cardiovascular	1,0100	N.S.
Familiares con malformaciones	0,5400	N.S.
Fiebre en el último año	1,9006	N.S.
Fumado	0,2668	N.S.
Hepatitis	0,0024	N.S.
Herpes	0,2762	N.S.
Hijos con malformaciones	1,4728	N.S.
Hijos muertos o abortos espontáneos	0,2140	N.S.
Infecciones (bacterianas y/o virales)	0,2509	N.S.
Medicamentos con receta medica	0,0471	N.S.
Medicamentos sin receta medica	1,0295	N.S.
Meningitis	0,0000	N.S.
Mononucleosis	0,0000	N.S.
Operación en el último año	3,0030	N.S.
Otras enfermedades	0,4191	N.S.
Otros licores	0,0955	N.S.
Problemas para concebir o esterilidad	0,7924	N.S.
Radiografía dental	7,7324	p<0.01
Rayos X en la última década	0,0623	N.S.
Sida	0,0000	N.S.

(a) N.S. = no significativo

Cuadro 10: Promedio de las distancias de migración del ADN en micras (largo de la cola del cometa) según categorías por tiempo de exposición en meses.

	Grupo total		1-60		61-120		121-180		mas de 181	
	n = 58		n = 30		n = 8		n = 6		n = 6	
	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.
Edad promedio	32,0	33,9	30,8	31,4	34,7	34,7	33,7	33,3	38,7	39,7
Exposición promedio (meses)	77,4	---	24,3	---	96,0	---	146,0	---	260,7	---
Promedio del largo de la cola	57,1	54,1	52,1	56,5	65,5	45,0	58,7	38,7	63,3	59,0
Desviación estándar	77,7	24,2	130,1	22,7	22,5	26,5	28,0	20,7	23,3	31,7

conforme aumenta el tiempo trabajado en las compañías bananeras. Como se comprueba en el cuadro 11; si hay una relación lineal entre el tiempo de exposición a plaguicidas y el daño al ADN. También se puede observar que existe influencia de otras variables como el fumado, enfermedades cardiovasculares, uso de anticonceptivos orales y alergias (cuadro 12). En el caso de las testigos, la migración del ADN tiene una relación lineal con diversos factores, como la edad, las alergias y el fumado (cuadro 13).

En el cuadro 14 se observa que para el total de células examinadas (1250 : 625 células expuestas y 625 células testigos); las variables que contribuyen a la rupturas del ADN son: problemas para concebir o esterilidad, enfermedades cardiovasculares, familiares con problemas genéticos, uso de anticonceptivos orales, medicamentos con receta médica, edad 2 (de 25 a 35 años) y fumado. Siendo la relación directa entre la migración del ADN y las variables: problemas para concebir o esterilidad, enfermedad cardiovascular, familiares con problemas genéticos, uso de anticonceptivos orales y fumado. Esta relación es inversa para medicamentos con receta médica y edad 2 (de 25 a 35 años). El coeficiente de determinación múltiple tiene un ajuste de un 33%, y la significancia de F es menor a 0,001.

En el cuadro 15 se presentan los datos por separado para las células expuestas y testigos a plaguicidas; cada una de las ecuaciones explica un poco de la variabilidad de la migración del ADN, aunque el ajuste de la recta, dado por el coeficiente de determinación es pequeño, el análisis de varianza ($p < 0,001$), indica la existencia de una relación lineal entre la migración del ADN y las variables en la ecuación.

En el caso de las células expuestas, hay una relación lineal directa entre la migración del ADN y las siguientes variables : enfermedades cardiovasculares, uso de anticonceptivos orales, problemas para concebir o esterilidad y radiografía dental. Tienen una relación inversa la migración del ADN y las variables edad 1 (más de 35 años), edad 2, hijos muertos o abortos espontáneos y fiebre en el último año.

Cuadro 11: Daño en la hebra sencilla del ADN, Análisis de la exposición a plaguicidas por medio de una regresión lineal múltiple (N=1250 células, 625 células expuestas y 625 células no expuestas).

Exposición	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-Student)	Coefficiente de determinación (R^2)	ANDEVA (F)	Significancia (F)
Grupo total (n=1250)					
Menos de 10 años	2,4851	0,1569	0,00654	4,10251	0,0168
Más de 10 años	7,2171	0,0054			
0-5 años (n=750)	1,6630	0,4210	0,00087	0,64831	0,4210
5-10 años (n=200)	20,429	0,0000	0,12068	27,17462	0,0000
10-15 años (n=150)	19,512	0,0000	0,12970	22,05699	0,0000
Más de 15 años (n=150)	4,3060	0,3808	0,00519	0,77270	0,3808

Cuadro 12: Análisis de las variables que influyen en la migración del ADN del grupo de expuestas por medio de una regresión lineal múltiple (N=625 células).

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Abortos y mortinatos	-0,178986	0,0007
Alergias	0,314199	0,0000
Anticonceptivos orales	0,331892	0,0000
Edad 1	-0,319235	0,0000
Enfermedades cardiovasculares	0,187662	0,0000
Expuesto 1	0,209830	0,0003
Expuesto 2	0,290472	0,0000
Familiares con problema genéticos	0,038216	0,5433
Fiebre en el último año	-0,352015	0,0000
Fumado	0,165506	0,0083
Hijos con malformaciones	-0,188969	0,0166
Medicamentos con receta médica	-0,114283	0,0315
Problemas para concebir	0,259905	0,0000
Radiografías dentales	0,078951	0,1258
Rayos X	-0,046361	0,5071

Múltiple R : 0,46260
R² : 0,21400
R² ajustada : 0,19464
Error estándar : 25,75380
F= 11,05377 Sig. F= 0,0000

Cuadro 13: Analisis de las variables que influyen en la migración del ADN del grupo de no expuestas por medio de una regresión lineal múltiple (N=625 células).

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Abortos y mortinatos	0,041896	0,3680
Alergias	0,171068	0,0017
Edad 1	0,225861	0,0006
Edad 2	-0,047651	0,3845
Familiares con malformaciones	0,185957	0,0001
Fiebre en el último año	0,128748	0,0216
Fumado	0,293751	0,0000
Hijos con malformaciones	0,199543	0,0003
Medicamentos con receta médica	-0,244952	0,0001
Problemas para concebir o esterilidad	0,102580	0,0780
Radiografías dentales	-0,118301	0,0199
Rayos X	-0,110726	0,0478
Uso de anticonceptivos	0,026301	0,6685

Múltiple R : 0,42140
 R² : 0,17758
 R² ajustada : 0,16008
 Error estándar : 26,08413
 F= 10,14841 Sig. F= 0,0000

Cuadro 14: Análisis de las variables (N=1 250 células : 625 células expuestas y 625 células no expuestas) por medio de una regresión múltiple.

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Anticonceptivos orales	0,211592	0,0000
Edad 1	0,050570	0,1754
Edad 2	-0,086173	0,0170
Enfermedad cardiovascular	0,192450	0,0000
Expuesto 1	0,007670	0,7930
Expuesto 2	-0,024894	0,4023
Familiares con problemas genéticos	0,106479	0,0002
Fumado	0,118488	0,0002
Medicamentos con receta médica	-0,176393	0,0000
Problemas para concebir o esterilidad	0,148421	0,0000

Múltiple R : 0,33007
 R² : 0,10895
 R² ajustada : 0,10175
 Error estándar : 27,18486
 F= 15,14886 Sig. F= 0,0000

Cuadro 15: Análisis de las variables por medio de un análisis de regresión múltiple (N= 1 250 células, 625 células expuestas y 625 células no expuestas).

Variable	Expuestas (625 células)		No expuestas (625 células)	
	Coef de reg	Sig	Coef de reg	Sig
Anticonceptivos orales	0,364595	0,0000	-0,065591	0,2024
Edad 1	-0,273626	0,0000	0,045459	0,5560
Edad 2	-0,153357	0,0177	-0,060778	0,2697
Enfermedad cardiovascular	0,194213	0,0000	0,121900	0,0774
Familiares con problemas genéticos	-0,103021	0,0392	0,165764	0,0002
Fiebre en el último año	-0,379218	0,0000	0,030259	0,5490
Fumado	-0,102602	0,0789	0,185734	0,0001
Hijos muertos o abortos espontáneos	-0,26645	0,0000	0,085426	0,0609
Problemas para concebir o esterilidad	0,229677	0,0000	0,172337	0,0003
Radiografía dental	0,160484	0,0014	-0,011964	0,7893
Rayos X	0,046500	0,2859	-0,182286	0,0009

EXPUESTAS

Multiple R : 0,40991
R² : 0,16803
R² ajustada : 0,15310
Error estándar : 26,40960
F= 11,25498 Sig. F= 0,0000

NO EXPUESTAS

Multiple R : 0,37731
R² : 0,14236
R² ajustada : 0,12697
Error estándar : 26,59331
F= 5,91537 Sig. F= 0,0000

Para las células testigos existe una relación directa entre la migración del ADN y las variables : rayos X, familiares con problemas genéticos, problemas para concebir o esterilidad y fumado (cuadro 15).

En el cuadro 16, se puede explicar 43% de la variabilidad en la migración del ADN, que corresponde a todas las variables en la ecuación, la gran mayoría tienen una relación directa con el tamaño de la cola (significancia, para una t-student $p < 0,05$), con excepción de: expuesto 1, edad 2 y medicamentos con receta médica. A pesar de que el coeficiente de determinación múltiple es pequeño, la estadística F ($p < 0,001$), indica que existe una relación lineal entre estas variables y la migración del ADN.

En el siguiente grupo de exposición (cuadro 17), las variables que tienen una relación lineal con la migración del ADN son: expuesto 1 (que corresponde a las mujeres expuestas durante 61-120 meses) y problemas para concebir o esterilidad. La relación es directa en el caso de la exposición e inversa en el caso de los problemas para concebir o esterilidad. El ajuste de la ecuación explica 42% de la variabilidad, siendo el principal componente la exposición. La estadística F ($p < 0,001$) muestra la linealidad entre estas variables y la migración del ADN.

En el grupo de exposición de 121 a 180 meses (cuadro 18), la ecuación tiene un ajuste de 41% ; las variables que tienen un comportamiento importante son edad 2 (de 25 a 35 años) y expuesto 1 (corresponde a la exposición) . La edad tiene una relación inversa con la migración del ADN ; mientras que la exposición mantiene una relación lineal directa con la migración del ADN. La estadística F indica que efectivamente existe una relación lineal entre estas variables y la migración del ADN.

En el grupo de más de 181 meses de exposición (cuadro 19), solo los rayos X tienen una relación lineal, que además es inversa, con la migración del ADN. El hecho de que la significancia de la t-student sea mayor a 0,05 significa que no existe una relación lineal entre la variable dependiente (migración del ADN) y la(s) variable(s) independientes, pero no se puede afirmar que no haya relación alguna

entre la variable independiente y la variable dependiente ; puede que la relación sea de otro tipo, y no precisamente lineal.

Cuadro 16: Análisis de las variables por medio de una regresión múltiple (N= 750 células, 375 células expuestas y 375 células no expuestas). Grupo con 1 a 60 meses de exposición.

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Anticonceptivos orales	0,376355	0,0000
Edad 1	0,162066	0,0002
Edad 2	-0,146516	0,0015
Enfermedad cardiovascular	0,124907	0,0013
Expuesto 1	-0,153781	0,0000
Familiares con problemas genéticos	0,102860	0,0058
Herpes	0,117046	0,0022
Medicamentos con receta	-0,153110	0,0001
Problemas para concebir o esterilidad	0,139239	0,0002

Múltiple R : 0,43646
R² : 0,19050
R² ajustada : 0,18065
Error estándar : 25,59485
F= 19,34890 Sig. F= 0,0000

Cuadro 17: Análisis de las variables por medio una regresión múltiple (N= 200 células, 100 células expuestas y 100 células no expuestas). Grupo de 61- 120 meses de exposición .

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Edad 1	0,143513	0,2061
Edad 2	0,182661	0,1080
Expuesto 1	0,485335	0,0000
Fumado	-0,189726	0,0986
Problemas para concebir o esterilidad	-0,429241	0,0002
Radiografía dental	-0,132967	0,0771

Múltiple R : 0,42030
R² : 0,17665
R² ajustada : 0,15106
Error estándar : 27,16074
F= 6,90145 Sig. F= 0,0000

Cuadro 18: Análisis de las variables por medio de una regresión lineal múltiple (N=150 células, 75 células expuestas y 75 células no expuestas). Grupo de 121 a 180 meses de exposición.

