

Determinación de la exposición a glifosato y otros plaguicidas y evaluación del daño en el ADN en trabajadores que laboran en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca

Marcela Varona Uribe¹, Helena Groot de Restrepo²,
Carlos H. Torres Rey³, Rosa Isabel Patiño

1. Descripción del proyecto

1.1. Planteamiento del problema

Entre los agentes ambientales nocivos para la salud, los químicos ocupan un lugar cada vez más importante dentro de los problemas en salud pública de los países en desarrollo, debido al manejo inadecuado durante la producción, aplicación y disposición final de los residuos¹.

En Colombia, la agricultura constituye uno de los principales rubros de ingreso, ocupando aproximadamente el 40% de la fuerza laboral y representando el 50% de las divisas del país. El modelo de desarrollo agrícola se sustenta, principalmente en el uso de agroquímicos, los cuales en la mayoría de las ocasiones, son utilizados sin el respectivo concepto técnico¹.

La caña de azúcar es un cultivo de amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales de nuestro país, se siembra para la obtención de azúcar o para la elaboración de panela. El área azucarera se concentra, aproximadamente en 185,000 ha localizadas, casi en su totalidad en el valle geográfico del río Cauca. La producción y el manejo del cultivo se caracterizan en esta región por el empleo de grandes extensiones de

tierra y el uso de tecnologías desarrolladas. Esta condición ha favorecido la obtención de altos tonelajes de caña a través del año y por tanto, la presencia de plantaciones en todos los estados de desarrollo, en contraste con lo que ocurre en la mayoría de los países productores de caña, donde hay meses definidos para la siembra y para la cosecha¹.

Lo anterior confiere a este cultivo el carácter de permanente en Colombia, con la presencia en forma continua de ciclos superpuestos de las diferentes plagas y a su vez, de los enemigos naturales de éstas, lo cual ha determinado el uso de plaguicidas a lo largo del ciclo productivo².

Los herbicidas constituyen un grupo muy importante de plaguicidas de uso agrícola que año tras año han aumentado su volumen de uso y a la vez han sustituido el laboreo mecánico y manual en el campo. Si bien estas sustancias químicas sintéticas son muy variadas y algunas de ellas con toxicidad muy elevada, en su gran mayoría son menos tóxicas que los insecticidas en general³.

El glifosato es uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo. Su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de manejo de malezas en las residencias. La formula-

¹ Instituto Nacional de Salud.

² Universidad de los Andes.

³ Universidad El Bosque.

ción se encuentra registrada en más de cien países y es usado en aproximadamente 60 cultivos agrícolas. En Colombia es empleado como madurante de caña de azúcar en el Valle del Cauca hace más de 30 años y como herbicida en cultivos como café, banano, arroz, cacao, palma africana y cítricos. Igualmente es el herbicida empleado en el programa de erradicación de cultivos ilícitos³ sin embargo, el uso de glifosato en el programa de aspersión de coca y amapola representa una fracción relativamente pequeña del total de su uso en Colombia⁴.

Respecto a los plaguicidas organofosforados (OF), son ampliamente utilizados como insumos agrícolas, plaguicidas domésticos y para el control de vectores de enfermedades epidémicas. Son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados y comparten como característica farmacológica común la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente la inhibición de la acetilcolinesterasa. Son fácilmente hidrolizados y tienen escaso poder de permanencia en el medio ambiente⁵. Aunque el uso de plaguicidas organofosforados y carbamatos es cada vez menor en cultivos de caña de azúcar, continúan siendo un problema de salud pública del país, dado que son los plaguicidas que causan mayor morbimortalidad a nivel nacional¹.

Los organoclorados constituyen un numeroso grupo de compuestos de síntesis cuyo auge en el uso como insecticidas comenzó en el año 1.940. Son hidrocarburos cíclicos que en su molécula contienen gran cantidad de cloro. Han sido ampliamente utilizados en la lucha contra la malaria y otras enfermedades en donde los vectores son insectos. Si bien fueron prohibidos en el año 1993 por el Ministerio de Salud (Resolución 10255/93), hay moléculas que aunque no se catalogan como organoclorados tienen átomos de cloro y carbono por lo que ameritan ser estudiados dado su alta persistencia, estabilidad y los efectos bioacumulativos y de biomagnificación⁶.

