

## Daño del ADN en trabajadoras bananeras expuestas a plaguicidas en Limón, Costa Rica

Vanessa Ramírez y Patricia Cuenca

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica. Fax:506 207 5130.  
corel: pcuenca@cariari.ucr.ac.cr

Recibido 07-III-2001. Corregido 05-IV-2002. Aceptado 05-V-2002.

**Abstract:** Pesticide use in Costa Rica is very high and all year round. A high percentage of what is sprayed remains in the environment and in the living organisms around. This situation brings contamination and health problems to people in contact with them. The onset of adverse effects may be in the short or the long term, and symptoms vary widely, from headaches to cancer. Much research in this area has been devoted to acute or chronic effects, and not until recently to the genotoxic effect of pesticides. This study evaluated the genotoxic effect of pesticides used in banana packing activities, using the comet assay (single cell electrophoresis) as the biological marker in lymphocytes. This was a case-control double blind study of 30 exposed women from 15 banana farms and 28 women not occupationally exposed to pesticides from the same geographic area. Results show damage to single stranded DNA after working from 5 to 15 years ( $R^2=0.12$ ). In Costa Rica we do not have an historical record of the kind of pesticides used in banana farms, the period of time and for how long were they used. This prevented further analysis concerning dose, frequency of exposure and use of new or old kind of pesticides in the farms in relation to DNA damage. The comet assay is of value in the genetic monitoring of pesticide exposed populations.

**Key words:** Single cell electrophoresis, pesticides, human populations, lymphocytes, biomonitoring, Costa Rica, banana plantations, female farmers, DNA.

### INTRODUCCIÓN

Los cambios en las prácticas agrícolas han incrementado drásticamente el uso de plaguicidas en los últimos 30 años. A pesar de los beneficios que ellos proporcionan, es reconocido que su uso acarrea una serie de efectos indeseables en la salud humana y en el ambiente (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt 1996, García 1997).

El uso de productos agroquímicos es la causa de numerosas intoxicaciones mortales o incapacitantes en todo el orbe y constituyen un gran problema de salud pública en los países pobres (Hilje *et al.* 1987, McConnell y Hruska 1993, Kogevinas *et al.* 1994, Steenland 1996). Los efectos de estos sobre la salud humana pueden ser a corto plazo : intoxicaciones sistémicas agudas o crónicas (Hilje *et al.* 1987,

Wesseling 1997) o a largo plazo : cáncer, malformaciones congénitas, esterilidad y abortos (Jaffery y Viswanathan 1986, Saracci *et al.* 1991, Brouwer *et al.* 1994, McDuffie 1994, Sherman 1995, 1996, Vial *et al.* 1996).

Con relación al cáncer, existen estudios epidemiológicos que muestran una evidencia positiva (exceso en la incidencia y mortalidad) entre la exposición ocupacional a plaguicidas y algunos tipos de cánceres, principalmente, sarcoma del tejido blando, linfomas malignos (linfoma no-Hodgkin y enfermedad de Hodgkin), mieloma múltiple, leucemia, cáncer de piel y otros (Saracci *et al.* 1991, Browner *et al.* 1994, McDuffie 1994, Soto *et al.* 1994, Sherman 1995, 1996, Vial *et al.* 1996, Dich *et al.* 1997, Wesseling 1997). Sin embargo, estudios similares no han encontrado dicha asociación

(Maroni y Fait 1993, Vial *et al.* 1996, Dich *et al.* 1997), por lo cual, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) considera inadecuadas las evidencias para clasificar a la mayoría de los plaguicidas como carcinógenos, con excepción de los compuestos arsenicales, clasificados como carcinógenos para el hombre (clase 1); el fungicida captafol y los insecticidas en aerosol, clasificados como probables carcinógenos (clase 2A) (Vainio *et al.* 1994, Wesseling 1997).

En 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 para mantener un sistema adecuado de vigilancia epidemiológica.

En Costa Rica, durante la década del setenta, la exposición ocupacional al nematicida 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP) causó esterilidad en trabajadores bananeros de la zona de Río Frío (Ramírez y Ramírez 1980, Maroni y Fait 1993). Estudios posteriores realizados en plantaciones bananeras costarricenses muestran un incremento en la tasa de incidencia estandarizada para melanoma y cáncer de pene en hombres, así como para cáncer de cervix y leucemia en las mujeres. Sin embargo, la autora considera que estos resultados representan una subvaloración de la realidad, debido a las deficiencias en las fuentes que sirvieron de base para la investigación (Wesseling 1999). Debido a estos antecedentes, es importante hacer estudios sobre el efecto que los plaguicidas pueden tener sobre el ADN humano, ya que el daño acumulado a largo plazo aumenta el riesgo de tener hijos con malformaciones congénitas o el riesgo de padecer cáncer.