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Edad 2	-0,187909	0,0138
Expuesto 1	0,336472	0,0000
Rayos X	0,071014	0,3762

Múltiple R : 0,41170
 R² : 0,16950
 R² ajustada : 0,15243
 Error estándar : 25,02337
 F= 9,932337 Sig. F= 0,0000

Cuadro 19: Análisis de las variables por medio de una regresión lineal múltiple (N=150 células, 75 células expuestas y 75 células no expuestas). Datos de más de 181 meses de exposición.

Variable	Coefficiente de regresión estandarizado (β)	Significancia (t-student)
Alergias	-0,199822	0,1515
Edad 1	0,0829988	0,7383
Expuesto 1	0,098203	0,4563
Familiares con problemas genéticos	0,346495	0,0644
Rayos X	-0,407317	0,0013

Múltiple R : 0,41279
 R² : 0,17040
 R² ajustada : 0,14159
 Error estándar : 27,77170
 F= 5,91537 Sig. F= 0,0000

IV. DISCUSIÓN

El análisis del grupo total de mujeres a las que se les hizo el **ensayo de micronúcleos** en linfocitos, no mostró diferencias entre grupos, salvo para las trabajadoras que manifestaron sufrir de dermatitis, dolores musculares, dolores de cabeza, mareos, náuseas y fiebre con más frecuencia; muchos de estos síntomas pueden deberse al estar expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. Esto es consistente con lo informado por otros autores en trabajadores expuestos a plaguicidas (Vial *et al.* 1996).

Los micronúcleos son el reflejo de un daño causado por algún agente que interfiere en el ensamblaje del huso mitótico o que produce rupturas en ambas cromátidas de un cromosoma. Según los resultados obtenidos, no se puede afirmar que los plaguicidas a los que están expuestas estas trabajadoras afecten la frecuencia de micronúcleos; esto puede deberse a:

1. Que el daño es a otro nivel, de manera que el marcador biológico medido (micronúcleos en linfocitos) no es el más indicado.
2. Que las células blanco elegidas no son las más indicadas para ver el daño en el ADN.
3. La prueba de micronúcleos tiene una sensibilidad relativamente baja para estudiar poblaciones expuestas a mezclas de plaguicidas.
4. Estos plaguicidas pueden entrar por una ruta que no produce daño al ADN. En animales de laboratorio el tratamiento oral e intraperitoneal con clorpirifós induce un alto porcentaje de eritrocitos policromáticos con micronúcleos; lo cual no ocurre cuando se administra este insecticida por vía dermal (Amer y Fahmy 1982). Hay que recordar que las mujeres están en contacto con los plaguicidas por esta ruta.
5. Por las características fisico-químicas de los plaguicidas en cuestión no son absorbidos por el organismo con facilidad, o son eliminados con rapidez del mismo. El clorpirifós y el imalzalil son poco solubles en agua.

6. La dosis de plaguicidas no es suficientemente alta para inducir micronúcleos en linfocitos de sangre periférica. Puede ser que la exposición de las trabajadoras a plaguicidas, consiste en dosis bajas y repetidas, de manera que no se alcanza el nivel de intensidad capaz de aumentar la frecuencia de micronúcleos.
7. A la dinámica de los plaguicidas en el ambiente, de manera que el grupo control está en contacto con plaguicidas, por lo que se hace necesario contar con un grupo no expuesto, que sea externo al cantón de Pococí.

Algunos resultados conflictivos en el monitoreo genético en poblaciones expuestas a plaguicidas, se deben a múltiples exposiciones, a diferentes tipos de plaguicidas o a la composición heterogénea de la población en estudio, más que a una sensibilidad limitada de los ensayos utilizados (Scarpato *et al.* 1996a y b). En este sentido, existen muchas formas de aumentar la sensibilidad de este ensayo, como utilizar anticuerpos monoclonales antibromodeoxiuridina y aumentar el número de células tamizadas por muestra (Norppa *et al.* 1993). Esto último es de suma importancia, sobre todo cuando no se cuenta con los niveles de referencia de la población (Blas 1995).

Sin embargo, es importante tener presente, que no debe descartarse que las mujeres del grupo testigo estén expuestas a plaguicidas de manera indirecta, lo que puede explicar parcialmente porque estas tienen aumentada la frecuencia de micronúcleos. En este sentido, aunque se tomaron mujeres que nunca hubiesen trabajado en una actividad agrícola, que no viven dentro de una finca y que su compañero no trabaja en una actividad agrícola, no se puede ignorar el hecho, de que algunas fincas bananeras se encuentran cerca del centro de Guápiles; de manera que es posible que la población general esté en contacto con los residuos de plaguicidas que están en el ambiente (aire, agua, suelo, alimentos, etc.). Además, muchas de ellas utilizan al menos una vez por mes, algún plaguicida de uso doméstico para el control de plagas caseras (Castro 1998, en preparación).

Hay evidencia que sugiere que la población general se encuentra expuesta a plaguicidas. En un estudio llevado a cabo por Cuenca *et al.* (1997) en donde se comparan los niveles de colinesterasas en un grupo de mujeres expuestas a plaguicidas y un grupo testigo, se encontró que las testigos no expuestas a plaguicidas tienen disminuidos los niveles de colinesterasas, sin que este efecto se deba a algún problema hepático o de otra índole, que tenga como consecuencias la disminución en los niveles de esta enzima.

Es bien sabido que las personas que trabajan con plaguicidas son las más expuestas a estos productos; pero el público en general entra en contacto con ellos durante las aplicaciones manuales o por deriva durante la fumigación aérea (Steenland 1996, García 1997). Tampoco se descarta la posibilidad de que toda la población de Pococí este en contacto con ellos a través de las fuentes de agua, contaminadas por desechos de envases o residuos, el lavado de equipo de aplicación en los ríos, las quebradas o las lagunas y el desplazamiento de plaguicidas por el viento y por escorrentía desde los cultivos cercanos (Blanco y Ramírez 1992). Hay que mencionar que muchas de las mujeres cuya sangre fue analizada, han estado expuestas a otros agentes, con un reconocido efecto dañino sobre el material genético, tales como a radiaciones ionizantes (Norppa *et al.* 1993, Fenech 1993a, Wuttke *et al.* 1993, da Cruz *et al.* 1994, Tucker y Preston 1996), siendo en nuestra población las radiografías dentales un factor importante en la presencia de micronúcleos.

Llama la atención el hecho de que haya una frecuencia aumentada significativa de micronúcleos en las mujeres expuestas a plaguicidas y que tienen abortos espontáneos en comparación a aquellas que también están expuestas a plaguicidas pero que no tienen abortos espontáneos. Lo cual puede estar asociado al hecho de que las personas difieren en relación a la susceptibilidad a agentes genotóxicos. En este sentido, cabe la posibilidad que las mujeres con más abortos espontáneos sean el grupo más susceptible.

Es conocido que algunos plaguicidas (ej. DBCP, 2,4-D, 2,4,5-T) incrementan el riesgo de que se presenten abortos espontáneos en las mujeres que están en contacto laboral con estos productos (Savitz *et al.* 1994); así como que tienen relación con las manifestaciones de malformaciones congénitas, nacimientos prematuros y esterilidad (Jaffery y Viswanathan 1986, Hilje *et al.* 1987). La exposición materna al clorpirifós durante el embarazo se ha asociado a un síndrome de polimalformaciones en recién nacidos. En animales de laboratorio se ha informado de malformaciones similares en la literatura publicada y no publicada de la EPA; esto ha llevado a proponer un síndrome de polimalformaciones causado por la exposición a este plaguicida (Sherman 1996, 1995). En este sentido, se acepta que entre los efectos adversos en la salud humana de las aneuploidías (que es una forma mediante la cual se producen los micronúcleos) están los defectos de nacimiento, los abortos espontáneos y la infertilidad (Tucker y Preston 1996).

El ensayo cometa se viene utilizando desde los años 80 para evaluar genotoxicidad pero hasta la fecha, no hay informes de que haya sido usado para estudiar poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas.

Con respecto a los resultados de éste, se observa que las mujeres que tienen más de cinco años de trabajar en plantas empacadoras tienen más dañado el material genético que el grupo no expuesto. Esto sugiere una relación entre el daño en la hebra sencilla del ADN y la exposición a plaguicidas de una forma constante y prolongada a dosis que no producen efectos agudos.

El daño que se manifiesta en la fragmentación de la hebra sencilla de ADN, puede ser el producto de:

1. Que los plaguicidas dañen directamente el molde del ADN.
2. Estos productos afecten a los nucleótidos que hay en la célula, lo que no permitiría la reparación adecuada de las rupturas en la hebra sencilla del ADN, ya sea porque hay un desbalance en la cantidad de nucleótidos, o por

la existencia de nucleótidos defectuosos que no se acoplan adecuadamente en el molde.

3. Las proteínas de replicación del ADN sean el blanco de estos productos.
4. El efecto de estas sustancias sea sobre las proteínas de reparación del ADN.

En cualquier caso el equilibrio genético se ve alterado.

El daño al ADN es el resultado del desbalance entre dos fuerzas opuestas. Por un lado está el ataque por parte de electrófilos reactivos a la molécula por parte de los agentes externos y por el otro los mecanismos de bloqueo (barreras externas, enzimas de desintoxicación) y de reparación celular. Cuando el bombardeo externo es muy grande (exposición a muy altas dosis) o prolongado, los mecanismos encargados de mantener este balance pierden terreno, lo cual puede traducirse en un futuro lejano en formación de tumores o enfermedades. También podría verse afectada la progenie de estas personas al aumentar el riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas.

Otro factor que hay que tener en cuenta es que los mecanismos para mantener el equilibrio corporal, son más ineficientes con la edad.

Hay otros factores de los que hasta el momento se hace poca referencia en la literatura y que en este estudio están relacionados con el daño en la hebra sencilla del ADN, como las enfermedades cardiovasculares, las alergias y el uso de anticonceptivos orales. Por otra parte se sabe que la hebra sencilla del ADN se ve afectada por la influencia de moléculas con oxígenos reactivos, que actúan como electrófilos directos en la molécula (Archer 1988, Singh *et al.* 1991). Estos radicales libres han sido considerados como parte de los mecanismos que contribuyen a la etiología de enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento (Halliwell 1994 citado por Hartmann *et al.* 1995b). En este sentido, no es de extrañar los resultados encontrados en este estudio.

En relación a la edad, los datos arrojan resultados contradictorios, lo que es concordante con la literatura (Singh *et al.* 1990, Singh *et al.* 1991b, Betti *et al.* 1994). En este sentido, hay que recalcar el papel que juega la susceptibilidad individual, la cual

debe tomarse cuando se realizan estudios de monitoreo, en conjunto con estudios en condiciones de laboratorio (Betti *et al.* 1995, Hartmann *et al.* 1995b, Hellman *et al.* 1997). Esta susceptibilidad, puede darse también a nivel de tipos celulares dentro de un mismo individuo, por lo que cuando los recursos lo permiten, debe determinarse los tipos de linfocitos con los que se trabaja, o si estos se encuentran en un estadio de vida particular (Sigh *et al.* 1988, Sigh *et al.* 1990, Green *et al.* 1992), ya que es posible que existan variaciones entre estos, en la liberación de compuestos con oxígenos reactivos dentro de la célula, o en la habilidad de los radicales para atacar al ADN (Collins *et al.* 1995).

El manejo estadístico de los datos del ensayo cometa fue muy difícil, pues muchas variables independientes se correlacionan entre sí (o sea que una variable explica a la otra); de manera que se presentó una gran colinearidad entre estas, por lo que las ecuaciones para la regresión múltiple solo representan una parte de la realidad. Lo anterior apoya el argumento de que el ensayo cometa es una técnica sumamente sensible, aparte de inespecífica, que detecta el daño al ADN de manera integral, de tal forma que existen diversos factores que afectan la integridad del ADN.