El interés central de éste proyecto de investigación es responder a la pregunta ¿Cuál es la exposición a glifosato, organoclorados, organofosforados y carbamatos y el daño en el ADN en trabajadores que laboran en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca? Solucionar estos interrogantes es de gran importancia ya que ayudará a evaluar el potencial genotóxico de estos agentes químicos y desarrollar programas de vigilancia epidemiológica aplicables al grupo poblacional evaluado.

2. Objetivos

2.2. General

Determinar la exposición a glifosato, organofosforados, carbamatos y organoclorados mediante la medición de estos plaguicidas en muestras biológicas y

establecer los daños en el material genético asociado al uso y manejo de estos plaguicidas en trabajadores que laboran en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca.

2.2. Específicos

- Describir las características sociodemográficas, ocupacionales, clínicas y toxicológicas de la población estudio.
- Establecer los niveles de glifosato y su metabolito AMPA en muestras de orina de poblaciones expuestas y no expuestas a plaguicidas.
- Medir los niveles de organofosforados, carbamatos y organoclorados en muestras de sangre mediante cromatografía de gases en los trabajadores seleccionados en la muestra.
- Establecer la frecuencia de micronúcleos y el índice de división nuclear en cultivos de sangre periférica de la población expuesta y no expuesta a plaguicidas.
- Determinar las rupturas en el ADN en células sanguíneas mediante la prueba del cometa en los trabajadores seleccionados en la muestra.

3. Metodología

3.1. Tipo de estudio

Se plantea un estudio descriptivo de corte transversal, el cual establecerá el nivel de exposición al herbicida glifosato y a plaguicidas organofosforados, carbamatos y organoclorados en trabajadores que laboran en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca (expuestos) y en personas de la población general de la misma área geográfica (no expuestos).

3.2. Área de estudio

Se realizará en el departamento del Valle del Cauca.

3.3. Población Muestra

Teniendo en cuenta los datos de Asocaña los cuales reportan que este rubro de la economía genera 36.000 empleos directos, se calculó un tamaño de muestra con una prevalencia esperada del 50%, con un poder del 80%, un nivel de significancia del 95% y un 20% de pérdidas, la cual estará constituida por 232 trabajadores, de los cuales 116 se obtendrán del área agrícola de cultivos de caña de azúcar en el departamento del Valle del Cauca (expuestos) y los otros 116 (no expuestos) que corresponderán a personas de la población general de la misma área geográfica, apareados por edad y género.

La población objeto del estudio será seleccionada de los municipios de Candelaria, Bugalagrande, Palmira y Tulúa donde se encuentran gran parte de los inge-

nios del país. La población expuesta que formará parte de la muestra, se obtendrá de ingenios asociados a Asocaña que acepten participar en el estudio y mediante muestreo aleatorio a partir de una listado de personal vinculado a dichas empresas, se seleccionarán aleatoriamente los trabajadores. La población no expuesta será seleccionada de los mismos municipios con ayuda de la Secretaría de Salud del Valle garantizando que no se encuentren expuestos a plaguicidas.

3.4. *Periodo de tiempo*

Tendrá una duración de 24 meses.

3.5. *Variables*

3.5.1. Características del trabajador

- Sociodemográficas: edad, sexo, escolaridad, afiliación al Sistema General de Salud y Seguridad Social (SGSSS).
- Ocupacionales: tiempo de trabajo en el sector agrícola, hábitos en el trabajo tipo de oficio, tiempo de exposición en el oficio, utilización de elementos de protección personal, medidas de higiene y seguridad industrial, exposiciones extralaborales y exposición a otros tóxicos ambientales.
- Clínicas: Signos y síntomas compatibles con intoxicación con el herbicida glifosato y plaguicidas organofosforados, carbamatos y organoclorados.
- Toxicológicas: condición de fumador y consumo de alcohol.
- Patológicas: enfermedades recientes, exposición a radiaciones, tratamientos con radioterapia o quimioterapia.
- Hábitos alimenticios.

3.5.2. Medición del glifosato y su metabolito AMPA

La determinación se llevará a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de espectrometría de masas.

3.5.3. Niveles de organofosforados, carbamatos y organoclorados en sangre mediante cromatografía de gases

Se realizará el análisis cromatográfico en el sistema HRGC/ECD (Cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones).

3.5.4. Estudio de las alteraciones en el material genético

Se realizarán las siguientes determinaciones:

- Ensayo del cometa: permite la evaluación de la ruptura en el ADN en células sanguíneas en individuos expuestos a agentes genotóxicos.