El uso de marcadores biológicos en estas poblaciones permite saber si aumenta su riesgo de padecer cáncer debido al uso de estos productos. Actualmente están disponibles varios marcadores biológicos para evaluar los efectos genotóxicos transitorios y permanentes. Se basan, principalmente, en métodos citogenéticos como intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y frecuencia de micronúcleos. Además, Peluso y colaboradores han demostrado que la exposición ocupacional

a plaguicidas produce un incremento en los niveles de aductos de ADN en sangre total de floricultores (Lebailly *et al.* 1997).

En la última década del siglo XX se desarrolló una técnica rápida, simple, visual y sensible, conocida como electroforesis de células únicas o ensayo cometa, que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células eucariotas. Bajo condiciones alcalinas (pH >13) es capaz de detectar rupturas de hebra sencilla y lesiones álcali-lábiles en el ADN de las células (Kassie *et al.* 2000).

La técnica requiere de muestras pequeñas de células en suspensión (de 1 a 10 000) y los resultados se obtienen en un día (Tice *et al.* 1990, 1992, Vijayalaxmi *et al.* 1992, McKelvey-Martin *et al.* 1993, Tice 1995), por lo que es un método con gran aplicación en el tamizaje de poblaciones grandes (Ross *et al.* 1995, Collins *et al.* 1995, 1997). Ha sido utilizada para evaluar el daño en el ADN en poblaciones expuestas a radiaciones ionizantes, fumadores, quimioterapia, ozono y arsénico, así como en trabajadores expuestos a plaguicidas (Lebailly *et al.* 1997) y pacientes con cáncer (Vaghef *et al.* 1997, Frenzilli *et al.* 1998, Kassie *et al.* 2000). También se ha usado para evaluar el efecto de mutágenos ambientales, clastógenos y otras sustancias que inducen daño al ADN (Sardas *et al.* 1995, Speit *et al.* 1996). Con protocolos adaptados sirve para estudiar la eficacia de los mecanismos de reparación por escisión y apoptosis (Green *et al.* 1992, Hartmann *et al.* 1994, Valverde 1994).

En esta investigación se utilizó el ensayo cometa o electroforesis de células únicas como marcador de la genotoxicidad en un grupo de mujeres expuestas a plaguicidas y en otro de no expuestas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población en estudio:** se estudiaron 30 mujeres expuestas a plaguicidas y 28 no expuestas, con edades entre los 16 y 57 años,

procedentes de Pococí (Limón, Costa Rica). Todas las personas que participaron firmaron un consentimiento informado y respondieron un cuestionario estandarizado, probado en el campo y ajustado para nuestra población, tomando en cuenta las recomendaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud (Anónimo 1985, Carrano y Natarajan 1988). El grupo expuesto está formado por 30 mujeres que han laborando en una planta empacadora de banano por un lapso mínimo de cuatro meses, en 15 compañías bananeras del lugar, quienes están en contacto principalmente, con los fungicidas postcosecha imazalil (84 ml/100 l de agua) y tiabendazol (22-28 ml/100 l de agua), durante el proceso de selección, atomización y sellado de la fruta antes de colocarla en las cajas para su exportación. Además tienen contacto con el insecticida organofosforado clorpirifós (0,5 a 2%), el cual se encuentra impregnado en las bolsas con las que se cubre el banano en el campo. La exposición al clorpirifós ocurre semanalmente en 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. Fueron excluidas de la muestra las mujeres que hubieran estado en tratamiento con quimioterapia o radioterapia.

Las no expuestas corresponden a un grupo de 28 mujeres voluntarias (oficinistas, personal de nutrición, de archivos del hospital y madres que llevaron a sus hijos a control del niño sano en el Centro de Salud) 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 e ingesta de drogas (Anónimo 1985, Carrano y Natarajan 1988).

**Recolección de muestras:** las muestras se tomaron entre enero y junio de 1996 y enero y junio de 1997. Se estima que la intensidad de la exposición es similar durante todo el año, debido a que la producción de banano es permanente. 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 Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica. La sangre fue tratada con His-topaque 1077, con el fin de aislar linfocitos, los cuales fueron criogenizados y mantenidos en un tanque de nitrógeno líquido hasta su posterior utilización. El medio de cultivo, el suero y los reactivos fueron de un mismo lote, como lo recomienda la OMS (Anónimo 1985).

**Ensayo de electroforesis de células únicas:** se realizó mediante la técnica utilizada por Singh *et al.* 1988, Valverde 1994, Fairbairn *et al.* 1995 y Lebuilly *et al.* 1997, con modificaciones (Ramírez 1998).

**Análisis de las preparaciones:** las preparaciones teñidas se observaron en las siguientes 72 horas, en 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 con el objetivo de 25X, usando una cámara (WILD MPS46/52) acoplada al microscopio. Se usó película Ilford de 35 mm, ASA 400, en blanco y negro. Posteriormente se midió la migración del ADN (mm) 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 ADN (McKelvey-Martin *et al.* 1993), ver Fig. 1.