Es importante realizar investigaciones toxicogenéticas, para evaluar el efecto de los plaguicidas a nivel cromosómico, en algunos estudios de mutagenicidad *in vitro* e *in vivo* con plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides indican la presencia de efectos genéticos y citogénéticos positivos en los sistemas de los mamíferos (Rupa *et al.* 1989). También se ha obtenido evidencia epidemiológica de un presunto riesgo genético, por lo menos a nivel somático, en poblaciones humanas. Los trabajadores que manufacturan los plaguicidas, quienes los aplican y la gente que sufre intoxicaciones agudas por esta causa, se han considerado en muchos estudios como grupos de riesgo. Algunos estudios han demostrado la asociación entre la exposición ocupacional a ciertos plaguicidas, la presencia de aberraciones cromosómicas y el aumento en la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas

en linfocitos de sangre periférica (Rupa *et al.* 1989, De Ferrari *et al.* 1991, Kucerová *et al.* 1992) (ver cuadro 20 en el apéndice 3).

Los estudios acerca de los efectos genotóxicos de plaguicidas no son concluyentes en la mayoría de los casos. Los primeros trabajos en este campo fueron hechos por Yoder *et al.* en 1973 (citado por Dulout *et al.* 1985) estableciendo un aumento significativo de aberraciones cromosómicas estructurales en aplicadores de plaguicidas durante la época de mayor aplicación. Van Bao *et al.* en 1974 (citado por Dulout *et al.* 1985) estudiaron los cromosomas de pacientes intoxicados con plaguicidas organofosforados y encontraron un incremento de rupturas de las cromátidas y aberraciones estables tipo cromosoma. Resultados similares fueron obtenidos por Rabello *et al.* en 1975 (citado por Dulout *et al.* 1985) en análisis citogenéticos de trabajadores de las fábricas de DDT en Sao Paulo (Brasil) y por Dulout *et al.* (1985) en un estudio realizado con floricultores asiáticos de La Capilla (Argentina), donde encontraron un aumento de aberraciones cromosómicas. En contraste, existen análisis citogenéticos en trabajadores expuestos crónicamente al metilparatión que no muestran un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Tampoco se observó una elevación en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas de trabajadores forestales aplicadores de herbicidas fenoxiácidos en Finlandia (Dulout *et al.* 1985). Resultados similares se obtuvieron con un grupo de floricultores de la región de Toscana (Italia), expuestos a una mezcla de plaguicidas y evaluados para intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas estructurales y micronúcleos durante la época de baja exposición a plaguicidas (Scarpato *et al.* 1996a). La exposición ocupacional a plaguicidas, por parte de los floricultores en Toscana (Italia), se caracteriza por períodos de atomización intensiva de plaguicidas, atomización reducida o sin actividad. En otro estudio, con una población de 23 floricultores apareados con 22 testigos se estudiaron varios parámetros citogenéticos (intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos); además a cada donador se le caracterizó para tres

genes polimórficos involucrados en el metabolismo de sustancias xenobióticas. Estos corresponden a glutation-s-transferasa M1 (GSTM1), glutación-s-transferasa T1 (GSTT1) y N-acetiltransferasa 2 (NAT2). Los resultados encontraron que la exposición a los plaguicidas utilizados, no afectó ninguno de los parámetros analizados (Scarpato *et al.* 1996b).

En linfocitos expuestos *in vitro* a una mezcla de 15 plaguicidas (ditiocarbamatos, benomil, tiabendazol, difenilamina, clorotalonil, procimidona, metidación, etil-clorpirifós, fenarimol, metil-paratión, clorprofán, paratión, vinclozolin, clorfevinfós y etil-pirimifós) a las concentraciones comúnmente encontradas en las comidas de Italia central no indujo variaciones significativas en el número de células hipodiploides, hiperdiploides o poliploides, así como tampoco en el de cromosomas o aberraciones cromatídicas. Sin embargo, se observó un incremento dosis dependiente en el número de separaciones centroméricas no sincrónicas. Este efecto no se presentó al excluir al benomil de la mezcla (Dolara *et al.* 1994).

Titenko-Holland *et al.* (1997), en estudios *in vitro* e *in vivo* con linfocitos humanos expuestos a malatión; encontró en los estudios *in vitro* un aumento de células micronucleadas, a las dosis más altas (75-100 µg/ml) así como una fuerte inhibición de la proliferación celular. Además, muchas de las células tratadas presentaron múltiples micronúcleos. Sin embargo, cuando se estudiaron estos parámetros en linfocitos de trabajadores expuestos intermitentemente al malatión, no se encontró cambios en la proliferación celular, ni en la frecuencia de micronúcleos al compararlos con los testigos (Titenko-Holland *et al.* 1997).

Panneeselvam *et al.* (1995), encontraron en linfocitos humanos expuestos *in vitro* a flucloralín en dosis de 2,5 a 10,0 µg/ml un incremento significativo dependiente de la dosis de aberraciones tipo cromátida, resultados que fueron corroborados con el ensayo de micronúcleos a altas concentraciones (20-50 µg/ml) de este herbicida.

Existen diferentes resultados que indican la toxicidad de los plaguicidas, pero a la vez muestran baja capacidad como agentes iniciadores del proceso de

carcinogénesis. Los estudios bioquímicos e inunuoquímicos muestran que algunos plaguicidas inducen la función mixta de enzimas oxidasas (P-450 IIB1) en diferentes órganos de roedores, lo que indica co-toxicidad, co-carcinogenicidad y un potencial como promotor del proceso carcinogénico. Un informe del U.S. National Research Council (1987, citado por Cantelli-Forti *et al.* 1993) declara que los fungicidas contribuyen con alrededor de 60% en todos los riesgos oncogénicos estimados por causa del universo de plaguicidas. Cantelli-Forti *et al.* (1993) ensayaron la capacidad clastogénica, las propiedades co-tóxicas, co-carcinógenas y promotoras del fungicida fenarimol; a través del conteo de las aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica humana, micronúcleos en médula ósea de ratones, así como la capacidad de modular las actividades específicas dependientes del P-450 en ratones. Para esto último, se administró el fungicida intraperitonealmente en concentraciones de 150 mg/kg y 300 mg/kg de peso vivo en ratas albinas macho (Swiss albino linaje CD1). Estos experimentos dieron resultados negativos para aberraciones cromosómicas, positivo para micronúcleos, y un aumento de la actividad reductasa y de otras isoenzimas, lo que provocó un aumento del metabolismo oxidativo. Esto produce una concentración de radicales libres con centros oxigenados, que contribuye al potencial carcinogénico de muchos agentes no genotóxicos. Los estudios citogenéticos sugieren que el fenarimol, puede actuar como aneugénico, pero no como clastógeno. Esta hipótesis es apoyada por informes parecidos en otros sistemas (Cantelli-Forti *et al.* 1993).

Otros sistemas no necesitan del P-450, pero sí de enzimas peroxidasas. En ambos casos, hay factores como la especie, el linaje, el sexo, la edad, el estado nutricional y hormonal así como el consumo de drogas y químicos empleados; que afectan la actividad enzimática, actuando como inductores o inhibidores (Archer 1988).

Por otra parte, es necesario identificar a las personas que tienen una mayor propensión a sufrir efectos en su salud por estar en contacto con plaguicidas. Muchos

estudios han enfatizado la importancia de identificar individuos que están predispuestos a desarrollar problemas de salud inducidos por mutágenos (Scarpato *et al* 1996b). Al respecto, existen respuestas diferentes a la agresión causada por agentes xenobióticos; que dependen de la susceptibilidad individual lo cual es causado por variación genética. En este sentido, hay evidencia que demuestra que en nuestra población, hay individuos más susceptibles que otros a los plaguicidas. Sierra-Torres *et al* (1998) realizaron un estudio para determinar genes de susceptibilidad a xenobióticos, en una población de trabajadores costarricenses, expuestos a plaguicidas y un grupo testigo. No encontraron diferencias en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Sin embargo la población estudiada por ellos presentó un mayor porcentaje de alelos metabolizantes favorables del gen *GSTT1* que la población testigo. Al analizar al grupo de personas expuestas, tomando en cuenta aberraciones cromosómicas y los genes de susceptibilidad, encontraron que los sujetos con combinaciones de genes desfavorables, tienen una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas. Estos datos sugieren que algunas discrepancias en los estudios de monitoreo de poblaciones expuestas a agentes xenobióticos pueden ser causados por distribuciones heterogéneas de los genes polimórficos metabolizantes.

Existen individuos que heredan alelos que confieren susceptibilidad, como son los genes involucrados en la desintoxicación de xenobióticos como el citocromo P450, la N-acetil-transferasa y la S-glutation-transferasa. En muchos estudios, se ha observado una buena correlación entre la predisposición genética de tener estos genes alterados, la activación de mutágenos ambientales específicos y el desarrollo de cáncer (Au y Sram 1996).

La existencia de variantes alélicas del gen humano de la butirilcolinesterasa, hace que la personas con enzimas atípicas sean metabolizadores pobres de los organofosforados lo que explica porque sólo algunas personas intoxicadas con estos desarrollan el síndrome neurotóxico (Leon *et al.* 1996).

Las enzimas que juegan un papel importante en la activación metabólica, o en la desintoxicación de un amplio espectro de toxinas ambientales están asociadas a una alta incidencia del mal de Parkinson. Estudios recientes han asociado el alelo metabolizador pobre del gen CYP2D6 con la incidencia de la enfermedad de Alzheimer y de las neuronas motoras; aunque no se han observado correlaciones estadísticamente significativas (Smith *et al.* 1995). Por otra parte existen informes recientes que muestran una asociación entre el genotipo acetilador lento NAT2 y la susceptibilidad para desarrollar diabetes mellitus I, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple (Smith *et al.* 1995).

Muchas reacciones catalizadas por la familia enzimática del citocromo P450 producen partículas electrofílicas químicamente reactivas. Estos intermediarios reactivos son inherentemente mutagénicos y pueden unirse al ADN, induciendo mutaciones que resultan en la activación oncogénica o de manera alterna, en la pérdida de función de un gen supresor de tumores. Esta secuencia de eventos es fundamental para el proceso de iniciación de cánceres ligados al ambiente (Barret 1995, Smith *et al.* 1995).

Es importante tener presente que el daño que puede ocurrir en el ADN está modulado tanto por componentes genéticos intrínsecos (v.gr. competencia metabólica, capacidad de reparación) como por factores ambientales extrínsecos (v.gr. dieta, hábitos personales) (Tice *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994). Por otra parte el estudio de poblaciones es difícil, máxime que en una gran cantidad de situaciones las personas están expuestas a mezclas de sustancias complejas, además de que el efecto de la exposición de algunas de ellas es acumulativo a través del tiempo.

El ensayo cometa es altamente reproducible en el mismo sujetos y es sumamente sensible en revelar factores ambientales que dañan al ADN (Betti *et al.* 1994). Singh *et al.* (1991), informaron de un incremento relacionado con la edad en los niveles espontáneos del daño al ADN. Además, se sabe que el fumado, los tratamientos de quimioterapia, el ejercicio físico vigoroso y las radiaciones ionizantes

son factores que afectan la integridad de la hebra sencilla del ADN (Tice *et al.* 1992, Vijayalaxmi *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994, Betti *et al.* 1995 y 1994). En este estudio, el fumado es un factor que contribuye al daño en la hebra sencilla del ADN, lo que es consistente con lo informado en la literatura (Betti *et al.* 1995, 1994, Sardas *et al.* 1995).

El daño inducido al ADN por el fumado está influenciado por la frecuencia y el tiempo que tienen las personas de fumar (Betti *et al.* 1995, Sardas *et al.* 1995); y el cigarrillo no solo daña a la hebra sencilla del ADN de los fumadores, sino que afecta al ADN de sus descendientes (Sardas *et al.* 1995).

El ensayo cometa resultó ser más informativo y sensible que el ensayo de micronúcleos en linfocitos para el tamizaje de plaguicidas en poblaciones ocupacionalmente expuestas a estas sustancias. Este tipo de ensayo detecta daño al ADN por plaguicidas en concentraciones mucho más pequeñas que las concentraciones que se necesitan para producir micronúcleos (Ribas *et al.* 1995).

Además, otro factor que influye en la sensibilidad de este ensayo es el tipo de lesión primaria que produzca el plaguicida al ADN (Tafazoli y Kirsch-Volders 1996). En este sentido, la IARC hace énfasis en la necesidad de categorizar las dos limitaciones epidemiológicas más acentuadas en cualquier estudio, que corresponden por un lado a la pérdida de poder estadístico y por otro a la pérdida de discriminación entre los factores de riesgo, especialmente en la exposición ocupacional a mezclas.