- Frecuencia de micronúcleos: el conteo se realizará en 2000 células binucleadas, esta prueba mide la frecuencia de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no han sido incorporados en el núcleo principal durante la mitosis y que aparecen retenidos en el citoplasma de aquellas células que han experimentado una división nuclear.
- Índice de división nuclear: permite comparar el comportamiento de las células en cuanto a su división celular entre los grupos expuestos y no expuestos, identificando agentes que causen retraso en el ciclo celular.

3.6. *Recolección de la información*

3.6.1. Diseño de instrumentos

- Encuesta ocupacional
Se aplicará a cada uno de los trabajadores seleccionados en la muestra por medio de un formulario con información general como identificación, edad, sexo y antecedentes ocupacionales como tipo de oficio, tiempo de exposición en el oficio, utilización de elementos de protección personal, medidas de higiene y seguridad industrial, exposiciones extralaborales, antecedentes patológicos como: enfermedades recientes, exposición a radiaciones, tratamientos con radioterapia o quimioterapia; antecedentes toxicológicos como condición de fumador, consumo de alcohol, exposición a otros tóxicos ambientales, signos y síntomas compatibles con intoxicación por el herbicida glifosato y plaguicidas organofosforados, carbamatos y organoclorados y hábitos alimenticios.

- Medición del glifosato y su metabolito AMPA
La determinación se realizará por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de espectrometría de masas.

- Niveles de organofosforados, carbamatos y organoclorados en sangre mediante cromatografía de gases.
El análisis se realiza por extracción en fase sólida (SPE) utilizando discos de C_{18} en muestras de sangre. Posteriormente se realiza el análisis cromatográfico por los sistemas HRGC/ECD y HPLC/UV.

- Estudio de las alteraciones en el material genético
Determinación de la frecuencia de Micronúcleos (MNs)
Se realizará cultivo de linfocitos para la determinación de la frecuencia de Mns según la técnica de Fenech y Morley¹

Determinación de las rupturas en el ADN - Ensayo del cometa (SCG)

Se realizará en sangre total, según la técnica descrita por Sing y colaboradores¹⁹.

3.6.2. Técnica de recolección

- Encuesta ocupacional

Estará a cargo de profesionales del área de la salud (médicos/microbióloga) quienes aplicarán la encuesta a cada uno de los trabajadores seleccionados en la muestra. Antes de iniciar la fase de recolección de la información se dará una inducción a los profesionales encargados de realizar la encuesta ocupacional. Se elaborará un instructivo como guía para el adecuado diligenciamiento de ésta encuesta, realizándole los ajustes necesarios a éste instrumento después de llevar a cabo el estudio piloto.

- Medición del glifosato y su metabolito AMPA

Dentro de los cinco primeros días después de la exposición a glifosato se recolectará orina de una micción (aproximadamente 50 ml) en frascos de polipropileno con tapa rosca; una vez tomada la muestra deberá permanecer congelada (en nevera) hasta su envío al laboratorio donde serán procesadas.

- Niveles de organofosforados, carbamatos y organoclorados en sangre mediante cromatografía de gases

Se recolectará un total de 12ml de sangre en tubos de ensayo con anticoagulante heparina, de los cuales 6 ml de sangre se emplearán para el análisis de organofosforados, carbamatos y organoclorados. Las muestras se recolectarán máximo a las 72 horas de exposición a estos plaguicidas y permanecerán refrigeradas hasta su envío al laboratorio donde serán procesadas. La recolección y rotulado de la totalidad de las muestras de sangre estará a cargo de un profesional (médico/microbióloga) vinculado a alguna de las instituciones participantes.

Cada paciente será codificado con el número correspondiente a la encuesta ocupacional. Una vez lleguen las muestras al laboratorio, serán recodificadas con el fin de minimizar el sesgo del analista, por una persona distinta a éste y al investigador.

- Estudio de las alteraciones en el material genético Determinación de la frecuencia de Micronúcleos (MNs)

A partir de la muestra de sangre total de 12 mL, se tomarán 5 ml para la determinación de micronúcleos y del índice de división nuclear. Se realizará el cultivo de linfocitos en medio RPMI 1640 suplementado en condiciones de esterilidad, 45 horas después de la iniciación de éste, se adicionará Citocalasina B (0.5 mL a una concentración de 6 ugr/mL). La presencia de micronúcleos indicará fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no han quedado inclui-

dos dentro del núcleo. Se continuará la incubación durante 30 horas más. Se realizarán extendidos de las células cosechadas en láminas portaobjetos y se colorearán con una solución Wright-Giemsa. Se realizará el conteo de todas las células, observando la lámina con objetivo de 40X, clasificándolas de acuerdo al número de núcleos, hasta obtener 2000 células binucleadas, en las cuales se observarán los MNs.