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). Las mediciones se realizaron a doble ciego.

**Análisis estadísticos:** el análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS (Norusis 1990 a, b). Se comparó el grupo de mujeres expuestas con el de las no expuestas, en relación al comportamiento de cada una de las variables de la encuesta, usando un análisis de varianza univariado. Posteriormente, se aplicó una t de Student para comparar el daño en la hebra sencilla del ADN entre

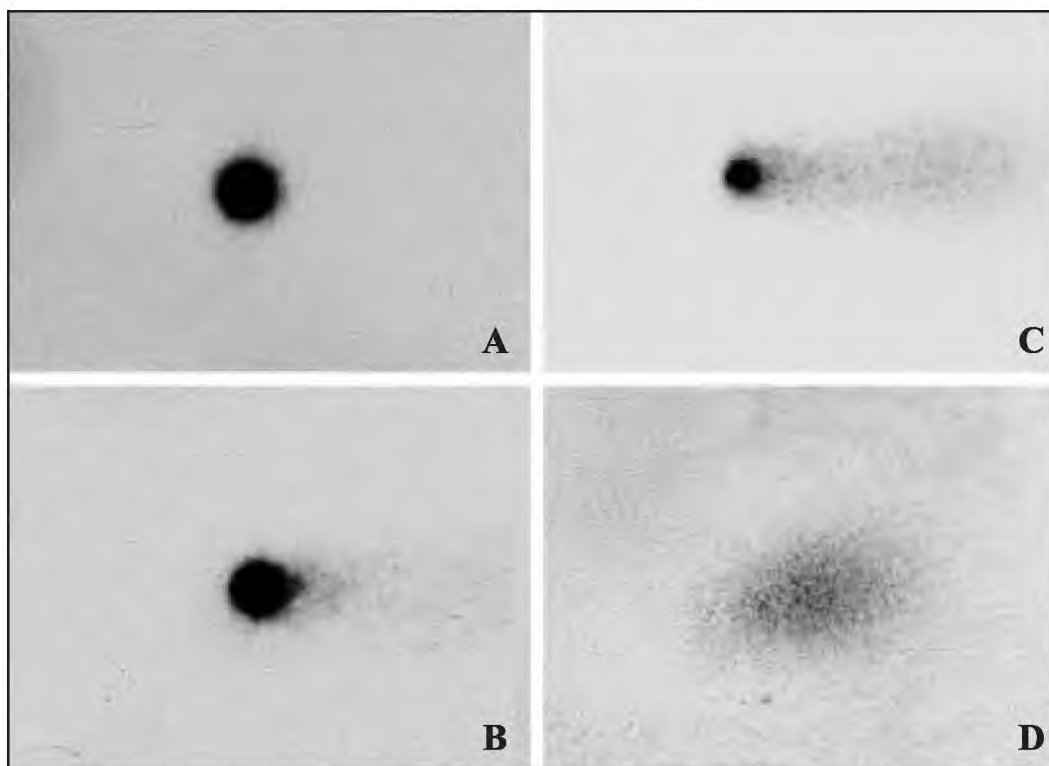


Fig. 1. En el ensayo cometa la migración del ADN es proporcional al daño (1 cm en la figura =  $30\mu$ ). A. ADN íntegro. B y C. ADN dañado. D. ADN extremadamente dañado (excluido del análisis).

Fig. 1. The comet assay shows larger migration of DNA as the damage increases. A. Normal DNA. B and C. damaged DNA. C. extremely damaged DNA (excluded from analysis).

ambos grupos. 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.

La exposición y la edad fueron recodificadas para facilitar el manejo de los datos en las pruebas de estadística multivariada y tener un patrón fijo de comparación. De esta forma : Edad 1 corresponde a mujeres con más de 35 años. Edad 2: mujeres entre 25 y 35 años. Edad de referencia: mujeres menores de 25 años. 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. El análisis de los datos se hizo apareando

a las mujeres por edad, con una diferencia de +/- dos años.

## RESULTADOS

En relación a las variables estudiadas mediante entrevista, que podrían interferir con la interpretación de los datos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados para la mayoría de las variables, tales como: edad, fumado, enfermedades infecciosas y rayos X. Sin embargo, el grupo de mujeres expuestas presenta una mayor cantidad de radiografías dentales ( $p < 0,01$ ). Ver cuadro 1.