V. CONCLUSIONES

En esta investigación se cumplieron todos los objetivos trazados con el fin de poner a prueba la hipótesis planteada, de lo que puedo concluir :

- Se puede utilizar el ensayo cometa como biomarcador de genotoxicidad en poblaciones expuestas ocupacionalmente a plaguicidas.
- Existe una relación entre el daño a la hebra sencilla del ADN y la exposición ocupacional a plaguicidas.
- Se desconoce si el daño en la hebra sencilla del ADN se debe a los plaguicidas que se utilizan actualmente en el empaque de banano o a otros plaguicidas, pues no se tiene certeza desde cuando se utilizan estos productos. No se puede correlacionar dosis y frecuencia de exposición a plaguicidas con el daño al ADN, debido a las deficiencias de los registros nacionales en cuanto a que productos se utilizan en el cultivo de banano, durante cuánto tiempo y las épocas en que se usaron.
- Los plaguicidas usados en la planta empacadora de banano no tienen un efecto sobre la frecuencia de micronúcleos en las trabajadoras; sin embargo, no se descarta que existan daños genéticos de otro tipo o nivel.
- La técnica de micronúcleos en linfocitos no resultó ser un buen indicador de daño genético, posiblemente debido a que no hay un efecto a nivel de huso mitótico; en la ruptura de ambas cromátidas de un cromosoma; o bien porque tarda más tiempo en desarrollarse este tipo de daño.
- El uso de plaguicidas en la empacadora de banano produce un efecto adverso en la salud de las mujeres que ahí laboran, lo que se ve reflejado en la menor calidad de vida de las mujeres que trabajan en las compañías bananeras al compararlas con la calidad de vida de las mujeres de su misma edad, y con hábitos de vida similares que viven en la misma área geográfica; pero sin exposición ocupacional a plaguicidas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vitro* con los plaguicidas (individuales y en mezclas) utilizados en la planta empacadora de banano, para determinar cuales productos son los que producen daño al ADN.
- Realizar monitoreo genético, usando el ensayo cometa, para detectar daño al ADN, con el objetivo de vigilar la salud de las personas que están en contacto con plaguicidas.
- Implementar el uso de biomarcadores de susceptibilidad (ensayar algunos polimorfismos involucrados en el metabolismo de xenobióticos como: glutatión S-transferasa mu (GSTM1), glutatión S-transferasa theta (GSTT1), N-acetiltransferasa 2 (NAT2)), citocromo P450 u otras; con el fin de determinar la población con mayor riesgo de tener efectos adversos en la salud debido al uso de plaguicidas.
- Mejorar las condiciones de trabajo en el empaque de banano, así como velar por el cumplimiento de la legislación con respecto a las medidas de seguridad; tanto en la fumigación como en relación al equipo de protección. En este sentido se puede utilizar selladoras manuales (de las que se usan en los supermercados), para que no haya contacto directo con el banano recién asperjado con plaguicidas. También se pueden disminuir las jornadas de trabajo. Así en lugar de trabajar 12 horas en el empaque del banano, podrían laborar 6 horas máximo. Las fumigaciones aéreas deben hacerse cuando no hay gente en la plantación y el reingreso al área debe hacerse al menos 24 horas después.
- Realizar investigaciones para evaluar el efecto del estrés en esta labor.
- Para investigaciones futuras acortar la encuesta, ya que algunas preguntas no son muy informativas. Con esto se agilizaría mucho la recolección de datos personales.
- El manejo estadístico de los datos es preferible realizarlos con el total de células (cada célula como un registro) en vez de hacerlo con el total de individuos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Amer, S.M. & F.A.E. Aly. 1992. Cytogenetic effects of pesticides. IV. Cytogenetic effects of the insecticides Gardona and Dursban. *Mutation Research*. 279:165-170.
- Amer, S.M. & M.A. Fahmy. 1982. Cytogenetic effects of pesticides. I. Induction of micronuclei in mouse bone marrow by the insecticide Dursban. *Mutation Research*. 101:247-255.
- Anwar, W.A. & M.Y. Shamy. 1995. Chromosomal aberrations and micronuclei in reinforced plastic workers exposed to styrene. *Mutation Research* 327: 41-47.
- Anónimo. 1996. Reporte oficial intoxicaciones con plaguicidas 1995. División de Saneamiento Ambiental, Dpto. De Registro y Control de Sustancias Tóxicas y Medicina del Trabajo. Ministerio de Salud. San José, Costa Rica. 26p.
- Anónimo. 1993a. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, Environmental Health Criteria 155, 80 p. World Health Organization.
- Anónimo. 1993b. Benomyl. Geneva, Environmental Health Criteria 148, 135 p. World Health Organization.
- Anónimo. 1985. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. Geneva, Environmental Health Criteria 46, 126 p. World Health Organization.
- Archer, M., C. 1988. Chemical carcinogenesis, p. 89-105. *In* Tannock, I.F & R.P. Hill (eds.). *The basic Science of oncology*. 2^{da} ed. Pergamon Press, New York.
- Au, W. & R. Sram. 1996. Second international conference on environmental mutagens in human populations. *Environ. Health Perspect*. 104(supl 3):421-422.
- Au, W., D. Walker, J. Ward, E. Whorton, M. Legator & V. Singh. 1991. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutation Research*. 260:137-144.
- Barrett, J.C. 1995. Role of mutagenesis and mitogenesis in carcinogenesis, p. 21-30. *In* Phillips, D. & S. Venitt (eds.) *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford.

- Betti, C., T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno & R. Barale. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*. 307:323-333.
- Betti, C., T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno & R. Barale. 1995. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutation Research*. 343:201-207.
- Blanco, J. y O. Ramírez. 1992. La contaminación por plaguicidas percibida por los inspectores de saneamiento ambiental. *Revista de Ciencias Ambientales* 9: 59-68.
- Blas, J. 1995. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células uroepiteliales de individuos con exposición ambiental a arsénico. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 71 p.
- Bolognesi, C., M. Parrini, F. Merlo & S. Bonassi. 1993. Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 40:405-411.
- Bolognesi, C., A. Abbondandolo, R. Barale, R. Casalone, L. Dalprá, M. De Ferrari, F. Degrassi, A. Forni, L. Lamberti, R. Pasquini, R. Puntoni, I. Sbrana, A. Stella & S. Bonassi. 1997. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchange, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkes & Prevention*. 6:249-256
- Boffetta, P., M. Kogevinas, N. Pearce & E. Matos. 1994. Cancer, p. 118-122. *In* N. Pearce, E. Matos, H. Vainio, P. Boffetta & M. Kogevinas (eds.). *Occupational cancer in developing countries*. IARC Scientific Publications, Lyon.
- Brouwer, D., E. Brouwer & J. van Hemmen. 1994. Estimation of long-term exposure to pesticides. *American Journal of Industrial Medicine*. 25:573-588.
- Brunner, M., S. Albertini & F.E Würgler. 1991. Effects of 10 known or suspected spindle poisons in the *in vitro* porcine brain tubulin assembly assay. *Mut.* 6:65-70.

- Cantelli-Forti, G., M. Paolini & P. Hrelia. 1993. Multiple endpoint procedure to evaluate risk from pesticides. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 101(suppl. 3):15-20.
- Carere, A. A. Antoccia, R. Crebelli, F. Degrassi, M. Fiore, I. Iavarone, G. Isacchi, S. Lagorio, P. Leopardi, F. Marcon, F. Palitti, C. Tanzarella & A. Zijno. 1995. Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mutation Research*. 332: 17-26.
- Carrano, A. & A. Natarajan. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*. 204:379-406.
- Castro, R. 1998. Análisis de micronúcleos del epitelio oral en trabajadoras de una zona bananera expuestas a plaguicidas. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica pp. 85 (En preparación).
- Collins, A., M. Ai-guo & S. Duthie. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*. 336:69-77.
- Collins, A., V. Dobson, M. Dusinská, G. Kennedy & R. Stetina. 1997a. The comet assay : what can it really tell us? . *Mutation Research*. 375:183-193.
- Collins, A., M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová & N. Vaughan. 1997b. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 30 : 139-146.
- Corbett, J., K. Wright & A. Baillie. 1984. The biochemical mode of action of pesticides, p. 337-352. 2^a ed., Academic Press Inc., London.
- Cuenca, P., V. Ramírez, R. Castro & K. Schosinsky. 1997. Efecto genotóxico de los plaguicidas en una población ocupacionalmente expuesta. Evaluación por medio de micronúcleos de linfocitos y del epitelio bucal, aberraciones cromosómicas, mecanismos de reparación y electroforesis de células únicas ;

controlando paralelamente los niveles de colinesterasa sérica y eritrocítica. Informe final presentado ante el proyecto PLAGSALUD/MASICA. San José, Rica, 62 p.

- da Cruz, A.D., A.G. Mc Arthur, C.C. Silva, M.P. Curado & B.W. Glickman. 1994. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. *Mutation Research*. 313 : 57-68.
- De Ferrari, M., M. Artuso, S. Bonasssi, S. Bonatti, Z. Cavalieri, D. Pescatore, E. Marchini, V. Pisano & A. Abbondandolo. 1991. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral lymphocytes. *Mut. Res.* 260:105-113.
- de Raat, W., H. Stevenson, B. Hakkert & J.van Hemmen. 1997. Toxicological risk assessment of worker exposure to pesticides: some general principles. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 25:204-210.
- Dich, J., S.H. Zahm, A. Hanberg & H.O. Adami. 1997. Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control*. 8: 420-433.
- Dolara, P., M. Salvadori, T. Capobianco & F. Torricelli. 1992. Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omeothoate, deltamethrin, benomyl and their mixture. *Mutation Research*. 283:113-118.
- Dolara, P., F. Torricelli & N. Antonelli. 1994. Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy. *Mutation Research*. 325:47-51.
- Domínguez, I., N. Panneerselvam, P. Escalza, A. Natarajan & F. Cortés. 1993. Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. *Mutation Research*. 301:135-141.

- Dulout, F., M. Pastori, A. Olivero, M. González, D. Loria, E. Matos, N. Sobel, E. de Buján & N. Albiano. 1985. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutation Research*. 143: 237-244.
- Eastmond, D.A. & J.D. Tucker. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 13: 34-43.
- Fairbairn, D., P. Olive & K. O'Neill. 1995. The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Research*. 339:37-59.
- Fenech, M. & A. Morley. 1985a. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. 147:29-36.
- Fenech, M. & A. Morley. 1985b. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research*. 148:99-105.
- Fenech, M. 1993a. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect.* 101 (suppl 3):101-107.
- Fenech, M. 1993b. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*. 285 : 35-44.
- Fernández, L. 1983. Manejo seguro de plaguicidas. Agroindustrial Leofer, S.A. San José, 130 p.
- García, J. 1997. Introducción a los plaguicidas. Editorial Universidad Estatal a Distancia, 476 p.
- García, J. 1998. Situación mundial de la industria de los plaguicidas. *En: García, J. Introducción a los plaguicidas.* 2° ed. Editorial Universidad Estatal a Distancia, en preparación.
- Green, M., J. Lowe, S. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole, A. Anstey & C. Arlett. 1992. UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes

- from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutation Research*. 273 :137-144.
- Hartmann, A., U. Plappert, K. Raddatz, M. Grunert-Fuchs & G. Speit. 1994. Does physical activity induce DNA damage?. *Mut.* 9:269-272.
- Hartmann, A. & G. Speit. 1995a. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister - chromatid exchanges (SCE). *Mutation Research*. 346:49-56.
- Hartmann, A., A. Nieß, M. Grünert-Fuchs, B. Poch & G. Speit. 1995b. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Research*. 346:195-202.
- Hartmann, A. & G. Speit. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel tests (comet assay). *Toxicology Letters*. 90:183-188.
- Heddle, J.A., C.B. Lue, E.F. Saunders & R. D. Benz. 1978. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Research*. 38: 2983-2988.
- Hellman, B., H. Vaghef, L. Friis & C. Edling. 1997. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ: Health*. 69:185-192.
- Hilje, L., L. Castillo, L. Thrupp & I. Wesseling. 1987. El uso de los plaguicidas en Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, 159 p.
- Högstedt, B. 1984. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Research*. 130 : 63-72.
- Jaffery, F. & P. Viswanathan. 1986. Women workers as specific high risk group in occupational y Environmental Toxicology. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 45:109-118.
- Klaude, M., S. Erickson, J. Nygren & G. Ahnström. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*. 363:89-96.