Los criterios de selección para el conteo de MNs serán los siguientes:

- Se deben analizar células con citoplasma y núcleo intactos.
- Diámetro menor de 1/3 del núcleo principal. El tamaño promedio de los micronúcleos es de 2 a 4 micras de diámetro.
- No refractibilidad (excluir pequeñas partículas teñidas).
- Mismo color o ligeramente más claro que el núcleo e igual textura (excluir grandes partículas teñidas).
- Localización dentro de 3 ó 4 diámetros nucleares sin tocar el núcleo (separación física del núcleo principal).
- No más de 2 micronúcleos asociados con un núcleo (si 3 o más micronúcleos aparecen con un núcleo, probablemente son polimorfos).
- Se deben excluir aquellas células con gránulos positivos en el citoplasma o aquellos con evaginaciones nucleares.
- Cuerpos redondos separados del núcleo principal (evaginación).

Para cuantificar la progresión celular en el cultivo, se calcula el Índice de División Nuclear (IDN), el cual describe el número de veces que en promedio la célula se ha replicado, a partir del número relativo de células mononucleadas (N1), binucleadas (N2), trinucleadas (N3) y tetranucleadas (N4)^{55,56}.

$$IDN = (1 \times f N_1) + (2 \times f N_2) + (3 \times f N_3) + (4 \times f N_4) / N$$

Donde:

f = frecuencia de células

N₁-N₄ = número de células con uno a cuatro núcleos respectivamente

N= total de células observadas.

La frecuencia de micronúcleos se relaciona con cada una de las variables: nivel de exposición, sitio de trabajo, género y edad, y se utiliza la prueba estadística de Kruskal-Wallis

Determinación de la ruptura en el ADN - Ensayo Cometa (SCG)

A partir de muestra de sangre total se tomará 1 ml para realizar el ensayo cometa. Se realizará la técnica basada en el protocolo de Sing y col¹⁰

Las células nucleadas son colocadas dentro de un gel de agarosa sobre láminas de microscopio, lisadas por detergentes a altas concentraciones salinas y luego sometidas a electroforesis bajo condiciones alcalinas. La corriente eléctrica empuja el ADN cargado negativamente del núcleo hacia el ánodo. Las pequeñas piezas de ADN dañado migran más rápido. Visto en el microscopio de fluorescencia, el ADN parece un cometa con una cabeza brillante y una cola cuya longitud e intensidad son indicativas de la cantidad de daño producido. Haciendo uso de un microscopio de fluorescencia y de una coloración con bromuro de etidio se observa la migración monocatenaria del ADN desde el núcleo. El daño del ADN es directamente proporcional al largo de las colas de migración. Para el análisis de las láminas se establecerán los criterios según el nivel de daño del ADN y basados en la técnica de Sing y colaboradores¹⁰. Mediante observación en el microscopio de fluorescencia dotado de un filtro cuya longitud de onda sea de 515-560 nm (filtro verde), usar una magnificación de 250X para hacer la valoración del daño del ADN.

La lectura será realizada teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Valoración del daño por porcentaje así:
Menor de 5%: No daño
5% - 20%: Daño bajo
20 - 40%: Daño medio
40 - 95%: Daño alto
Mayor de 95%: Daño
- Medición de la longitud de las colas de migración haciendo uso de un micrómetro.

Las láminas serán codificadas de forma que todos los análisis serán hechos en test ciego.

3.7. Estudio piloto

Se llevará a cabo en un 10% del total de la muestra, en donde se realizará la prueba de formularios, con el objeto de hacer posteriormente los ajustes necesarios tanto de instrumentos como de tiempos y movimientos. Las personas participantes en el estudio piloto no formarán parte de la población muestra seleccionada en el estudio.

3.8. Criterios de inclusión

Los criterios para la aceptación de trabajadores expuestos serán tiempo de trabajo ininterrumpido en cultivos de caña de azúcar mínimo de 6 meses a partir de la fecha de la toma de la muestra, trabajadores que estén expuestos a plaguicidas, que voluntariamente acepten participar y firmen el consentimiento informado.