En el Cuadro 2 se presentan los promedios de la migración del ADN por categoría de

CUADRO 1

*Comparación de algunas de las variables estudiadas mediante una entrevista aplicada a mujeres expuestas y no expuestas a plaguicidas . Análisis de varianza univariado*

TABLE 1

*Comparison of some of the variables studied through the interview to pesticides exposed and to control women. Univariate variance analysis*

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)
Dermatitis	7 (23,3)	23 (76,7)	4 (14,3)	24 (85,7)
E. cardiovasculares	10 (33,3)	20 (66,7)	6 (21,4)	22 (78,6)
Infec. virales o bacterianas	13 (43,3)	17 (56,7)	14 (50,0)	14 (50,0)
Fiebre último año	15 (50,0)	15 (50,0)	9 (32,1)	19 (67,9)
Operación último año	3 (10,0)	27 (90,0)	0 (0,0)	28 (100,0)
Antec Fam Malformaciones	8 (26,7)	22 (73,3)	10 (35,7)	18 (64,3)
Hijos con Malformaciones	4 (13,3)	26 (86,7)	2 (7,1)	26 (92,9)
Abortos /Mortinatos	6 (20,0)	24 (80,0)	4 (14,3)	24 (85,7)
Radiografías dentales	1 (3,3)	29 (96,7)	8 (28,6)	20 (71,4), p< 0,01
Rayos X	14 (46,7)	16 (53,3)	14 (50,0)	14 (50,0)
Ingesta alcohol: Cerveza	10 (33,3)	20 (66,7)	7 (25,0)	21 (75,0)
Ingesta alcohol: Licores	3 (10,0)	27 (90,0)	5 (17,9)	23 (82,1)
Café	27 (90,0)	3 (10,0)	21 (75,0)	7 (25,0)
Fumado	6 (20,0)	24 (80,0)	4 (14,3)	24 (85,7)
Automedicación	22 (73,3)	8 (26,7)	17 (60,7)	11 (39,3)
Medicamentos con receta	12 (40,0)	18 (60,0)	12 (42,9)	16 (57,1)

CUADRO 2

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

TABLE 2

*Mean DNA migration distances (m) or longitude of the comet's tail, according to time of exposure (months)*

	Grupo total n = 58		1-60 n = 30		61-120 n = 8		121-180 n = 6		más de 181 n = 6	
	e.*	n.e.**	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.	e.	n.e.
Edad promedio (años)	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

\*e.= mujeres expuestas laboralmente a plaguicidas

\*\*n.e.= mujeres no expuestas laboralmente a plaguicidas

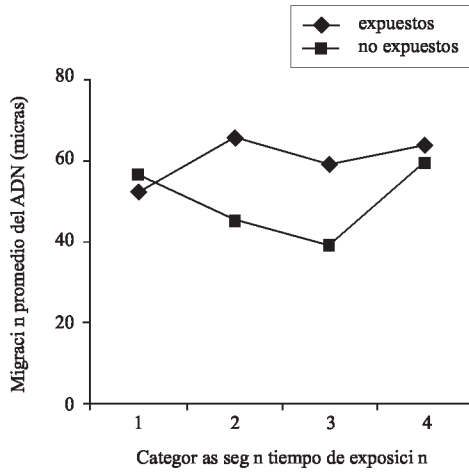


Fig. 2: Migración del ADN en una población de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas.

Fig. 2: DNA migration (comet assay) in a group of women occupationally exposed to pesticides.

exposición. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la migración promedio del ADN entre las expuestas y las no expuestas. Al analizar los valores de la migración promedio del ADN por grupo, según tiempo trabajado, existe una tendencia a aumentar el tamaño de la cola a partir de los 5 años (Fig. 2), que se mantiene hasta los 15 años de exposición. Esta tendencia se reafirma con el análisis de regresión lineal múltiple (Cuadro 3), a través

del cual se encontró una relación lineal entre el tiempo de exposición a plaguicidas y el daño al ADN. Sin embargo, esta relación lineal desaparece en el grupo con más de 15 años de trabajar en la planta empacadora.

Al analizar las variables que influyen en la migración del ADN mediante la regresión lineal múltiple, puede observarse que en las mujeres expuestas existe influencia de la exposición, el fumado, las enfermedades cardiovasculares, el uso de anticonceptivos orales y las alergias ( $R$  múltiple: 0.46260,  $R^2$  ajustada: 0.19464,  $F$ : <0.0001). En el caso de las no expuestas, la migración del ADN tiene una relación lineal con factores tales como las alergias y el fumado ( $R$  múltiple: 0.46140,  $R^2$  ajustada: 0.17758,  $F$ : <0.0001).

Cuando se estudian las variables que influyen en la migración del ADN en cada grupo por tiempo de exposición, se encuentra que en las categorías 1 y 4 la exposición a plaguicidas no es significativa.

En el grupo de exposición 2 (de 61 a 120 meses), las variables que tienen una relación lineal con la migración del ADN son: exposición a plaguicidas 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.