- Kogevinas, M., P. Boffetta & N. Pearce. 1994. Occupational exposure to carcinogens in developing countries, p. 63- 85. *In* Pearce, N., E. Matos, H. Vainio, P. Boffetta & M. Kogevinas (eds.). Occupational cancer in developing countries. IARC Scientific Publications, Lyon.
- Lebailly, P., C. Vigreux, T. Gogard, F. Sichel, E. Bar, J. LeTalaër, M. Henry-Amar & P. Gauduchon. 1997. Assessment of DNA damage induced *in vitro* by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorotalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research*. 375: 205-217.
- León, F.E., G. Pradilla & E. Vesga. 1996. Neurological effects of organophosphate pesticides. *BMJ*. 313(14 Sept): 690-691.
- Lindholm, C., H. Norppa, M. Hayashi & M. Sorsa. 1991. Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 260:369-375.
- Mäki-Paakkanen, J. & H. Norppa. 1987. Induction of micronuclei by vinyl acetate in mouse bone marrow cells and cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 190:41-45.
- Maroni, M. & A. Fait. 1993. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature, Vol 78, p. 107-121. *In* Witschi, H. P. & K. . Netter (eds.). *Toxicology*, Elsevier Scientific Publisher Ireland LTD.
- Marzin, D. 1997. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutation Research*. 392: 175-181.
- Mavournin, K., D. Blakey, M. Cimino, M. Salamone & J. Heddle. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*. 239:29-80.

- McConnell, R. & A. Hruska. 1993. An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: Implications for prevention in developing countries. *American Journal of Public Health*. 83:1559-1562.
- McDuffie, H. 1994. Women at work : Agriculture and pesticides. *JOM*. 36:1240-1246.
- McKelvey-Martin, V., M. Green, P. Schmezer, B. Pool-Zobel, M. De Méo & A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*. 288:47-63.
- Mudry de Pargament, D., M. Labal de Vinuesa & I. Larripa. 1987. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs. I. Thiabendazole (TBZ). *Mutation Research*. 188:1-6.
- Nehéz, M. & I. Dési. 1996. A genetic toxicological study of pesticide workers. *Int. J. Environ. Health Res*. 6:201-208.
- Norppa, H., Luomahaara S., H. Heikonen, S. Roth, L. Renzi & C. Lindholm. 1993. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ. Health Perspect*. 101 (suppl 3):139-143.
- Norusis, M. 1990a. Procedure T-TEST; procedure ONEWAY, procedure NPAR TEST and procedure REGRESSION. Pp. B1-B14, B25-B36, B49-b124. In: *SPSS/PC+Statistic™ 4.0 for the IBM PC/XT/AT and PS/2*. SPSS Inc., Michigan.
- Norusis, M. 1990b. Procedure LOGISTIC REGRESSION. Pp. B39-B62. In: *SPSS/PC+Advanced Statistic™ 4.0 for the IBM PC/XT/AT and PS/2*. SPSS Inc., Michigan.
- Ostrosky-Wegman, P. & M. Gonsebatt. 1996. Environmental toxicants in developing countries. *Environ. Health Perspect*. 104(suppl 3):599-602.
- Panneerselvam, N., S. Sinha & G. Shanmugam. 1995. Genotoxicity of the herbicide fluchloralin on human lymphocytes *in vitro*: chromosomal aberration and micronucleus tests. *Mutation Research*. 344: 69-72.

- Pincu, M., D. Bass & A. Norman. 1984. An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Research*. 139:29-80.
- Ramírez, A. y C. Ramírez. 1980. Esterilidad masculina causada por la exposición laboral al nematocida 1,2-dibromo-3-cloropropano. *Acta médica costarricense*. 23:219-222.
- Ribas, G., G. Frenzilli, R. Barale & R. Marcos. 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*. 344:41-54.
- Ribeiro, L.R., D.M.F. Salvadori, A.C.C. Rios, S.L. Costa, A.D. Tates, M. Törnqvist & A.T. Natarajan. 1994. Biological monitoring of workers occupationally exposed to ethylene oxide. *Mutation Research*. 313: 81-87.
- Ross, G., T. McMillan, P. Wilcox, A. Collins. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) : technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutation Research*. 337:57-60.
- Rufini, S., A. Giovanetti & A. Chavarría. s.f. Induction of sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes treated with three carbamate pesticides (carbofuran, oxamyl and methomyl). Istituto di Antropologia, facoltà di Scienze M.N.F., Università di Roma. Manuscrito.
- Rupa, D., P. Reddy & O. Reddi. 1989. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticides sprayers. *Mutation Research*. 223:253-258.
- Saracci, R., M. Kogevinas, P. Bertazzi, B. Bueno de Mesquita, D. Coggon, L. Green, T. Kauppinen, K. Abbé, M. Littorin, E. Lynge, J. Mathews, M. Neuberger, J. Osman, N. Pearce & R. Wilkelmann. 1991. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Lancet*. 338:1027-1032.

- Sardas, S., D. Walker, D. Akyol & A. Karakaya. 1995. Assesment of smoking induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*. 335:213-217.
- Savitz, D. , N. Sonnenfeld & A. Olshan. 1994. Review of epidemiologic studies of paternal occupational exposure and spontaneous abortion. *American Journal Industrial Medicine*, 25:361-383.
- Scarpato, R., L. Migliore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Miligi & N. Loprieno. 1996a. Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists : no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. *Mutation Research*. 367:73-82.
- Scarpato, R., L. Migliore, A. Hirvonen, G. Falck & H. Norppa. 1996b. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: Characterization of GSTM1, GSTT1 and NAT2 genotypes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 27:263-269.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*. 31:9-15.
- Sherman, J. 1996. Chlorpyrifos (dursban) associated birth defects: Report of four cases. *Archives of Environmental Health*. 51:5-8.
- Sherman, J. 1995. Chlorpyrifos (Dursban) associated birth defects: A proposed syndrome, report of four cases and discussion of the toxicology. *Internattional Journal Occupational Medicine & Toxicology*. 4:417-431.
- Sierra-Torres, C., N. Cajas-Salazar, B. Shipp, M. Serrana & W. Au. 1998. Modification of genotoxicity in an exposed population by inherence of polymorphic metabolizing genes. *Environ. Mol. Mut.* , 31(Suppl. 29):62.
- Singh, N., R. Tice, R. Stephens & E. Schneider. 1991a. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research*. 252:289-296.

- Singh, N., M. Danner, R. Tice, J. Pearson, L. Brant, C. Morrel & E. Schneider. 1991b. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutation Research*. 248:285-289.
- Singh, N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brandt & E.L. Schneider. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research*. 237: 123-130.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, L. Brandt & E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Mutation Research*. 175: 184-191.
- Smith, G., C.A.D. Smith & C.R. Wolf. 1995. Pharmacogenetic polymorphisms, p. 83-106. *In* Phillips, D. & S. Venitt (eds.) *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford.
- Song, X., F. Seidler, J. Saleh, J. Zhang, S. Padilla & T. Slotkin. 1997. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos : targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 145:158-174.
- Sorsa, M. , J. Wilbourn & H. Vainio. 1992. Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk, pp. 543-554. *In* Vainio H., P. Magee ,D. McGregory A. McMichael (Eds.). *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. IARC Scientific Publications, Lyon.
- Sorsa, M. & J. Yager. 1987. Cytogenetic surveillance of occupational exposures, p. 345-360. *In* Obe, G. & A. Basler (eds.) *Cytogenetics. Basic and applied aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sorsa, M. 1984. Monitoring of sister chromatid exchange and micronuclei as biological endpoints, 339-349. *In* Berlin, A., M. Draper, K. Hemminki & H. Vainio (eds.). *Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents*. IARC Scientific Publications N° 59. Lyon.

- Soto, A., K. Chung & C. Sonnenschein. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphenon, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 102:380-383.
- Speit, G., S. Hanelt, R. Helbing, A. Seidel & A. Hartmann. 1996. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters.* 88:91-98.
- Steeland, K. 1996. Chronic neurological effects of organophosphate pesticides. *BMJ.* 312(25 May): 1312-1313.
- Surrallés, J., N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa & R. Marcos. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research.* 341:169-184.
- Sutou, S. 1996. Achievements by CSGMT/JEMS.MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutation Research.* 340:151-174.
- Tafazoli, M. & M. Kirsch-Volders. 1996. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. *Mutation Research.* 371:195-202.
- Tice, R. 1995. The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, p. 315-339. In Phillips, D. & S. Veritt (eds.) *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford.
- Tice, R. 1992. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (scg) assay to the detection of DNA damage in eukaryote cells. Cortesía del doctor Emilio Rojas del Castillo, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.

- Tice, R., G. Strauss & W. Peters. 1992. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer : preliminary assessments of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 271:101-113.
- Tice, R.R., Andrews, P.W. & N.P. Singh. 1990. The single cell assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair, pp. 157- 164. *In*: Sutherland B. M. & A. V. Woodhead (eds.) *Methods for the detection of DNA damage in Human cells*, Plenum Press, New York.
- Titenko-Holland, N., G. Windham, P. Kolachana, F. Reinisch, S. Parvatham, A.M. Osorio & M.T. Smith. 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research*. 388 : 85-95.
- Tucker, J.D. & R.J. Preston. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*. 365 : 147-159.
- Vainio, H., E. Matos & M. Kogevinas. 1994. Identification of occupational carcinogens, p.41-59. *In* Pearce, N., E. Matos, H. Vainio, P. Boffetta y M. Kogevinas (eds.). *Occupational cancer in developing countries*. IARC Scientific Publications, Lyon.
- Valverde, M. 1994. Estudio de una población expuesta a hidroarsenicismo crónico por medio de la técnica de electroforesis de células individuales (Técnica ensayo cometa). Tesis para obtener el grado de Biólogo. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F, México. 60 p.
- Vaquerano, B. 1995. Caracterización de la exposición dermal ocupacional a plaguicidas en una finca bananera en Costa Rica. 1995. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Salud Pública. Programa en Salud Pública, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José. 74p.

- Vega, S. e I. Maroto. 1984. Plaguicidas de uso restringido en Estados Unidos se importan libremente en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 5-6: 125-134.
- Vial, T., B. Nicolas & J. Descotes. 1996. Clinical immunotoxicity of pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 48:215-229.
- Vijayalaxmi, R. Tice & G. Strauss. 1992. Assesment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*. 271:243-252.
- Wesseling, C. 1997. Health effects from pesticides use in Costa Rica. An epidemiologic approach. Tesis. *Academisk avhandling som för avläggande av Medicine Docketorsexamen vid Karolinska Institutet . Stockholm.*
- Wesseling, C. 1992. Los plaguicidas: declaración ante el Senado de los Estados Unidos de América. *Ciencias Ambientales*. 9: 82-90.
- Wesseling, C., L. Castillo & C. Elinder. 1993. Pesticide poisonings in Costa Rica. *Scand. J. Work Environ. Health*. 19:227-235.
- Wuttke, K., C. Streffer & W.U. Müller. 1993. Radiation induced micronucleus in subpopulations of human lymphocytes. *Mutation Research*. 286: 181-188.

9. Estado civil (Encierre en un círculo):
Casado Soltero Divorciado Separado Viudo (a) Unión libre
10. Código del individuo _____ (Uso del investigador)

Historia de su presente y pasado ocupacional

11. ¿Trabaja actualmente?
__ Sí __ No

Si su respuesta es negativa; ¿Fecha en que dejó de trabajar?
(Pase a la pregunta 14)

12. ¿Cuál es el nombre de la compañía para la que trabaja **actualmente**? (Dirección completa, número de teléfono)

¿En qué año ingresó a trabajar a esta compañía?

¿Qué edad tenía cuando entró a trabajar a esta compañía?

13. ¿Por cuánto tiempo ha trabajado para esa compañía?

¿Qué tipo de trabajo **hace**?