Los criterios de inclusión de individuos no expuestos, serán los mismos para los individuos expuestos, excepto no tener exposición a plaguicidas ni haber laborado en cultivos de caña de azúcar en los últimos 6 meses a partir de la fecha de la toma de la muestra.

3.9. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión incluyen antecedentes de enfermedades crónicas que requieran terapias o medicamentos durante largo tiempo (inmunosupresores), uso de agentes quimioterapéuticos, tratamientos con radioterapia y exposición a rayos X en los últimos 6 meses.

Además aquellos individuos que voluntariamente no deseen participar en el estudio serán excluidos.

3.10. Procesamiento de los datos

Toda la información será sistematizada en una base de datos en el programa Epi-Info 6.04 para su posterior análisis.

3.11. Metodología del análisis

Se relacionarán las características sociodemográficas, ocupacionales, clínicas y toxicológicas de la población objeto con las mediciones de glifosato, organofosforados, carbamatos y organoclorados y las determinaciones de los efectos genotóxicos (micronúcleos, ensayo del cometa e índice de división nuclear) con el fin de obtener datos acerca de la exposición a estas sustancias.

Se utilizará el programa Epi-info, donde se creará una base de datos para cada individuo participante en el estudio a partir del cuestionario diseñado, empleando para el análisis el mismo programa. Inicialmente se observarán las distribuciones de frecuencia de cada variable usando promedio, mediana y desviación estándar y luego se procederá a elaborar tablas agrupadas para las mismas frecuencias.

Los análisis estadísticos a realizar en las pruebas de los efectos genotóxicos son:

Prueba de Kruskal-Wallis

Regresión lineal

Análisis de Varianza - Coeficiente de dispersión H

Prueba de X^2

El apareamiento del grupo seleccionado será por edades de ± 5 años de diferencia en el grupo de expuestos y no expuestos, se tendrá en cuenta el género. Este estudio permitirá plantear nuevos estudios con base en los resultados obtenidos.

3.12. Consideraciones éticas

Se le informará a la Secretaría de Salud del Valle del Cauca y a Asocaña el tipo de estudio que se va a

realizar y se seleccionará la población muestra con la ayuda de estas entidades. Antes de iniciar la recolección de la información y de las muestras, se informará a los trabajadores los objetivos y el tipo de estudio que se llevará a cabo, la importancia y beneficios que les traerá el participar, aclarándoles que se les entregarán los resultados de las pruebas paraclínicas. A cada trabajador se le proporcionará una hoja de consentimiento la cual deben firmar antes de contestar las preguntas de la encuesta ocupacional y de la toma de muestras biológicas. Los resultados de las pruebas serán entregados a cada uno de los trabajadores participantes en el estudio por un profesional médico quien explicará los hallazgos. Los trabajadores que lo ameriten serán remitidos a la EPS correspondiente con el fin de definir la conducta médica a seguir; en caso de que no tengan EPS el seguimiento se hará a través de la Secretaría de Salud.

Teniendo en cuenta la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud que establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, en el Título II Capítulo I Artículo 11 sobre los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, se clasifica esta investigación como de riesgo mínimo.

Bibliografía citada

1. Idrovo A.J. intoxicaciones masivas con plaguicidas en Colombia. *Biomédica* 1999; 19: 67-76.
2. Las plagas de la caña de azúcar su manejo y control [online]. Lastra L, Gómez L, Cenicaña, Octubre 2000. Disponible en: http://www.cenicana.org/pdf/documentos-de_trabajo/doc_trabajo_533.pdf
3. Insectos Asociados con la Caña de Azúcar en Colombia [online]. Lastra L, Gómez L, Cenicaña. Disponible en: http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p237-263.pdf
4. Burger M, Fernández S.*Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev Med Uruguay* 2004; 20:202-207.
5. Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Solomon K, Aneón A, Cerdeira A, Marshall J, Sanín L. CICAD. 2005. Disponible en: <http://www.cicad.oas.org/es/glifosatoInformeFinal.pdf>
6. Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Serie Vigilancia 11. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. México, 1991.
7. Goldfrank LR, Lewin NA, Flomenbaum EN. *Toxicologic emergencies*. Edit. Appleton Century Crofts. USA 1986.
8. Cassaret L., Doull J. *Toxicology, The basic science of poisons*. Macmillan Publishing Co. Fourth edition. New York, USA 1991.
9. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147:29-36.
10. Sing NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184-191.