### CUADRO 3

*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)*

TABLE 3  
*Damage to single stranded DNA. Multiple linear regression analysis of exposure to pesticides (N=1250 cells, 625 exposed cells and 625 unexposed cells)*

Categoría	Tiempo de exposición (meses)	Coefficiente de regresión estandarizado ( $\beta$ )	Significancia (t-Student)	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	ANDEVA (F)	Significancia (F)
1	0-60 (n=750)	1.6630	0.4210	0.00087	0.64831	0.4210
2	61-120 (n=200)	20.429	<0.0001	0.12068	27.17462	<0.0001
3	121-180 (n=150)	19.512	<0.0001	0.12970	22.05699	<0.0001
4	>180(n=150)	4.3060	0.3808	0.00519	0.77270	0.3808

En el grupo de exposición 3 (de 121 a 180 meses), la ecuación tiene un ajuste de 41%; las variables que tienen un comportamiento importante son edad 2 (de 25 a 35 años) y exposición a plaguicidas. La edad tiene una relación inversa con la migración del ADN, mientras que la exposición mantiene una relación lineal directa con la migración del mismo.

## DISCUSIÓN

El ensayo cometa se viene utilizando desde finales de los años ochenta para evaluar genotoxicidad en poblaciones expuestas a diversos agentes físicos y químicos.

En el presente estudio se observa que las mujeres que tienen entre cinco y quince años de trabajar en plantas empacadoras de banano tienen más dañado el material genético que las mujeres no expuestas. 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. En el grupo de la categoría 4, con más de 15 años de laborar, el análisis señala que el daño encontrado no se puede atribuir a la exposición a plaguicidas. Este hecho podría tener su explicación en un fenómeno conocido en salud ocupacional, y es que en los ambientes laborales el personal se va seleccionando a través del tiempo, de tal manera que al final permanecen los más sanos o resistentes a un tipo de trabajo particular (Sierra-Torres *et al.* 1998). En el caso concreto de esta investigación, se observó que en las empacadoras de banano prevalece la mano de obra joven. Además, hubo trabajadoras con más de quince años de laborar, que no se pudieron incluir en el estudio porque habían sufrido la extirpación de algún tumor y habían estado sometidas a quimioterapia y/o radioterapia. Esto redujo el número de mujeres para la categoría cuatro.

La fragmentación de la hebra sencilla de ADN, puede ser el producto de: 1) Daño directo en el molde del ADN. 2) Desbalance en la cantidad de nucleótidos, o por la existencia de nucleótidos defectuosos que no se acoplan

adecuadamente en el molde, lo que impediría la reparación adecuada de las rupturas. 3) Daño en las proteínas que participan en el proceso de replicación del ADN. 4) Daño en las proteínas de reparación del ADN (Bradley y Doshi 1991). 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 a la molécula por parte de electrófilos reactivos presentes en 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 no dan abasto, lo cual puede traducirse a largo plazo en la formación de tumores o enfermedades. También podrá 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 la homeostasis son más ineficientes con la edad.

En este estudio aparecen relacionadas con el daño en la hebra sencilla del ADN algunas variables poco mencionadas en la literatura, como las enfermedades cardiovasculares, las alergias y el uso de anticonceptivos orales. Se sabe que la hebra sencilla del ADN se ve afectada por la influencia de moléculas con oxígenos reactivos, que actúan como electrófilos directos (Archer 1988). Los 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.* 1995, Hartmann y Speit 1995). Por lo cual, no es de extrañar la asociación entre antecedentes de enfermedad cardiovascular y el daño al ADN encontrado en este estudio. 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.* 1994, 1995). 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 también al ADN de sus descendientes (Sardas *et al.* 1995).