Marque con una X

- Selectar
- Desflorar
- Panear
- Deshojar
- Empacar
- Sellar
- Pesar
- Rodajear
- Procesamiento de los frutos
- Quebrar puntales

- Abrir las bolsas que se le ponen a los racimos en el
- Quitar las bolsas de los racimos
- Curar semillas con agroquímicos (plaguicidas)
- Fumigar
- Llenar bidones con fertilizantes
- Preparar las mezclas de fertilizantes
- Regar abono (fertilizante)
- Regar cal
- Quitar la hierba
- Aseo:

- De la planta
- De las oficinas

Especifique: _____

- Limpiar cables
 - Lavar:
 - sombrillas
 - uniformes
 - mascarillas
 - guantes
 - pilas y convellos (fajas transportadoras)
 - otros: _____
 - Otros (especifique): _____
-

¿Rotan de tarea? Sí No

Si la respuesta es positiva, por favor indique el tiempo promedio que duran en cada tarea

14. ¿Para cuál compañía **trabajó anteriormente** (incluya la dirección y el número de teléfono) y por **cuánto tiempo**?

15. ¿Qué tipo de trabajo **hacía**?

Marque con una X

- Selectar
- Desflorar
- Panear Pila N°:
- Deshojar
- Empacar
- Sellar

- Pesar
- Rodajear
- Procesamiento de los frutos
- Quebrar puntales
- Abrir las bolsas que se le ponen a los racimos en el campo
- Quitar las bolsas de los racimos
- Curar semillas con agroquímicos (plaguicidas)
- Fumigar
- Llenar bidones con fertilizantes
- Preparar las mezclas de fertilizantes
- Regar abono (fertilizantes)
- Regar cal
- Quitar la hierba
- Aseo:
 - De la planta
 - De las oficinas

Especifique: _____

Limpiar cables

Lavar:

- sombrillas
- uniformes
- mascarillas
- guantes
- pilas y convellos (fajas transportadoras)
- otros: _____
- Otros (especifique): _____

¿Rotaban de tarea? Sí No

Si la respuesta es positiva, por favor indique el tiempo promedio que duraban en cada tarea

Historia de exposición

16. ¿Se ha visto expuesto a alguno de los siguientes cosas en su trabajo?

¿Cuándo fue su primera exposición? (mes/año)	¿Cuándo fue su última Exposición? (mes/año)	¿Cuánto tiempo en término de días, meses o años de ex- posición total?
---	--	--

Asbestos (Ricalit, Fibrolit)

Sí _____
 No _____

Productos
de carbón

Sí _____
 No _____

Polvo (co-
mo madera,
cuero, partículas
finas de metal)

Sí _____
 No _____

Plaguicidas

Sí _____
 No _____

Productos de

Petróleo (diésel, gasolina, búnker, canfín)

Sí _____
 No _____

Solventes (alcoholes, cloroformo, éter, xilol, benceno, xiner, aguarrás, etilen glicol)

Sí _____
 No _____

Otros químicos
(especifique en
la pregunta N° 17)

Sí _____
 No _____

17. Liste los nombres de algunas **sustancias (plaguicidas)**, que usted conoce y a las cuales ha estado expuesto por **inhalación o contacto directo en su trabajo** en el **último año** o dentro de los **últimos 10 años**.

En los últimos 12 meses:

¿Cuál es la frecuencia de exposición promedio por mes?

¿Dentro de los últimos 10 años?:

¿Cuál fue la frecuencia de exposición promedio por mes?

18. Por favor haga un listado de la historia de exposición química o física, durante el año pasado o durante los últimos 10 años; **mientras practica algún pasatiempo u otras actividades en su hogar y que no tengan relación con su trabajo**. Refiérase a la lista de la pregunta N° 16; pero no se limite a estas sustancias.

En los últimos 12 meses:

¿Cuál es la frecuencia de exposición promedio por mes?

¿Dentro de los últimos 10 años?:

¿Cuál fue la frecuencia de exposición promedio por mes?

Historial de fumado

19. ¿Usted ha fumado?

Sí No

Si usted no ha fumado pase a la pregunta N° 21.

Si usted fumó:

a. ¿Durante cuánto tiempo fumó? _____ años

b. ¿Continúa fumando?

Sí No

Si continúa fumando pase al punto 20 c, **si no**
¿cuándo dejó de fumar? (especifique el mes y el año)

Pase al punto 19 f.

c. ¿Cuánto tiempo tiene de fumar? _____

¿Acostumbra fumar cigarrillos?

Sí No

Si lo hace: ¿Cuántos paquetes fuma al día?

Menos de 1/2 paquete

1/2-1 paquete

Más de 1 paquete (indique cuántos paquetes fuma al día) _____

¿Fuma cigarrillos con filtro?

Sí No

¿Cuál es la marca que usualmente fuma?

d. ¿Acostumbra fumar cigarros/puros?

Sí No

Si lo hace: ¿Cuántos cigarros fuma al día?

1 cigarro

2-3 cigarros

4 ó más cigarros

e. ¿Acostumbra fumar pipa?

Sí No

Si lo hace: ¿Cuántas pipas fuma al día?

1 pipa

2-3 pipas

4 ó más pipas

f. ¿Qué fumaba en el pasado?

cigarrillos

cigarros/puros

pipa

g. ¿Acostumbra mascar tabaco?

Sí No

h. ¿Acostumbra usar tabaco en polvo/rapé?

Sí No

i. ¿Acostumbrar fumar marihuana?

Sí No

Historial médico

20. ¿Ha estado tomando medicamentos prescritos por un médico durante el año pasado? (por ejemplo, pastillas para la presión sanguínea, antibióticos, insulina, tranquilizantes, relajantes musculares)

Sí No

Tipo de medicamento	Dosis (mg)	Frecuencia/día	Período de tiempo

Nombre del médico o clínica donde le recetaron el medicamento (indicar el servicio que utilizaron, medicina general o algún servicio especializado)

21. ¿Ha tomado algún tipo de medicamento sin prescripción médica durante el año pasado? (por ejemplo, aspirinas, antiácidos, antihistaminas, sedantes, u otras drogas - cocaína, heroína, anfetaminas-)

Sí No

Tipo de medicamento Dosis (mg) Frecuencia/día Período de tiempo

22. ¿Ingiere o ha ingerido vitaminas en los últimos 6 meses ?

Sí No

Si es así, por favor indicar:

Clase de vitaminas Dosis Frecuencia semanal

23. a. ¿Utiliza gestageno oral (pastillas anticonceptivas)?

Sí No

b. Marca del anticonceptivo: _____

c. ¿Quién se las suministra?

CCSS Ministerio de Salud

Otro (Especifique) _____

d. ¿Qué edad tenía cuando inicio su consumo? _____

e. ¿Cuánto tiempo tiene de tomarlos? _____

24. a. ¿Ha tenido o tiene alguna de las siguientes enfermedades?

Cáncer Sí No

Hepatitis Sí No

Mononucleosis Sí No

Herpes Sí No

Sida	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Meningitis	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Infecciones bacterianas o virales	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Enfermedades cardiovasculares	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Diabetes	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Alergias	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Dermatitis	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No
Otras enfermedades	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No

b. Si es así, especifique qué tipo de enfermedad, cuándo estuvo usted enfermo, e indique el tratamiento.

Enfermedad	Período de la enfermedad (mes/meses del año y año)	Tratamiento
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Nombre del médico o clínica donde le diagnosticaron la enfermedad

c. Liste otras enfermedades y sus tratamientos, dentro de los últimos 12 meses (esto puede incluir resfríos, gripe).

Enfermedad	Período de la enfermedad (mes/meses del año y año)	Tratamiento
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

d. ¿Ha recibido alguna vacuna en los últimos 12 meses?

Sí No

Tipo de vacuna	Fecha de administración
_____	_____
_____	_____
_____	_____

e. ¿Le han hecho alguna vez una radiografía dental?

Sí No

Si la respuesta es positiva:

- El último mes
- En los últimos 6 meses
- En los últimos 6-12 meses
- Hace más de 1 año

f. Liste algún diagnóstico con rayos X o terapia de rayos X, además del dental, que usted haya recibido en los últimos 10 años.

Razón para rayos X	Año recibido	Clínica/Hospital
--------------------	--------------	------------------

g. ¿Le han realizado alguna operación durante el año pasado?

Sí No

Fecha	Motivo	Nombre de la clínica/hospital
-------	--------	-------------------------------

h. Proporcione los datos que recuerde de fiebre alta durante el año pasado

Fecha	Asociado con alguna enfermedad	Medicamentos ingeridos
-------	--------------------------------	------------------------

Historia nutricional (refleja solo los hábitos corrientes)

25. ¿Es estrictamente vegetariana?

Sí No

26. ¿Consume carne? Sí No

a. Si la respuesta es positiva, por favor conteste:

Diariamente/semanalmente

	1-2(veces)	3-4(veces)	5-6(veces)	Todos los días
Carne roja	—	—	—	—
Pescado	—	—	—	—
Pollo	—	—	—	—
Cerdo	—	—	—	—
Mariscos	—	—	—	—
Otro	—	—	—	—

b. ¿Consumes la carne roja cocida ?

Poco Medio Bien cocida

27. a. ¿Utiliza sacarina u otros endulzantes dietéticos?

Sí No

b. ¿Cuántas gotas o pastillas utiliza al día?

28. a. ¿Utiliza bebidas dietéticas?

Sí No

b. ¿Cuántas al día?

29. Haga comentarios sobre su dieta, que no hayan sido cubiertas en las preguntas anteriores, por ejemplo, **dieta especial alta en proteínas, baja en carbohidratos, etc.**

30. a. ¿Toma café?

Sí No Ocasionalmente

Negro Con leche/crema

b. Si ingiere café, ¿Cuántas tazas (vasos, jarros) al día?

c. ¿Qué marca consume?

d. ¿Toma café descafeinado?

Sí No

31. ¿Toma té?

Sí No Ocasionalmente

Negro Con leche/crema

b. Si ingiere té negro, ¿Cuántas tazas (vasos, jarros) al día?

32. ¿Toma cerveza?

Sí No Ocasionalmente

Si usted ingiere cerveza, por favor indique su promedio de consumo de cerveza semanal:

1-6 botellas o latas (12 onzas)

7-12 botellas

13-24 botellas

más de 24 botellas a la semana, si usted se encuentra en esta categoría, ¿cuál es su promedio de consumo de cerveza? ____ botellas o latas por semana.

b. ¿Usted toma guaro, ron u otros licores? (excluyendo cerveza)

Sí No Ocasionalmente

Si usted ingiere otro tipo de licor, por favor indique su promedio de consumo semanal:

1-4 tragos (1-0,5 onzas de licor)

5-8 tragos

9-16 tragos

más de 16 tragos a la semana, si usted se encuentra en esta categoría, ¿cuál es su promedio de consumo de otros licores? ____ tragos semanales.

33. ¿Usa regularmente sauna o toma baños calientes?

Sí No Ocasionalmente

¿Con qué frecuencia? _____

¿Ha tomado alguno recientemente? _____

Historial genético

34. ¿Usted está enterada de algún (os) defecto (s) de nacimiento, otros desórdenes genéticos o enfermedades hereditarias que afectan a sus padres, hermanos, hermanas, o a sus sobrinos?

Sí No

Si la respuesta es afirmativa, por favor especifique:

35. ¿Usted o su esposo han tenido problemas para concebir (por un período de al menos 12 meses) o ha sido diagnosticado como estéril?

Sí No

Si la respuesta es afirmativa, por favor especifique (indique cuándo experimento la dificultad, dónde y quién realizó el diagnóstico):

36. ¿Usted o su esposo han tenido algún hijo con defectos de nacimiento, otros desórdenes genéticos o enfermedades hereditarias?

Sí No

Si la respuesta es afirmativa, por favor especifique (indique cuándo y dónde nació el niño y cuál es la naturaleza del desorden):

37. ¿Usted o su esposo han tenido un hijo que haya nacido muerto, o que haya sido abortado espontáneamente?

Sí No

Número total de embarazos _____

Número de hijos nacidos vivos _____

Número de hijos nacidos muertos _____

Número de abortos espontáneos _____

Número de muertes infantiles _____ edad _____

Número de hijos vivos (no incluya niños adoptados, hijastros, ni niños que no vivan con usted) _____

38. ¿Tiene un hermano gemelo idéntico que esté vivo?

Sí No

39. ¿Algún familiar (padre, madre, hermanos, sobrinos, hijos) tiene o tuvo cáncer?

Sí No

Si la respuesta es afirmativa, por favor indique el tipo de cáncer y el parentesco con la persona afectada

40. Nombre, dirección y teléfono de algún pariente o amigo que pueda dar razón de usted, en el caso de que necesitemos localizarlo en el futuro y usted haya cambiado de domicilio.