Con respecto a la edad, los datos arrojan resultados contradictorios, lo cual concuerda con la literatura, ya que si bien es cierto que con la edad los mecanismos de reparación y mantenimiento de la homeostasis se van deteriorando; lo que conlleva un incremento en los niveles espontáneos del daño al ADN (Singh *et al.* 1991); también es cierto que la variabilidad individual existe a este nivel (Singh *et al.* 1990, 1991, Betti *et al.* 1994), por lo que individuos de la misma edad pueden mostrar diferentes grados de daño en el ADN. Por este motivo la susceptibilidad individual debe ser considerada cuando se interpretan datos obtenidos del monitoreo de poblaciones en conjunto con estudios en condiciones de laboratorio (Betti *et al.* 1995, Hartmann *et al.* 1995, Hellman *et al.* 1997). La diferencia en susceptibilidad puede darse también a nivel de los diferentes tipos celulares dentro de un mismo individuo, por lo que cuando los recursos lo permiten deben conocerse los tipos de linfocitos con los que se trabaja, o si se encuentran en un estadio particular de su ciclo (Singh *et al.* 1988, 1990, Green *et al.* 1992), porque presentan variaciones entre ellos, ya sea 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 daño que puede ocurrir en el ADN está modulado tanto por componentes genéticos intrínsecos (v.gr. competencia metabólica y capacidad de reparación) como por factores ambientales extrínsecos (v.gr. dieta y 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, y el efecto de la exposición de algunas de ellas es acumulativo a través del tiempo. Estos factores llevan a concluir que el monitoreo de daño genético debe ir acompañado por la identificación de individuos predispuestos a desarrollar problemas de salud inducidos por mutágenos (Scarpato *et al.* 1996a, 1996b). La susceptibilidad individual es causada por variación genética. La evidencia demuestra que en nuestra población hay individuos más susceptibles que otros a los plaguicidas. Sierra-Torres *et al.* (1998) realizaron un estudio en una población de trabajadores costarricenses expuestos a plaguicidas y un grupo no expuesto; en el cual además de evaluar daño genético mediante aberraciones cromosómicas, determinaron los polimorfismos en algunos genes de susceptibilidad a xenobióticos en los mismos individuos. No observaron diferencias en la frecuencia de aberraciones cromosómicas entre expuestos y no expuestos, pero la población expuesta presentó un mayor porcentaje de alelos metabolizantes favorables del gen GSTT1 que la población no expuesta a plaguicidas. Al analizar al grupo de personas expuestas, tomando en cuenta las aberraciones cromosómicas y los genes de susceptibilidad, encontraron que los sujetos con combinaciones de genes desfavorables, tienen una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas, independientemente de si eran expuestos o no expuestos. Estos datos sugieren que algunas discrepancias en los estudios de monitoreo de poblaciones expuestas a agentes xenobióticos pueden ser causadas por distribuciones heterogéneas de los genes polimórficos metabolizantes (Sierra-Torres *et al.* 1998).

Existen individuos que heredan variantes alélicas de genes involucrados en la desintoxicación de xenobióticos que confieren susceptibilidad, como el citocromo P450, la N-acetil transferasa y la S-glutación transferasa. En muchos estudios se ha observado una buena correlación entre la predisposición genética que confieren determinados alelos de estos genes, la activación de mutágenos ambientales específicos y el desarrollo de cáncer (Au y Sram 1996, Caporaso & Rothman 1999).



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

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).

Estas evidencias deben llevar a que los investigadores complementen los estudios de monitoreo de daño genético en poblaciones de alto riesgo, con determinaciones de los polimorfismos en los genes que confieren susceptibilidad. De este modo se lograría proteger en forma más efectiva a los individuos con predisposición, que por razones laborales deben exponerse a sustancias xenobióticas.

En conclusión, se puede utilizar el ensayo cometa como biomarcador de genotoxicidad en poblaciones expuestas ocupacionalmente a plaguicidas ya que existe una relación entre el daño a la hebra sencilla del ADN y la exposición ocupacional a plaguicidas. Aunque se desconoce si el daño encontrado se debe a los plaguicidas que se utilizan actualmente en el empaque de banano o a otros, 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 qué se usaron.

#### AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento al personal del INISA, a Arodys Robles por el

apoyo estadístico y a Emilio Rojas por sus comentarios y sugerencias. Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (proyecto N. 742-95-277), FUNDEVI, Organización Panamericana de la Salud a través del programa PLAGSALUD y el CONICIT.

#### 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 que acarrea problemas de contaminación ambiental y deterioro de 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 varían desde un dolor de cabeza hasta el desarrollo de cáncer. La mayoría de los estudios en esta área se han orientado hacia los efectos agudos o crónicos y recientemente se inicia el estudio del efecto genotóxico de los plaguicidas. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico de los plaguicidas utilizados en las empacadoras de banano, usando como marcador biológico la electroforesis de células únicas (conocido como ensayo cometa) en linfocitos aislados de sangre periférica. La población en estudio correspondió a 30 trabajadoras expuestas a plaguicidas, procedentes de 15 fincas bananeras y 28 mujeres sin antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas, de la misma área geográfica. Las trabajadoras que tenían entre cinco y quince años de trabajo presentaron mayor daño en la hebra sencilla del ADN ( $R^2=0.12$ ). Se desconoce si este efecto se debe a los plaguicidas que se utilizan actualmente o a plaguicidas empleados en el pasado. Tampoco fue posible correlacionar las dosis y las frecuencias de exposición a los plaguicidas con el daño al ADN, debido a que no existe un registro histórico sobre los productos empleados en el cultivo de banano, no se sabe por cuánto tiempo y las épocas en que fueron utilizados. Se recomienda el ensayo cometa para monitoreo genético en poblaciones expuestas a plaguicidas.

#### REFERENCIAS

- Anónimo. 1985. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. Geneva, Environmental Health, Criteria 46, 126 p. (WHO).
- Archer, M.C. 1988. Chemical carcinogenesis, p. 89-105. In I.F.Tannock & R.P. Hill (eds.). The basic Science of oncology. Pergamon, Nueva York.

- Au, W.W. & R.J. Sram. 1996. Second international conference on environmental mutagens in human populations. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 3): 421-422.
- Barret, J.C. 1995. Role of mutagenesis and mitogenesis in carcinogenesis, p. 21-30. *In* D. Phillips & S. Venitt (eds.), *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific, Oxford.
- Betti, C., T. Davini, L. Gianessi, N. Loprieno & R. Barale. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mut. Res.* 343: 201-207.
- Betti, C., T. Davini, L. Gianessi, N. Loprieno & R. Barale. 1995. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 normal subjects. *Mut. Res.* 307: 323-333.
- Bradley, D. P. & R. Doshi. 1991. Molecular targets of chemical mutagens, vol. 283, p. 193-210. *In* Ch. Witmer, R.R. Snyder, D.J. Jollow, G.F. Kalf, J.J. Kocsis & I.G. Sipes (eds.), *Biological reactives intermediates IV. Advances in experimental medicine and biology*, Plenum, Nueva York.
- Brouwer D.H., E. J. Brouwer & J.J. van Hemmen. 1994. Estimation of long-term exposure to pesticides. *Am. J. Ind. Med.* 25: 573-588.
- Caporaso, N. & N. Rothman. 1999. Genetic Susceptibility and cancer risk, p. 205-218. *In* D.A. Neumann & C.A. Kimmel (eds.) *Human variability in response to chemical exposures. Measures, modeling, and risk assessment*. CRC, ILSI, Washington, D.C.
- Carrano, A.V. & A.T. Natarajan. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut. Res.* 204: 379-406.
- Collins A. R. , M. Ai-guo & S.J. Duthie. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mut. Res.* 336: 69-77.
- Collins, A.R., V.L. Dobson, M. Dusinská, G. Kennedy & R. Stetina. 1997. The comet assay : what can it really tell us? . *Mut. Res.* 375: 183-193.
- Dich, J. S.H. Zahm, A. Hanberg & H.O. Adami. 1997. Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control.* 8: 420-433.
- Fairbairn, D.W., P. Olive & K.L. O'Neill. 1995. The comet assay: a compressive review. *Mut. Res.* 339: 37-59.
- Frenzilli G., A. Lori, G. Panasiuk, M. Ferdeghini & R. Barale. 1998. Comet assay on children's leukocytes 8 years after the Chernobyl disaster. *Mut. Res.* 415: 151-158.
- García, J.E. 1997. *Intruducción a los plaguicidas*. EUNED, San José, Costa Rica. 460 p.
- Green M.H.L., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole, A.V. Anstey & C.F. 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. *Mut. Res.* 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. 1995. 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). *Mut. Res.* 346: 49-56.
- Hartmann A., A. M. Nieß, M. Grünert-Fuchs, B. Poch & G. Speit. 1995. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mut. Res.* 346: 195-202.
- Hartmann A. & G. Speit. 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel tests (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90: 183-188.
- Hellman B., H. Vaghef, Friis L. & 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 & C. Wesseling. 1987. El uso de los plaguicidas en Costa Rica. EUNED, San José, Costa Rica. 159 p.
- Jaffery F.N. & P.N. Viswanathan. 1986. Women workers as specific high risk group in occupational & Environmental Toxicology. *J. Scien. Indus. Res.* 45: 109-118.
- Kassie, F., W. Parzefall & S. Knasmüller. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mut. Res.* 463: 13-31.
- Kogevinas, M., P. Boffetta & N. Pearce. 1994. Occupational exposure to carcinogens in developing countries, p. 63-85. *In* N Pearce, E. Matos, H. Vainio, P. Boffetta & M. Kogevinas (eds.), *Occupational cancer in developing countries*. IARC Scientific, Lyon, Francia.
- Lebailly, P., C. Vigreux, T. Gogard, F. Sichel, E. Bar, J.Y. 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. *Mut. Res.* 375: 205-217.
- Leon, F.E., G. Pradilla & E. Vesga. 1996. Neurological effects of organophosphate pesticides. *BMJ.* 313: 690-691.
- 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* H.P. Witschi & K. Netter (eds.). *Toxicology*, Elsevier Scientific. Irlanda.
- McConnell, R. & A.J. Hruska. 1993. An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: Implications for prevention in developing countries. *Am. J. Public Health.* 83: 1559-1562.
- McDuffie, H.H. 1994. Women at work: Agriculture and pesticides. *JOM.* 36: 1240-1246.
- McKelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo & A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut. Res.* 288: 47-63.
- Norusis, M. 1990a. Procedure T-TEST, procedure ONEWAY, procedure NPAR TEST and procedure REGRESSION. PpB1-B-14, B25-B36, B49-B124. *In* SPSS/PC+Statistic™ 4.0 for the IBM PC/XT/AT and PS/2. SPSS. Michigan.
- Norusis, M. 1990b. 1990. Procedure LOGISTIC REGRESSION. Pp B39-B62. *In* SPSS/PC+ Advanced Statistic™ 4.0 for the IBM PC/XT/AT and PS/2. SPSS. Michigan.
- Ostrosky-Wegman, P. & M.E. Gonsebatt. 1996. Environmental toxicants in developing countries. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 3): 599-602.
- Ramírez, A.L. & C.M.I. Ramírez. 1980. Esterilidad masculina causada por la exposición laboral al nematocida 1,2-dibromo-3-cloropropano. *AMC.* 23(3): 219-222.
- Ramírez, V. 1998. Efecto genotóxico de los plaguicidas en una población costarricense de trabajadoras bananeras. Tesis para obtener el grado de Magister Scientiae en Biología, Sistema de Estudios de Posgrado. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Ross G.M., T.J. McMillan, P. Wilcox, A.R. Collins. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) : technical aspects and applications. Report on the 5<sup>th</sup> LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mut. Res.* 337: 57-60.
- Saracci R., M. Kogevinas, P.A. Bertazzi, B.H. Bueno de Mesquita, D. Coggon, L.M. Green, T. Kauppinen, K.A.L. Abbé, M. Littorin, E. Lynge, J.D. Mathews, M. Neuberger, J. Osman, N. Pearce & R. Wilkemann. 1991. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Lancet.* 338(8774): 1027-1032.
- Sardas S., D. Walker, D. Akyol & A.E. Karakaya. 1995. Assessment of smoking induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single cell gel electrophoresis technique. *Mut. Res.* 335: 213-217.
- Scarpato, R., L. Migliore, A. Hirvonen, G. Falck & H. Norppa. 1996a. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides : Characterization of GSTM1, GSTT1 and NAT2 genotypes. *Environ. Mol. Mut.* 27: 263-269.
- Scarpato, R., L. Migliore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Miligi & N. Loprieno. 1996b. Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists : no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. *Mut. Res.* 367: 73-82.
- Sherman, J. 1995. Chlorpyrifos (Dursban) associated birth defects: A proposed syndrome, report four cases and discussion of the toxicology. *In* J. Occup. Med. Toxicol. 4: 417-431.
- Sherman, J. 1996. Chlorpyrifos (Dursban) associated birth defects: Report of four cases. *Arch. Environ. Health.* 51: 5-8.
- 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.P., M.T. McCoy, R.R. Tice & E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Singh, N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brant & E.L. Schneider. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mut. Res.* 237: 123-130.
- Singh, N.P., M.T. D.B. Danner, R.R. Tice, J.D. Pearson, L.J. Brant, C.H. Morrel & E.L. Schneider. 1991b. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mut. Res.* 248: 285-289.
- Smith, G., C.A.D. Smith & C.R. Wolf. 1995. Pharmacogenetic polymorphisms, p. 83-106. *In* D. Phillips &