Observaciones:

Lugar de la entrevista: _____

Encuestadora: _____

Nombre completo

Cédula : _____

Doy fe que he realizado esta encuesta y que no he alterado ni inducido las respuestas de la persona entrevistada.

Firma encuestadora

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
INISA/ESCUELA DE BIOLOGÍA**

En caso de que se deban tomar muestras posteriores, cada una debe tener la siguiente información.

Cód. indiv.: _____

Fecha: _____

Desde que se le tomó la última muestra:

1. ¿Ha estado en contacto con algún agente tóxico en su trabajo o en su hogar?

Sí No

Si la respuesta es afirmativa, por favor especifique:

2. Diga el número aproximado de cigarrillos, cigarrillos, o pipas que fuma diariamente.

cigarrillos _____ cigarrillos _____ pipas _____

3. La cantidad de alcohol que consume semanalmente:

4. La cantidad de saunas o baños calientes que toma semanalmente:

Fecha del baño más reciente : _____

5. Usted:

¿está embarazada? Sí No

¿ha tenido un hijo? Sí No

¿ha tenido un aborto espontáneo? Sí No

¿se ha malogrado el feto? Sí No

6. Dé los datos de enfermedades médicas, cirugías y medicamentos ingeridos. Incluya infecciones bacterianas o virales, influenza, dificultades urinarias, etc.

Enfermedad	Periodo de la enfermedad (mes/meses del año y año)	Tratamiento
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

7. Liste cualquier tipo de medicamentos ingeridos.

Tipo	Cantidad	Fecha de ingestión
Antibióticos	_____	_____
Antihistaminas	_____	_____
Vitaminas	_____	_____
Otras drogas	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Tomado con modificaciones de: Carrano, A.V. & A.T. Natarajan. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Research 204:379-406.

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
INISA/ESCUELA DE BIOLOGIA**

Fórmula de consentimiento informado

Fecha: _____
Día/mes/año

Yo: _____
Primer apellido Segundo apellido Nombre

Cédula: _____

Estoy de acuerdo en dar una muestra de sangre exclusivamente para efectos de investigación; con el fin de estudiar el efecto que la exposición ocupacional a plaguicidas pudiera tener sobre los cromosomas.

Firma: _____

91

APÉNDICE II
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
INISA/ESCUELA DE BIOLOGIA

Materiales

- Ácido acético (Sigma/A6283)
- Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma/A9414)
- Agarosa regular (Sigma/A6877)
- (bis Benzimide) Hoechst 33258 (Sigma/B2883)
- Citocalasina B (Sigma/C6762)
- DMSO Hibrimax (Sigma/D2650)
- EDTA (Sigma/E5134)
- Estreptomicina (Lakinter/233184)
- Fitohemaglutinina (Gibco forma M/10576-015)
- Giemsa (Sigma/G5637)
- Histopaque-1077 HibrimaxR (Sigma/H8889)
- KCL (Sigma/P5405)
- KH_2PO_4 (Merck/4873)
- Laurilsarcosinato (Sigma/L9150)
- L-glutamina (Gibco/21051-024)
- Metanol absoluto (Sigma/32,039-0)
- NaCl (Sigma/S3014)
- NaOH (Sigma/930-65)
- Penicilina (Biochemie/300771)
- RPMI 1640 (Gibco/31800-022)
- Suero fetal bovino certificado (Gibco/16000-028)
- Tris-base (Sigma/T6791)
- Wrigths (Merck/9278)

- Beakers, kitsatos, erlenmeyer, gradillas y otros (Sigma)
- Frascos de Coplin (Sigma)
- Guantes estériles (Sigma)
- Micropipetas Eppendorf (Sigma)
- Papel de filtro Whatman #4 y #50.
- Pipeteadores automáticos (Sigma)
- Pipetas Pasteur, bulbos, pinzas (Sigma)
- Pipetas serológicas (Sigma)
- Portaobjetos y cubreobjetos (Sigma)
- Puntas plásticas para micropipetas Eppendorf (Sigma)
- Tubos plásticos estériles de 15 ml para cultivos celulares (Sigma)
- Tubos Vacutainer de tapa verde (heparina de sodio) y agujas (Fisher)

Equipo de laboratorio

- Autoclaves
- Balanzas analíticas
- Baños María
- Cámara de electroforesis
- Cámara de flujo laminar para cultivo de tejidos
- Centrífugas
- Destilador de agua
- Extractor de aire
- Incubadoras
- Fuentes de poder
- Microscopio óptico y de epifluorescencia con cámara fotográfica incorporada
- Vortex

Otros

- Computador personal IBM compatible, procesador 586, 8MB ram
- Programas FPD26/FOXPRO, SIGMASCAN, paquete estadístico SPSS.
- Tabla digitalizada Summa Sketch

Ensayo de MICRONÚCLEOS.

Normalización del ensayo de micronúcleos en linfocitos bloqueados con citocalasina B.

Los linfocitos utilizados en el proceso de estandarización de este ensayo pertenecen a un donador saludable de sexo femenino, no fumadora, de 40 años de edad. La recolecta se hizo en tubos Vacutainer heparinizados. Se realizaron cultivos de sangre total utilizando el protocolo 1.

Protocolo 1 (Micronúcleos de linfocitos usando citocalasina B).

A) Fase I. Establecimiento de los cultivos

Añadir a cada tubo de 10 ml estéril:

4 ml de medio de cultivo RPMI 1640

1 ml de suero fetal bovino

100 ml de fitohemaglutinina

50 ml de L-glutamina

10 000 U/ml de penicilina

10⁴ µg/ml de estreptomycinina.

NaCO₃

1. Cada tubo de medio va a ser sembrado con 0,5 ml de sangre íntegra heparinizada.
2. Incubar los tubos a 37°C. Durante este período de incubación es conveniente agitar suavemente y con cierta regularidad los cultivos; con el fin de evitar que la sangre se coagule.
3. Agregar a cada tubo 37,5 µl de solución de trabajo de citocalasina-B (concentración final de 30 mg/ml), a las 44 horas de iniciado el cultivo. Incubar hasta completar 72 horas (Domínguez *et al.* 1993, Brunner *et al.* 1991, Lindholm *et al.* 1991, Fenech 1985a, 1985b, 1993a y b, Mäki-Paakkanen y Norppa, 1987).

Citocalasina-B (solución madre)

5 mg de citocalasina-B

2,5 ml de DMSO

Preparar la solución y colocar en alícuotas estériles, cubrir con papel aluminio y almacenar a - 70°C.

Citocalasina-B (solución de trabajo)

100 ml de solución madre de citocalasina-B

400 ml de solución salina

Preparar la solución antes de usar, y colocar en alícuotas estériles, cubrir con papel aluminio y almacenar a - 20°C.

B) Fase II. Fijación

1. Transcurrido el tiempo de incubación , agregar dos o tres gotas de fijador a cada cultivo y centrifugar los tubos a 1 000 r.p.m. durante 10 min.
2. Eliminar por aspiración parte del sobrenadante (dejando un volumen total de 3 ml).
3. Preparar el fijador: 3 volúmenes de metanol absoluto frío/1 volumen de ácido acético.
4. Resuspender el botón agitando suavemente la muestra. Añadir poco a poco el fijador hasta un volumen aproximado de 10 ml.
5. Colocar los tubos durante 20 minutos a 4°C.
6. Repetir la fijación tres veces (para un total de cuatro lavados).
7. Una vez fijados los linfocitos, se centrifugan a 1 000 r.p.m. y resuspenden en una pequeña cantidad de fijador, hasta obtener una suspensión turbia.
8. Gotear cinco preparaciones para cada tubo en portaobjetos limpios y fríos; a una distancia de 2-3 cm, y con una inclinación del portaobjetos de 45°.
9. Secar al aire. Envejecer en una estufa a 60°C durante una noche.

C. Fase III. Tinción

1. Preparar los colorantes:

Colorante 1: Wright (solución madre). Filtrar antes de usar, con papel Whatman #50.

Wright 0,25% p/v (solución madre)

2,5 g de Wright

1 000 ml de metanol absoluto

Filtrar con papel Whatman #4 y guardar en oscuridad durante 1 mes. Almacenar en botella ámbar.

Colorante 2: Solución 1/1 de Wright/agua destilada (Filtrar con papel Whatman #50).

Colorante 3: Solución de Giemsa al 2%.

Amortiguador Sorensen

2 g de KH_2PO_4 1M

2 g de NaHPO_4 0,5M

Diluir en 450 ml de agua destilada, ajustar el pH entre 6,9-7 y guardar a 4°C en una botella ámbar.

Giemsa (solución madre)

54 ml de glicerina

1 g de giemsa

84 ml de metanol absoluto

Calentar la glicerina a 64°C, agitando constantemente. Agregar el metanol y el Giemsa, seguir agitando. Filtrar con papel Whatman #4. Envasar en botella ámbar (volumen final :138 ml).

Giemsa (2%), pH 7,2 (Solución de trabajo)

5 ml de amortiguador Sorensen

2 ml de solución madre Giemsa (solución madre)

44 ml de agua destilada

Agregar a 44 ml de agua destilada 5 ml de amortiguador Sorensen, mezclar. Después mezclar con 2 ml de la solución madre de Giemsa. Filtrar con un papel Whatman #4. Preparar la solución inmediatamente antes de usar.

2. Teñir las preparaciones durante tres minutos en el colorante 1.
3. Lavar dos veces con agua destilada (el agua del segundo lavado, contiene unas gotas de alcohol; lo que ayuda a eliminar el exceso de colorante y el precipitado que se produce al contacto del tinte con el aire).
4. Poner las láminas en el colorante 2, durante dos minutos.
5. Repetir paso 3.
6. Colocar los portaobjetos en el colorante 3, por 10 minutos.
7. Repetir paso 3 (Modificado de Schmid 1975).
8. Secar al aire.
9. Envejecer una noche a temperatura ambiente y montar los portaobjetos con permounth. Dejarlos 12 horas antes de observarlos al microscopio óptico.

Crterios para el análisis de células binucleadas y micronúcleos.

I. Características de la célula:

- Las células deben ser binucleadas (las células mononucleadas, trinucleadas y tetranucleadas se omiten del análisis).
- Citoplasma intacto o semiintacto (no se contabilizan aquellas células que aparentemente son binucleadas, si no tienen citoplasma).
- Los dos núcleos principales deben ser de igual tamaño, de textura y color similar.
- Los núcleos principales pueden estar unidos entre ellos por un puente fino de cromatina o pueden estar ligeramente traslapados (siempre que pueda apreciarse perfectamente el contorno).

II. Características de los micronúcleos:

Un micronúcleo es contado si:

- Se encuentra dentro del citoplasma y tiene una estructura similar al núcleo principal.
- Tiene un diámetro entre $1/16$ y $1/3$ del tamaño de los núcleos principales.
- No es refringente.
- No puede superponerse al núcleo principal.
- De igual color que los núcleos o un poco más tenue.
- El color y los bordes del micronúcleo no deben cambiar durante el enfoque.
- La forma principal de los micronúcleos es redonda, pero a veces es oval, en forma de anillo o de almendra (Fenech 1993a, Högsted 1984, Pincu *et al.* 1984).

Además se cuentan los broken-eggs, que se observan como un micronúcleo unido a uno de los núcleos principales.

Ensayo cometa

Normalización del ensayo cometa.

Las células únicas utilizadas en el proceso de estandarización del ensayo cometa, pertenecen a un donador saludable de sexo femenino, no fumadora, de 40 años de edad. La recolecta se hizo en tubos Vacutainer heparinizados. Una vez separados los linfocitos, se tomaron 30 μ l de estos, se colocaron en medio RPMI1640 sin suplementar dentro de tubos Eppendorff y se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

Exposición a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

Las células se sometieron *in vitro* a un tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 , compuesto que induce daño al ADN al ser evaluado mediante este sistema (Fairbairn *et al.* 1995, Tice 1995, McKelvey-Martin *et al.* 1993, Singh *et al.* 1988). Se trabajó siguiendo los protocolos utilizados por Valverde 1994, Tice 1992 y Singh *et al.* 1988; de manera que las células se expusieron durante una hora - a temperatura ambiente- a diferentes concentraciones de H_2O_2 (0, 25, 50, 75, 100 y 200 mM de H_2O_2).

Protocolo 2 (Electroforesis de células únicas).

Fase I. Preparación de las células blancas.

Separación de las células blancas.

1. Prepara 1 tubo estéril con 7 ml de PBS.
2. Agregar a cada tubo 7 ml de sangre heparinizada. Agitar suavemente.
3. Preparar el doble de tubos, cada uno con 3,5 ml de medio de separación.
4. Agregar cuidadosamente 5 ml de la sangre diluida en el punto 2 a los tubos preparados en el paso anterior.
5. Centrifugar 30 minutos a 1 300 r.p.m.
6. Alistar 8 tubos (4 tubos/caso) con 5,6 ml de medio de cultivo con el pH ajustado, para lavar las células separadas.
7. Centrifugar y descartar el sobrenadante.

8. Preparar 12 ml de medio (1,5 ml por ampolla) :

1,2 ml de suero fetal bovino (10%)

1,2 ml de DMSO (10%)

9,6 ml de medio con glutamina y antibióticos (10 000 U/ml de penicilina y 10^4 μ g/ml de estreptomicina).

9. Al botón de células que quedó en el punto 7, agregar 1,5 ml del medio preparado en el punto 8. Resuspender y depositar en ampollas criogénicas.

10. Dejar las ampollas 2 horas a 4°C y pasar a - 20°C ; 2 horas después dejar las células a -70°C. Al día siguiente se pasan las ampollas al tanque de nitrógeno líquido.

Preparación de las células blancas.

El día que se realiza el ensayo se descongelan rápidamente las alícuotas a analizar de la siguiente manera:

1. Sacar la alícuota (debidamente codificada) del tanque de nitrógeno líquido y colocar en agua a 37°C. Durante el tiempo que tome la muestra en descongelarse. Agitar suavemente.

2. Colocar la muestra en un tubo con 5 ml de medio de cultivo. Centrifugar y descartar el sobrenadante.

3. Repetir el paso 2. Dejar una pequeña cantidad de sobrenadante y resuspender el botón. Por cada portaobjetos que se prepara, utilizar 10 μ L de esta suspensión.

Fase II. Preparación de la muestra.

Preparación de los portaobjetos.

La preparación de los portaobjetos se realizó mediante la técnica utilizada por Lebailly *et al.* 1997, Valverde 1994 y Singh *et al.* 1988, con pequeñas modificaciones.

1. Se sumergen los portaobjetos en una solución caliente de agarosa al 1 %, se dejan solidificar un poco a temperatura ambiente y luego se colocan en la estufa a 60°C una noche.

PBS, pH: 7,4 (solución de trabajo)

NaCl

8 g

KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	0,29 g
KCl	0,20 g
H ₂ O destilada	1000 ml

Mezclar, almacenar en un frasco a 4°C. Es importante que esta solución este libre de magnesio y calcio, para evitar daños adicionales a la hebra sencilla del ADN.

Agarosa normal (1 %)

Agarosa normal	1 g
PBS, pH: 7,4 (libre de magnesio y calcio)	100 ml

Colocar en un erlemeyer, mezclar un poco, llevar a ebullición (aproximadamente 40 segundos en el horno de microondas), mezclar y almacenar en frascos de vidrios resistentes a los cambios bruscos de temperatura, mantener a 4°C.

PBS, pH: 7,4

2. Adicionar 75 µl de la mezcla de sangre total y agarosa de bajo punto de fusión (10 µl sangre total + 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión), a la lámina preparada el día anterior. Cubrir con un cubreobjetos y dejar enfriar a 4°C durante 10 minutos.

Agarosa de bajo punto de fusión (0,75%)

Agarosa de bajo punto de fusión	0,1875 g
PBS, pH: 7,4 (libre de magnesio y calcio)	25 ml

Colocar en un erlemeyer, mezclar un poco, llevar a ebullición (aproximadamente 30 segundos en el horno de microondas), mezclar y almacenar en pequeñas cantidades en frascos de vidrios resistentes a los cambios bruscos de temperatura, mantener a 4°C.

3. Adicionar 75 µl agarosa de bajo punto de fusión colocar un cubreobjetos y dejar enfriar a 4°C durante 10 minutos.

4. Cuando la agarosa se solidifica, sumergir los portaobjetos por lo menos durante una hora en solución de lisis a 4°C. Los portaobjetos en la solución de lisis deben almacenarse protegidos de la luz blanca, para lo cual se cubren los recipientes con papel aluminio.

*Solución de lisis madre.**NaCl*

NaCl	146,10g	73,05 g	36,52 g
Na ₂ EDTA	37,20 g	18,60g	9,30 g
Tris	1,20 g	0,60 g	0,30 g
Na lauril sarcocinato	10 g	5 g	2,50 g
H ₂ O destilada	1000 ml	500 ml	250 ml

Comenzar con 890 ml de agua destilada, y llevar a 1000 ml. Ajustar el pH a 10 con NaOH en hojuelas (Usar aproximadamente 37 hojuelas). Almacenar en botella ámbar a temperatura ambiente.

Solución de lisis de trabajo.

Solución de lisis madre	44 ml	88 ml	132 ml
Tritón X-100	1 ml	2 ml	3 ml
DMSO	5 ml	10 ml	15 ml

El DMSO permite almacenar las muestras en dicha solución durante meses.

Preparar la solución con 30-60 minutos de anticipación, colocar en un recipiente cubierto con papel aluminio y dejarla enfriar a 4°C. Las muestras deben permanecer en solución de lisis un mínimo de 1 hora.

Fase III. Electroforesis.*Electroforesis.*

Nota : Los procesos de desenrollamiento y electroforesis son llevados a cabo en un cuarto oscuro usando una luz roja, con el fin de no inducir un mayor daño a las células únicas, debido a la exposición a la luz de blanca (nm).

1. Se colocan los portaobjetos en una caja de electroforesis horizontal (que se encuentra dentro de una bandeja con hielo y sal, para mantener la temperatura a 4°C) y se cubre 2,50 cm aproximadamente con el amortiguador de electroforesis, se deja durante 20 minutos. Posteriormente se corren los geles durante 20 minutos, bajo las siguientes condiciones: 300 mA/ 25V.

*Amortiguador de electroforesis.**Soluciones madres*1. NaOH 10 N

NaOH	200 g	100 g	40 g
H ₂ Odestilada	500 ml	250 ml	100 ml

Almacenar en una botella ámbar a temperatura ambiente, máximo 2 semanas.

2. EDTA 200 mM

EDTA	14,89 g	7,45 g	3,73 g
H ₂ Odestilada	200 ml	100 ml	50 ml

Ajustar el pH a 10

Almacenar en una botella ámbar a temperatura ambiente, máximo 2 semanas.

Amortiguador de electroforesis de trabajo (pH 13)

NaOH (300 mM) 12 g ó 30 ml de NaOH (10 N).

EDTA (1 mM) 0,37 g ó 5 ml de EDTA (200 mM).

Llevar a un litro, ajustar el pH en 13 mezclar bien y enfriar a 4°C, antes de usar.

Preparar la solución cada vez que se vayan a correr los microgeles.

Nota: Poner a enfriar el agua destilada que se va a utilizar en su preparación, el día anterior. Preparar la solución 2 horas antes de usar y ponerla a enfriar.

2. Se hacen tres lavados de 5 minutos con amortiguador de neutralización.

Amortiguador de neutralización (pH 7,5).

Tris	48,50 g	24,25 g	12,13 g
H ₂ Odestilada	1000 ml	500 ml	250 ml

Ajustar el pH a 7,5

Almacenar a temperatura ambiente, en una botella ámbar.

3. Se tiñen con 50 µL de hoechst 33258 (50 mg/ml). Colocar un cubreobjetos y guardar en una cámara húmeda a 4°C.

Solución madre de Hoechst (150 mg/ml)

15 mg de Hoechst

100 ml de agua destilada

Almacenar a - 20°C, protegido de la luz.

Solución de trabajo de Hoechst (50 mg/ml)

1 ml de la solución madre de Hoechst (150 mg/ml)

2 ml de agua destilada

Se mezcla y se coloca en un recipiente protegido de la luz.

La muestra debe visualizarse en el microscopio de epifluorescencia lo antes posible; de preferencia en las siguientes 24 h. Hasta un máximo de 72 h.

Requerimientos para el análisis de las electroforesis de células únicas.

Para la observación de las preparaciones teñidas con hoechst, se utilizó un microscopio de epifluorescencia equipado con :

- Filtro de excitación de 340-380 nm
- Bombilla de mercurio de 100W
- Filtro de barrera de 430 nm
- Cámara fotográfica acoplada al microscopio.

Las fotografías se tomaron con el lente de 25 X. Las células en el negativo están aumentadas 80 veces. Valor que corresponde a la siguiente conversión:

A. O. del microscopio X Factor del tubo X Ajuste del Oc. X A. O. de la cámara.

A : Aumento

O: Objetivo

Oc : Ocular

El análisis de las rupturas del ADN, se lleva a cabo ampliando cinco veces el negativo fotográfico y midiendo en la imagen proyectada, la longitud de la célula, desde el extremo del núcleo hasta el punto más lejano que constituye la cometa, utilizando una tabla digitalizada Summa Sketch, los datos se almacenan en el programa SIGMASCAN.

APÉNDICE III

Cuadro 20: Efectos genéticos de algunos plaguicidas.

Plaguicida	Familia	Efecto	Referencia
Mezcla	Organofosforados y carbamatos	Incrementan los cromosomas en anillo y cromosomas dicéntricos; aumentan los intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en 14 (N=27) personas con síntomas de intoxicación crónica.	Maroni y Fait 1993
benomil	Benzimidazol	Aumenta moderablemente los ICH ($p=0,055$), en linfocitos humanos, dosis 0,5 mg/ml. Induce aneuploidías y aberraciones cromosómicas.	Dolara <i>et al.</i> 1992
benomil	Benzimidazol	Reacciona con la β -tubulina, afectando el funcionamiento del aparato mitótico de levaduras y células de mamíferos. Se manifiesta como una separación cromatídica.	Atwal y Sandhu 1985, Zelesco <i>et al.</i> 1990, Albertini 1991, Cummings <i>et al.</i> 1992 citados por Dolara <i>et al.</i> 1994.
cipermetrina, deltametrina, fenpropatina	Piretroides	Incrementan ligeramente el número de micronúcleos en cultivos de linfocitos de sangre total o en linfocitos humanos aislados.	Surrallés <i>et al.</i> 1995
fenvalerato, permetrina	Piretroides	Tienen un efecto nulo en el número de micronúcleos en cultivos de linfocitos de sangre	Surrallés <i>et al.</i> 1995

alaclor, hidrazida paraquat, trifluralina	atrazina, maleico,	total o en linfocitos humanos aislados. Incrementan el largo de la cola del cometa, en estudios <i>in vitro</i> ; de manera que se trata de compuestos genotóxicos.	Ribas <i>et al.</i> 1995
atrazina		Induce aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos.	Meisner <i>et al.</i> 1992, citado por Ribas <i>et al.</i> 1995
Mezcla	Organofosforados, carbamatos, piretroides	Incrementan la frecuencia de micronúcleos en 71 (N=146) floriculturistas de la región oeste de Liguria (Italia).	Bolognesi <i>et al.</i> 1993
Mezcla no especificada		Incrementan la frecuencia de aberraciones cromosómicas en trabajadores agroquímicos de la región de Békés (Hungría).	Nehéz y Dési. 1996
tiabendazol	imidazol	Aumenta la frecuencia de micronúcleos en células de médulas óseas de ratones (dosis: 50, 100 y 200 mg/kg). Aumento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (dosis: 200 mg/kg), células de médula ósea de ratón.	Mudry de Pargament <i>et al.</i> 1987
clorpirifós	Organofosforado	Aumenta el porcentaje de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratón.	Amer y Fahmy 1982
tetraclorvinfós, clorpirifós	Organofosforados	Aumentan las aberraciones cromosómicas y de intercambio de cromátidas hermanas en cultivo	Amer y Aly. 1992

benomil	Benzimidazol	<i>in vitro</i> de células de bazo en ratones. En ratas induce aberraciones cromosómicas numéricas.	Anónimo. 1993b.
carbofurán	Carbamato	Aumenta las aberraciones cromosómicas en ratas.	Rufini <i>et al.</i> s.f.
oxamil	Carbamato	Aumenta de manera altamente significativa los ICH ($p=0,001$) en linfocitos humanos, dosis 10^4M	Rufini <i>et al.</i> s.f.