- S. Venitt (eds.) *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific. Oxford, Inglaterra.
- Soto A.M., K.L. Chung & C. Sonnenschein. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphenen, 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. *Toxicol. Lett.* 88: 91-98.
- Steenland, K. 1996. Chronic neurological effects of organophosphate pesticides. *BMJ.* 312(7042): 1312-1313.
- Tice, R.R., P.W. Andrews & 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, Nueva York.
- 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.R., G.H.S. Strauss & W.P. 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. *Mut. Res.* 27: 101-113.
- 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* D.H. Phillips, D.H. & S. Venitt (eds.). *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific. Oxford, Inglaterra.
- Vaghef, H., P. Nygren, C. Edling, J. Bergh & B. Hellman. 1997. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 395: 127-138.
- Vainio, H., E. Matos & M. Kogevinas. 1994. Identification of occupational carcinogens, p. 41-59. *In* N. Pearce, E. Matos, H. Vainio, P. Boffetta & M. Kogevinas (eds.). *Occupational cancer in developing countries*. IARC Scientific. Lyon, Francia.
- Valverde, M.A. 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 Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F, México.
- Vial, T., B. Nicolas & J. Descotes. 1996. Clinical immunotoxicity of pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health.* 48: 215-229.
- Vijayalaxmi, R., R. Tice, G.H.S. Strauss. 1992. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.* 271: 243-252.
- Wesseling, C., L. Castillo & C.G. Elinder. 1993. Pesticide poisonings in Costa Rica. *Scand. J. Work Environ. Health.* 19: 227-235.
- Wesseling, C. 1997. Health effects from pesticides use in Costa Rica. An epidemiologic approach. Tesis. Akademisk avhandling som för avläggande av Medicine Docktorsexamen vid Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia.