

Biomonitorización Del Riesgo Genotóxico En Agricultores De Cinco Regiones Colombianas: Asociación Con La Exposición Ocupacional Al Glifosato

Bolognesi C¹, Carrasquilla G², Volpi S¹, Solomon KR³, Marshall EJP⁴

¹*Environmental Carcinogenesis Unit, Department of Epidemiology and Prevention, National Cancer Research Institute, Genoa, Italy.* ²*Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.* ³*Centre for Toxicology and Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada,* and ⁴*Marshall Agroecology Limited, Barton, Winscombe, Somerset, United Kingdom*

Para evaluar los posibles efectos en el ser humano asociados a las formulaciones de glifosato utilizadas en el programa de aspersión aérea para control de los cultivos ilícitos en Colombia, se llevó a cabo un estudio de biomonitorización citogenética en individuos de 5 regiones colombianas, caracterizadas por tener diferente exposición al glifosato y otros plaguicidas. Se encuestaron mujeres en edad fértil (137 personas de 15-49 años) y a sus esposos para obtener información sobre el estilo de vida y el estado y antecedentes de salud, incluyendo la exposición ocupacional previa y actual a glifosato y otros plaguicidas y los factores conocidos asociados a una mayor frecuencia de micronúcleos (MN). En las regiones que estaban siendo asperjadas con glifosato, fueron tomadas muestras de sangre antes de la aspersión (indicadoras de la exposición basal), 5 días después de la aspersión y 4 meses después de la aspersión. Se hizo cultivo de los linfocitos y se aplicó un ensayo de citoma de micronúcleo con bloqueo de citocinesis para evaluar el daño cromosómico y la citotoxicidad. La frecuencia basal de células binucleadas con micronúcleos (CBMN), comparada con Santa Marta donde se cultiva café orgánico sin plaguicidas, fue significativamente mayor en los individuos de las otras 4 regiones. La mayor frecuencia de CBMN se encontró en Boyacá donde no se estaba llevando a cabo aspersión aérea para erradicación con glifosato y en el Valle del Cauca donde se utilizaba glifosato para la maduración de la caña de

azúcar. Las únicas variables asociadas con la frecuencia de CBMN cuantificadas antes de la aspersión fueron la región, el sexo y la mayor edad (≥ 35 años). En Nariño, Putumayo y Valle se observó un aumento significativo en la frecuencia de CBMN entre la primera y la segunda muestra inmediatamente después de la aspersión (<5 días). En la muestra post aspersión, quienes reportaron contacto directo con la aspersión de erradicación mostraron una frecuencia cuantitativa mayor de CBMN en comparación con aquellos sin exposición al glifosato. El aumento en la frecuencia de CBMN observado inmediatamente después de la aspersión con glifosato no fue consistente con las dosis de aplicación empleadas en las regiones y no hubo asociación entre el contacto directo autoinformado con las aspersiones de erradicación y la frecuencia de CBMN. Cuatro meses después de la aspersión, se observó en Nariño, pero no en Putumayo, ni en el Valle del Cauca, una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia media de CBMN en comparación con la segunda muestra. En general, los datos sugieren que el daño genotóxico asociado a la aspersión de glifosato para control de cultivos ilícitos, evidenciado en la prueba de MN, es bajo y parece ser transitorio. La evidencia indica que el riesgo genotóxico potencialmente asociado con la exposición a glifosato, en las áreas donde se aplica el herbicida para la erradicación de coca y amapola, es bajo.

Recibido XXXX; aceptado XXXXX.

© Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 2009. Este trabajo fue preparado como parte del Estudio titulado "La Producción de Drogas Ilícitas, el Medioambiente y la Salud Humana," financiado con contribuciones de los Gobiernos de Colombia y de los Estados Unidos de América. Las conclusiones y opiniones expresadas en el mismo pertenecen a los autores y no necesariamente representan las de la Organización de los Estados Americanos o su Secretaría General, la cual, a la fecha de adquisición de los derechos de autor, no ha formulado ninguna opinión respecto de aquellas.

Dirección de correspondencia: Keith R Solomon, Centre for Toxicology and Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, ON, N1G2W1. E-mail: ksolomon@uoguelph.ca

El glifosato (N-fosfonometil glicina), un herbicida no selectivo, es el ingrediente activo de varias formulaciones de herbicidas y uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados mundialmente (Baylis 2000, Woodburn 2000, Duke y Powles 2008). Es un herbicida de post emergencia, efectivo para el control de especies anuales, bienales y perennes de hierbas, juncias y malezas de hoja ancha. La hidrosolubilidad relativamente alta y la naturaleza iónica del glifosato retardan la penetración a través de las cutículas hidrofóbicas de cera de las plantas. Por esta razón, el glifosato comúnmente es formulado con surfactantes que disminuyen la tensión superficial de la solución y aumentan la penetración en los tejidos vegetales (World Health Organization International Program on Chemical Safety 1994, Giesy et al., 2000).

Numerosas formulaciones basadas en glifosato están registradas en más de 100 países y están disponibles

bajo diferentes marcas comerciales. Uno de los productos a base de glifosato más comúnmente aplicados es el Roundup®, que contiene glifosato como ingrediente activo (IA) y tallow amina polietoxilada (POEA) como surfactante. El glifosato y sus formulaciones han sido ampliamente investigados en cuanto a sus potenciales efectos adversos en humanos (Williams et al., 2000). Ha habido reportes de que este plaguicida posee una baja toxicidad aguda en diferentes especies animales. La evidencia experimental mostró que el glifosato no se bioacumula en ningún tejido animal (Williams et al., 2000). Estudios de ingestión crónica en roedores no evidenciaron actividad carcinogénica, ni ningún otro efecto crónico relevante (USEPA 1993, World Health Organization International Program on Chemical Safety 1994).

En estudios *in vitro* con cultivos tisulares u organismos acuáticos, algunos de los productos formulados son más tóxicos que el glifosato IA (Giesy et al., 2000, Williams et al., 2000). Las diferencias en la respuesta de los organismos de prueba al IA y a la formulación comercial, e.g., Roundup®, probablemente se deben a la toxicidad de los diferentes formulantes y surfactantes contenidos en los productos comerciales. Hay acuerdo general en que los adyuvantes pueden ser más tóxicos para los animales que para el glifosato mismo (Giesy et al., 2000, Williams et al., 2000, Richard et al., 2005). La citotoxicidad de la formulación comercial, Roundup®, a las células mononucleares periféricas fue 30 veces mayor ($LC_{50} = 56$ mg/L) que el IA ($LC_{50} = 1640$ mg/L) (Martinez et al., 2007). Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* con pruebas simultáneas de glifosato IA y Roundup® mostraron que solamente la formulación comercial fue genotóxica (Rank et al., 1993, Bolognesi et al., 1997b, Gebel et al., 1997, Grisolia 2002). Los efectos genotóxicos y citotóxicos fueron observados con Roundup® y otras formulaciones con glifosato, pero no con glifosato IA, sólo en estudios comparativos que involucraban diferentes sistemas experimentales (Peluso et al., 1998, Richard et al., 2005, Dimitrov et al., 2006). Las diferencias observadas fueron atribuidas a algunos ingredientes del Roundup®, principalmente los surfactantes, y/o a un efecto sinérgico del glifosato y componentes de la formulación (Sirisaththa et al., 2004, Peixoto 2005).

Los estudios epidemiológicos generalmente no mostraron relaciones fuertes ni consistentes entre la exposición humana al glifosato o a los productos que contenían glifosato y los desenlaces de salud, en poblaciones humanas. No se encontró asociación estadísticamente significativa en humanos con abortos espontáneos, muerte fetal, parto pretérmino, defectos del tubo neural (Rull et al., 2006) e incidencia global de

cáncer, aunque fue reportada una posible asociación entre la exposición acumulativa al glifosato y el riesgo de mieloma múltiple (De Roos et al., 2005). La evidencia epidemiológica es insuficiente para verificar la relación causa efecto para el cáncer en niños (Wigle et al., 2008). Cuatro estudios de casos y controles sugirieron una asociación entre el uso reportado de glifosato y el riesgo de un linfoma no Hodgkin (LNH) en edades de 20 a 70 años (Hardell and Eriksson 1999, McDuffie et al., 2001, Hardell et al., 2002, De Roos et al., 2003, Eriksson et al., 2008).

La toxicidad de glifosato IA y Roundup® fue extensamente probada en un amplio rango de sistemas *in vivo* e *in vitro*, evaluando diferentes medidas de desenlace (*endpoints*) genéticas (mutación genética, mutación cromosómica, daño y reparación del ADN), empleando bacterias y células somáticas de mamíferos (Williams et al., 2000). El ingrediente activo no indujo ningún efecto genotóxico relevante, como mutaciones genéticas, en varios ensayos en bacterias incluyendo el ensayo de reversión de *Salmonella typhimurium*, con y sin activación metabólica (Wildeman and Nazar 1982, Moriya et al., 1983, Li and Long 1988) y el WP-2 de *Escherichia coli* (Moriya et al., 1983, Li and Long 1988). El ingrediente activo también fue negativo en el ensayo de mutación genética HGPRT de células de ovario de Hamster Chino y en el ensayo de reparación del DNA en hepatocito primario (Li and Long 1988). El potencial genotóxico de la formulación Roundup® fue investigado en numerosos estudios que evaluaban diferentes medidas de desenlace (*endpoints*) genéticas en varios sistemas biológicos y fue (1) negativo en el ensayo de reversión de *S. typhimurium* (Kier et al., 1997); (2) en el ensayo de letalidad ligado al sexo con *Drosophila melanogaster* (Gopalan and Njagi 1981) y (3) negativo para la inducción *in vivo* de micronúcleos (MN) en médula ósea de ratón (Rank et al., 1993, Kier et al., 1997, Dimitrov et al., 2006). Numerosos estudios reportaron que en los ensayos agudos la formulación de Roundup® ejercía un efecto genotóxico débil.

Las diferencias en la respuesta de los organismos de prueba al glifosato ingrediente activo y a la formulación comercial Roundup® podrían deberse a la toxicidad de los diferentes coformulantes y surfactantes contenidos en los productos comerciales. Algunos estudios con pruebas paralelas de glifosato y Roundup mostraron que solamente la formulación comercial era genotóxica (Rank et al., 1993, Bolognesi et al., 1997b, Gebel et al., 1997, Grisolia 2002). Un estudio reciente del potencial genotóxico de las formulaciones de glifosato encontró que en algunos casos los efectos genotóxicos se obtuvieron bajo condiciones de exposición que no eran relevantes en humanos (Heydens et al., 2008).

Un estudio *in vitro* describió un aumento de las roturas de cadena sencilla del ADN (SSB, del inglés, *single strand breaks*) dependiente del aumento de la concentración y evaluadas mediante el ensayo del cometa, en dos líneas celulares diferentes tratadas con glifosato a concentraciones subletales (Monroy et al., 2005). Las formulaciones de Roundup® mostraron afectar el ciclo celular al inhibir la transición G2/M y la síntesis de ADN llevando a inestabilidad del genoma (Marc et al., 2004a; 2004b). En un artículo reciente fue reportada evidencia de daño del ADN en los linfocitos periféricos de un pequeño grupo de individuos potencialmente expuestos a glifosato (Paz-y-Miño et al., 2007). El número de individuos (21 controles y 24 expuestos) fue bajo y el grupo expuesto estaba conformado por 23 mujeres y sólo 1 hombre, lo cual dificulta la interpretación de los resultados.

La frecuencia de MN en los linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizada para la biomonitorización de la exposición a plaguicidas (Bolognesi 2003, Costa et al., 2006, Montero et al., 2006). La prueba de MN, indicadora del daño cromosómico, es uno de los biomarcadores más adecuados para monitorizar una exposición acumulativa a los agentes genotóxicos. El daño cromosómico, como resultado de la reparación ineficiente o incorrecta del ADN, se expresa durante la división celular y representa un índice de los efectos genotóxicos acumulados. La metodología de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (MNBC) (Fenech and Morley 1985) permite diferenciar las células mononucleadas, que no se dividen, y las binucleadas que se han dividido una vez expresando un daño genómico asociado a la exposición reciente. La prueba en esta aplicación integral, según fue propuesta por Fenech (2007) incluyendo un conjunto de marcadores de amplificación del gen, necrosis y apoptosis celular, permite la evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por la exposición a un agente genotóxico.

La estrategia antidrogas de Colombia incluye numerosas medidas que van desde la aspersión aérea de una mezcla de una formulación comercial de glifosato (Glyphos®) y un adyuvante, Cosmo-Flux® (Solomon et al., 2007b), a la erradicación manual, incluyendo programas de desarrollo alternativo y de sustitución de cultivos (UNODC 2007). Para evaluar el potencial riesgo genotóxico asociado al programa de aspersión aérea con la mezcla de glifosato, se llevó a cabo un estudio de biomonitorización citogenética en individuos de 5 regiones colombianas, caracterizadas por diferente exposición a formulaciones de glifosato y otros plaguicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en 5 regiones de Colombia con diferente exposición potencial a glifosato acorde con lo reportado por Sanin et al (2009). Brevemente, las características de las áreas de estudio se describen a continuación:

La Sierra Nevada de Santa Marta, donde se cultiva café orgánico sin uso de plaguicidas.

Boyacá, un área de cultivos ilícitos, donde se practica la erradicación manual y es común el empleo de plaguicidas y otros agentes químicos.

Putumayo y Nariño, donde se lleva a cabo aspersión aérea de glifosato para la erradicación de la coca y la amapola. La dosis de aplicación aérea para la erradicación de la coca es de 3,69 kg de glifosato a.e./ha (Solomon et al., 2007b). Para maximizar la penetración y la efectividad de la formulación de la aspersión, el Glyphos® es mezclado en el tanque con un adyuvante (Cosmo-Flux® 411F; Cosmoagro, Bogotá).

El Valle del Cauca, donde se aplica el glifosato mediante aspersión aérea para la maduración de la caña de azúcar. El producto utilizado más comúnmente es Roundup 747® y es aplicado a una dosis de 1 kg a.e./ha, sin adyuvante adicionado (comunicación personal con ASOCAÑA, la Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia, diciembre 2008).

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Doscientos setenta y cuatro individuos fueron incluidos en el estudio. El objetivo fue tomar una muestra de 30 parejas en edad reproductiva en cada área. En lo posible, se tomaron muestras de las mismas parejas del estudio adelantado por Sanin et al (2009). En Putumayo, Nariño y Valle del Cauca, la población se seleccionó con base en la programación de las aspersiones aéreas con glifosato. Esta programación era confidencial y fue suministrada exclusivamente para los propósitos del estudio por la Policía Antinarcóticos (Putumayo y Nariño) o Asocaña (Valle del Cauca). En el Valle del Cauca, no se logró obtener una muestra de 30 individuos debido a que la aspersión en la región de estudio no se llevó a cabo en áreas pobladas. La mayoría de las aspersiones durante el período de estudio se llevaron a cabo en los cultivos de caña donde no se encontraron habitantes. Todas las áreas que iban a ser asperjadas en el Valle del Cauca fueron visitadas para buscar parejas, sin embargo, sólo se logró incluir 14.

En la Sierra Nevada de Santa Marta y Boyacá, se identificaron las mismas áreas investigadas en un estudio preliminar (Sanin et al., 2009), pero, debido a la inestabilidad de la población y a la alta migración, la mayoría de parejas del estudio previo no fueron localizadas. En todas las regiones, se siguió la misma

estrategia antes descrita (Sanin et al., 2009) visitando hogar por hogar hasta completar las 30 parejas que llenaban los criterios de inclusión, mujeres en edad fértil (15 a 49 años) y sus esposos, quienes voluntariamente aceptaban participar en el estudio.

RECOLECCIÓN DE DATOS DE CAMPO

La recolección de datos de campo se llevó a cabo entre octubre de 2006 y diciembre de 2007. Los epidemiólogos y encuestadores de las 5 regiones que participaron en el estudio de Sanin et al (2009) fueron informados sobre los objetivos del estudio y entrenados para la recolección de datos. El Comité de Ética en Investigaciones de la Fundación Santa Fe de Bogotá aprobó el protocolo de estudio y los formularios de consentimiento informado utilizados. Todos los individuos fueron informados sobre los objetivos del estudio. Todos dieron su consentimiento informado y aceptaron donar sangre para las muestras. No autoinformaron enfermedad en el momento de la obtención de las muestras de sangre, ni durante las entrevistas. Cada uno de los voluntarios fue entrevistado mediante un cuestionario estandarizado, diseñado para obtener detalles relevantes sobre el estilo de vida y el estado actual y los antecedentes de salud. Lo anterior incluía información sobre posibles factores de confusión de daño cromosómico: tabaquismo, uso de medicamentos, infecciones severas o enfermedades virales durante los últimos 6 meses, vacunación reciente, presencia de contaminantes domésticos o externos, exposición a rayos X y radio o quimioterapia previa. También se aplicó un cuestionario simplificado de frecuencia de ingesta que ya había sido empleado en otras regiones de Colombia, para evaluar la ingestión de ácido fólico en la dieta. Esta ingestión fue caracterizada por el papel que tiene la deficiencia de ácido fólico en el daño celular basal en los linfocitos humanos (Fenech and Rinaldi 1994). En el cuestionario se incluyó información específica sobre la exposición en el momento de la aspersión aérea en Putumayo, Nariño y Valle del Cauca.

MUESTRAS DE SANGRE Y CULTIVOS CELULARES

En Boyacá se obtuvieron dos veces las muestras de sangre, al inicio del estudio y un mes después de la primera encuesta; en Nariño, Putumayo y Valle del Cauca, se obtuvieron en tres diferentes momentos: inmediatamente antes de la aspersión, en los primeros cinco días subsiguientes y 4 meses después. De cada individuo se obtuvo una muestra de 10ml de sangre total, por venopunción, utilizando tubos *vacutainer* heparinizados conservados a temperatura ambiente y enviados antes de 24 horas para siembra de los cultivos de linfocitos. Las muestras fueron codificadas antes de

ser cultivadas. Se utilizó el método de Fenech and Morley (1985) con bloqueo de citocinesis modificado para determinar la frecuencia de MN en los linfocitos. Los cultivos de sangre total para análisis citogenético fueron preparados en Bogotá (Colombia) por personal específicamente entrenado por citogenetistas de la Unidad de Carcinogénesis Ambiental del Instituto Nacional de Investigación en Cáncer (Génova, Italia).

Se prepararon tres cultivos estériles de linfocitos. Una alícuota de 0,4 ml de sangre total fue incubada a 37°C en duplicado en 4,6 ml de RPMI 1640 (Life Technologies, Milán, Italia) enriquecida con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies SrL, Milán, Italia), 1,5 % de fitohemaglutinina (Murex Biotech, Dartford, Reino Unido), 100 Unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Después de 44 horas, se adicionó citochalasin B (Sigma, Milán, Italia) a una concentración de 6 µg/ml. Al finalizar la incubación a 37°C por 72 horas, las células fueron centrifugadas (800g, 10 min) luego tratadas con 5 ml de 0,075 mM KCl por 3 min a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos. Las muestras fueron tratadas luego con fijador (3:1 de metanol:ácido acético) y centrifugadas. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en 1 ml de metanol. En este paso, las muestras fueron enviadas a la Unidad de Carcinogénesis Ambiental (Instituto Nacional de Investigación en Cáncer, Génova, Italia). Todas las muestras fueron centrifugadas en metanol. El tratamiento con el fijador (5:1 de metanol:ácido acético), seguido por centrifugación, se repitió dos veces por 20 minutos. Los linfocitos en fijador fresco fueron aplicados en láminas limpias congeladas, secadas con aire y teñidas con Giemsa al 2% (Sigma, Milán, Italia). Se llevó a cabo análisis ciego de MN sólo en los linfocitos con el citoplasma preservado. Se analizaron en promedio 2000 células para cada individuo. Las células fueron calificadas citológicamente utilizando el abordaje del citoma para evaluar el estatus de viabilidad (necrosis, apoptosis), el estatus mitótico (mononucleadas, binucleadas, multinucleadas) y el daño cromosómico o estatus de inestabilidad (presencia de micronúcleos, puentes nucleoplasmáticos, *buds* nucleoplasmáticos) (Fenech 2007). El índice de proliferación (IP) fue calculado de la siguiente manera:

$$IP = \frac{\text{número de células mononucleadas} + 2 \times \text{número de células binucleadas} + 3 \times \text{número de células polinucleadas}}{\text{número total de células}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas fueron caracterizadas utilizando la media y la desviación estándar, en tanto que las variables categóricas se expresaron en proporciones. Las variables dependientes, los micronúcleos por célula

binucleada (CBMN) y las diferencias en MN entre las muestras, fueron transformadas en raíces cuadradas cuando se requirió, para cumplir con los supuestos necesarios de distribución normal o varianzas iguales. La comparación de MN entre áreas se llevó a cabo mediante ANOVA unifactorial. Se utilizó un nivel de significancia de 5% para evaluar las diferencias entre áreas. Para llevar a cabo comparaciones múltiples, se aplicó la prueba de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). La significancia de las diferencias en la frecuencia de CBMN, entre la primera y la segunda, y la segunda y la tercera muestras, se cuantificó mediante la prueba t no pareada con iguales varianzas. Se utilizaron la diferencia y el intervalo de confianza del 95% para la comparación entre muestras.

El análisis bivariado entre las variables dependientes y los factores de riesgo supuestos se llevó a cabo mediante ANOVA unifactorial, comparando los individuos expuestos y los no expuestos. En los casos en los cuales el factor de riesgo era una variable continua, como la edad, la ingesta de ácido fólico, el consumo de alcohol y el consumo de café, se utilizó el coeficiente de correlación.

Se realizó una regresión lineal múltiple para evaluar la asociación entre las CBMN en la primera muestra con las diferentes variables: región, edad (como variable continua y también como edad categórica), raza como variable dicotómica, exposición a productos genotóxicos según definición previa, sexo (femenino vs masculino) e ingesta de ácido fólico (categorizada en cuartiles). El análisis de regresión se realizó con variables transformadas, con transformación de la CBMN por raíz cuadrada y el logaritmo natural de la edad, para obtener una distribución normal.

RESULTADOS

Las características demográficas y los hábitos de los grupos de estudio se describen en la Tabla 1. La población del estudio comprendió 274 sujetos (137 mujeres y 137 hombres; edad promedio $30,74 \pm 7,8$ años). La edad media de los sujetos fue similar en las diferentes regiones. La mayor parte de la población estudiada era mestiza, a excepción del área de Nariño conformada por afrodescendientes. En la población total, 38% de los encuestados no había completado la educación primaria. Putumayo tenía la mayor proporción con educación y el Valle del Cauca la menor, como se muestra en la Tabla 1. Solamente el 10% de todos los sujetos eran fumadores (20% en Putumayo), la gran mayoría de individuos eran consumidores de cerveza o licor, con un consumo consistente de guarapo (bebida alcohólica tradicional preparada por fermentación del maíz) en Santa Marta y Boyacá. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la ingestión de ácido

fólico entre las diferentes regiones (los valores medios variaron de 750 a 1189 $\mu\text{g/sem}$ ana).

Ciento nueve de 274 participantes (39,8%) reportaron uso actual de plaguicidas en su trabajo o en otras actividades. Nariño (75,6%) y Putumayo (61,7%) fueron las dos regiones donde la prevalencia de uso de genotóxicos fue mayor; Boyacá (24,2%) y Valle del Cauca (28,6%) reportaron menor uso. Ninguno de los sujetos de estudio en Santa Marta reportó uso de plaguicidas. No estuvieron disponibles datos sobre la cantidad de plaguicida empleado. Cincuenta de 273 individuos (18,3%) que suministraron información sobre exámenes de rayos X reportaron haber estado expuestos alguna vez, sin embargo, sólo 21 de los 46 que dieron información sobre las fechas de los rayos X reportaron exposición en los últimos 6 meses antes de la encuesta y de la primera muestra de sangre. Sesenta y uno % de la población reportó infecciones virales, la mayor prevalencia en Nariño (89,5%) y la menor en Putumayo (49,2%). Sin embargo, 89,3% de las infecciones virales fueron resfriados comunes y 6,1% dengue. Seis encuestados reportaron hepatitis sin especificar el tipo de la infección.

Las medias y las desviaciones estándar de la frecuencia de MN y los parámetros relacionados según las regiones se presentan en la Tabla 2 y se ilustran gráficamente en la Figura 1. En comparación con Santa Marta, donde cultivan café orgánico sin uso de plaguicidas y considerada el área de referencia, la frecuencia basal de CBMN fue significativamente superior en los individuos de las otras 4 regiones. La más alta frecuencia de CBMN fue en Boyacá donde no se lleva a cabo programa de aspersión aérea y en el Valle del Cauca donde la aspersión aérea se realizaba para la maduración de la caña de azúcar. No hubo diferencia significativa entre la frecuencia media de CBMN de Boyacá y el Valle del Cauca. Tampoco hubo diferencia significativa entre la frecuencia media de CBMN de Putumayo y Nariño, aunque Boyacá y el Valle del Cauca mostraron una frecuencia significativamente mayor que la de Nariño y Putumayo. La mayor frecuencia de CBMN en Boyacá también se observó en una segunda muestra un mes después.

Hubo diferencias en la frecuencia de CBMN entre los períodos de muestreo. En el Valle, Putumayo y Nariño se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de CBMN entre la primera y la segunda muestras, inmediatamente después de la aspersión (< 5 días). En Nariño, cuatro meses después de la aspersión hubo una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia media de CBMN en comparación con la segunda muestra, pero en el Valle del Cauca, la disminución no fue significativa ni hubo el aumento observado en Putumayo (Figura 1 y Tabla 2).

Tabla 1.
Características demográficas y posibles factores de confusión en las poblaciones de estudio.

Área	Santa Marta	Boyacá	Putu-mayo	Nariño	Valle del Cauca
Número de sujetos	60	62	60	64	28
Edad (Media (DE))	27,0 (5,6)	29,1 (8,8)	31,4 (7,2)	32,5 (7,4)	33,4 (8,7)
Raza (%)					
Mestizo	100	100	88,3	3,1	60,7
Afroamericano			6,7	96,9	39,3
Indígena			5,0		
Educación (%)					
Ninguna		4,8	1,7		
Primaria Incompleta	26,7	38,7	53,3	42,2	21,4
Primaria Completa	21,7	29,0	20,0	23,4	32,1
Secundaria Incompleta	25,0	8,1	20,0	25,0	28,6
Secundaria Completa	26,7	19,4	3,3	9,4	17,9
Técnica			1,7		
Ocupación (%)					
Agricultura	10,0	41,9	60,0	62,5	7,1
Hogar	40,0	50,0	38,3	34,4	50,0
Otra	50,0	8,1	1,7	3,1	42,9
Seguridad Social (%)					
No asegurado	50,0	9,7	36,7	71,9	7,1
Subsidiado	38,3	83,9	60,0	18,7	50,0
Asegurado	11,7	6,4	3,3	9,4	42,9
Consumo de café (tazas/día) media (SD)					
% de población	1,8 (2,3)	1,7 (0,8)	2,3 (4,1)	1,3 (0,4)	1,7 (1,2)
	80,0	67,7	88,3	76,6	82,1
Tabaquismo (%)					
No fumadores	91,7	95,2	80,0	87,5	92,9
Alcohol (%)					
Licor	28,3	25,8	53,3	78,1	78,6
Cerveza	51,6	67,7	63,1	82,8	64,3
Guarapo	6,7	59,7	1,7	3,2	10,7
Usuarios de drogas ilícitas (%)	6,7	0	5,0	7,8	0
Dieta					
Ingesta de ácido fólico (µg/semana)	1,189	873	750	1,160	812

La frecuencia de células mononucleadas con micronúcleos (CMMN) se empleó como índice del nivel previo de daño cromosómico acumulado *in vivo* (Tabla 2). La menor frecuencia de CMMN para la primera muestra se observó en Santa Marta, sin embargo, no hubo una diferencia notoria con la frecuencia de CMMN en Santa Marta, Putumayo y Nariño y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el Valle y Boyacá. Sin embargo, el Valle y Boyacá tuvieron una

frecuencia significativamente mayor de CMMN que Putumayo, Nariño y Santa Marta en la primera muestra. Inmediatamente después de la aspersión, el Valle mostró una frecuencia significativamente mayor de CMMN en comparación con Putumayo y Nariño, y la de Nariño también fue mayor que la de Putumayo. Entre la primera y la segunda muestras, el aumento en la frecuencia de CMMN en Nariño y el Valle fue estadísticamente significativo, pero no hubo diferencia

TABLA 2.

Frecuencia media de células binucleadas con micronúcleos (CBMN), micronúcleos totales por 1000 linfocitos periféricos binucleados (MNL), frecuencia de células mononucleadas por 1000 linfocitos (CMMN) e índice de proliferación (IP) por región antes de la exposición (Fase 1), cinco días después de la aspersión (Fase 2) y cuatro meses después (Fase 3).

Región	Santa Marta	Boyacá	Putumayo	Nariño	Valle del Cauca
Fase 1					
N. de sujetos	60	62	58	63	28
CBMN	1,83 (0,97)	5,64 (1,72)	3,61(1,51)	4,12 (1,65)	5,75 (2,48)
MNL	1,97(1,05)	6,16 (1,91)	3,90 (1,66)	4,36 (1,85)	6,02 (2,50)
CMMN	0,41(0,44)	0,99(0,64)	0,47(0,51)	0,51(0,39)	1,12(0,88)
IP	1,54 (0,14)	1,45 (0,14)	1,68 (0,15)	1,47 (0,12)	1,51 (0,15)
Fase 2					
N. de sujetos	ND	55	53	55	27
CBMN		4,96 (2,00)	4,64 (2,45)	5,98 (2,03)	8,64 (2,809)
MNL		5,41 (2,25)	5,02 (2,95)	6,35 (2,18)	8,98 (2,93)
CMMN		0,87(0,65)	0,44(0,46)	0,70(0,45)	1,65(0,62)
IP		1,72 (0,14)	1,66 (0,20)	1,40(0,18)	1,51 (0,14)
Fase 3					
N. de sujetos	ND	ND	50	56	26
CBMN			5,61(3,08)	3,91 (1,99)	7,38(2,41)
MNL			5,96 (3,23)	4,13 (2,20)	8,17 (2,72)
CMMN			0,82(0,54)	0,55(0,42)	0,98(0,60)
IP			1,43 (0,17)	1,41 (0,14)	1,45(0,20)

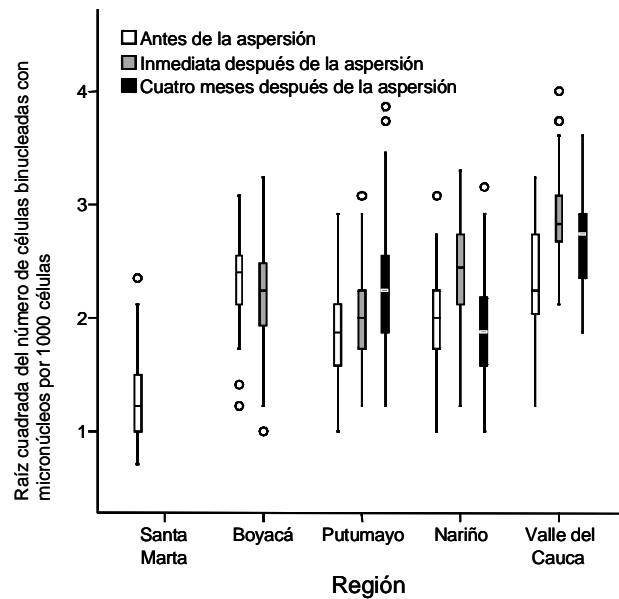


FIG. 1. Trazado de la frecuencia de CBMN en las cinco regiones de estudio con muestras recolectadas antes de la aspersión, 4-5 días después de la aspersión y 4 meses después de la aspersión. Trazado: La línea central horizontal señala la mediana de la muestra. La longitud de cada recuadro muestra el rango en el cual caen el 50% de los valores, con el extremo superior y el inferior del recuadro en el primer y tercer cuartiles. Las líneas T verticales representan intervalos en los cuales caen el 90% de los valores. Los símbolos \circ representan los valores atípicos. Ver el texto para la descripción de las diferencias estadísticamente significativas.

en Putumayo, ni en Boyacá, un mes después de la primera muestra. Los datos sugieren que la mayor exposición a agentes genotóxicos en estas poblaciones sea independiente de la exposición a los productos del glifosato.

El índice de proliferación (IP) en todos los grupos estudiados estuvo en el rango de los valores normales descritos en la literatura. No se observó una disminución significativa del IP asociada a la exposición ambiental en grupos de individuos de diferentes regiones. Se encontró un coeficiente de correlación estadísticamente significativo (0,288) entre los valores del IP de la primera y la segunda muestras, confirmando la asociación con las características individuales y no con la toxicidad relacionada con la exposición o con las técnicas de cultivo.

Debido a la baja frecuencia observada, los datos referentes a otras alteraciones nucleares, incluyendo el análisis del citoma (Fenech 2007), no se describen en la Tabla: la frecuencia media de puentes nucleoplasmáticos (PNP) para todos los individuos fue 0,010 por 1000, la de *buds* nucleares fue 0,022 por 1000 y sólo se encontraron en algunas muestras escasas células necróticas y apoptóticas.

El sexo fue la variable demográfica más importante que afectaba el índice de CBMN. Las frecuencias de CBMN en mujeres fueron mayores que en los hombres (media $4,43 \pm 2,36$ vs. $3,61 \pm 1,82$ respectivamente en la población total) (Tabla 3). Los grupos de sujetos eventualmente fueron pareados por sexo, incluyendo en el estudio sólo parejas. No se encontró asociación entre la frecuencia de MN y la edad como variable categórica, ni hubo asociación con el tabaquismo, pero la prevalencia de éste fue baja ($\approx 10\%$ en la población total). Se observó una frecuencia basal de MN más alta en individuos afrodescendientes, lo cual sugiere una mayor susceptibilidad. Otros factores del estilo de vida como el consumo de alcohol, de café o de drogas ilícitas no estaban asociados con las mediciones iniciales de CBMN y de CMMN.

Ciento treinta y cuatro de 152 individuos en Nariño, Putumayo y el Valle reportaron información sobre contacto con Glyphos® y Cosmo-Flux® después de la aspersión de erradicación. Los 18 restantes no suministraron información en la segunda encuesta o las muestras de sangre fueron inadecuadas para la prueba de micronúcleos. Sesenta y seis (49,2%) no reportaron contacto con la aspersión y 68(50,8%) reportaron haber estado en contacto con ella por haber ingresado a los campos asperjados o reportaron contacto con gotas de la aspersión. La media de CBMN en Nariño y Putumayo fue mayor en los encuestados que autoinformaron exposición, pero las diferencias no fueron

estadísticamente significativas (Tabla 4). En el Valle, sólo un encuestado reportó contacto con glifosato.

La región, el sexo y la edad mayor (≥ 35 años) fueron las únicas variables asociadas con la frecuencia de CBMN antes de la aspersión (Tabla 5). De hecho, utilizando como referencia a Santa Marta, donde no se reportó empleo de plaguicidas, Boyacá, el Valle del Cauca, Putumayo y Nariño mostraron una frecuencia media de CBMN significativamente más alta. También hubo diferencias estadísticamente significativas entre Boyacá y Valle, y Putumayo y Nariño. Las mujeres tuvieron una frecuencia media de CBMN estadísticamente mayor que los hombres, después de ajustar las demás variables. La edad mayor también se asoció a una mayor frecuencia de CBMN. Ni la exposición a productos genotóxicos, ni la raza, ni la ingesta de ácido fólico se asociaron a la frecuencia de CBMN en la primera muestra. El análisis de regresión lineal múltiple de la diferencia entre la segunda y la primera muestras, una vez ajustadas las demás variables, sólo demostró una asociación estadísticamente significativa con la región indicando que Putumayo, Nariño y el Valle tenían diferencias entre la segunda y la primera muestras significativamente mayores que Boyacá.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio fue probar si había una asociación entre la aspersión aérea del glifosato y las alteraciones genéticas, evaluadas como la frecuencia de MN en los leucocitos periféricos. Se llevó a cabo biomonitorización en tres regiones de Colombia en poblaciones expuestas a la aspersión aérea de glifosato: Putumayo y Nariño, donde la aplicación se realizaba para la erradicación de la coca y la amapola y el Valle del Cauca, donde el herbicida se empleaba para la maduración de la caña de azúcar. También se seleccionaron dos poblaciones control, no expuestas a la aspersión aérea de glifosato: la primera, de la Sierra Nevada de Santa Marta donde se cultiva café orgánico sin el uso de plaguicidas y la otra, Boyacá, una región de cultivos ilícitos, donde se lleva a cabo erradicación manual y los sujetos están potencialmente expuestos a varios plaguicidas pero no a glifosato para aspersión aérea. El análisis *ex-vivo* de los leucocitos en la presencia de citochalasin B, adicionada 44 horas después de iniciado el cultivo hace posible diferenciar las células mononucleadas no divididas –como un índice de daño cromosómico acumulado– de las células binucleadas, las cuales habían terminado una división nuclear durante el cultivo *in vitro* y expresado MN asociados con la exposición reciente a agentes genotóxicos.

TABLA 3.

Asociación del promedio de la frecuencia de células binucleadas (primera muestra) con micronúcleos (CBMN/1000 linfocitos binucleados) y variables demográficas.

Variable	Santa Marta	Boyacá	Putumayo	Nariño	Valle del Cauca	Total
SEXO						
Mujeres	1,98 (1,03)	6,22 (1,79)	3,91(1,71)	4,57(1,77)	6,45(2,82)	4,43(2,36)
Hombres	1,68(0,90)	5,06(1,46)	3,31(1,25)	3,66(1,39)	5,05(1,94)	3,61(1,82)
p	0,236	0,007	0,131	0,028	0,138	0,002
Edad						
18-24 años	2,00 (1,14)	5,50 (1,96)	3,32 (1,25)	3,64 (1,72)	6,19 (2,15)	3,67 (2,16)
25-34 años	1,66 (0,87)	5,70 (1,66)	3,53 (1,17)	4,20 (1,77)	4,20 (0,76)	3,97 (2,08)
35 y más	1,93 (0,67)	5,62 (1,73)	3,84 (1,86)	4,25 (1,52)	6,04 (2,84)	4,41 (2,19)
p	0,438	0,929	0,574	0,564	0,313	0,093
Raza						
Mestizo	1,83 (0,97)	5,64 (1,72)	3,72 (1,52)	4,75 (1,06)	5,82 (2,44)	3,94(2,24)
Afroamericano e indígena	0	0	2,86 (1,31)	4,10 (1,66)	5,64 (2,65)	4,20(1,90)
p			0,162	0,588	0,850	0,368
Tabaquismo						
Si	2,00 (1,06)	5,33 (0,76)	3,31 (1,00)	4,77 (1,51)	4,50 (1,41)	3,83 (1,60)
No	1,82 (0,97)	5,65 (1,76)	3,80 (1,56)	4,03 (1,66)	5,90 (2,57)	4,07 (2,20)
p	0,693	0,756	0,395	0,233	0,459	0,592
Ingesta de ácido fólico (cuartiles)						
1	1,92 (0,99)	6,11 (1,95)	3,23 (1,12)	4,50 (1,75)	5,86 (2,34)	3,89 (2,23)
2	1,64 (0,66)	5,70 (1,75)	3,47 (1,49)	3,80 (1,47)	5,86 (2,74)	3,97 (2,21)
3	1,69 (0,92)	5,69 (1,82)	4,00 (1,37)	3,85 (2,04)	6,58 (2,84)	4,47 (2,22)
4	1,94 (1,20)	4,94 (1,13)	3,69 (2,429)	4,28 (1,51)	4,63 (2,05)	3,75 (1,89)
p	0,779	0,399	0,515	0,645	0,612	0,220

TABLA 4.

Frecuencia media de células binucleadas con micronúcleos (CBMN) en la segunda muestra por 1000 linfocitos binucleados y autoinforme de exposiciones a la aspersión de glifosato en tres áreas donde ha habido aplicación aérea

Ruta de exposición	Nariño (n=55)		Putumayo (n=53)		Valle del Cauca (n=26)	
	n	Media CBMN (DE)	n	Media CBMN (DE)	n	Media CBMN (DE)
Sin exposición	28	5,81 (1,85)	13	3,84 (1,30)	25	8,56 (2,90)
Aspersión en el aire	5	7,30 (0,57)	1	5,50 (0)		
Aspersión en la piel	8	5,62 (1,60)	15	4,90 (1,87)	1	9,50 (0)
Ingreso a un campo asperjado	14	6,06 (2,77)	24	4,87 (3,18)		
Valor p (ANOVA)		0,472		0,612		0,760
Cualquier exposición	27	6,16 (2,22)	40	4,90 (2,69)	1	9,50 (0)
Valor p (sin exposición vs. cualquier exposición)		0,525		0,181		0,760

Nota: Los datos incluyen a quienes respondieron la segunda encuesta, de quienes se obtuvieron muestras de sangre.

TABLA 5.

Análisis de regresión lineal múltiple ajustada por región, edad, sexo, raza e ingesta de ácido fólico

Variable	Coefficiente	p	IC 95%
Región			
Boyacá	3,75	≤0,0001	3,19, 4,31
Putumayo	1,58	≤0,0001	1,00, 2,16
Nariño	2,06	≤0,0001	1,49, 2,64
Valle del Cauca	3,65	≤0,0001	2,92, 4,39
Edad			
25-34	0,28	0,250	- 0,20,
35 y más	0,75	0,008	0,76
			0,20, 1,31
Sexo			
Mujeres	1,00	≤0,0001	0,60, 1,40

El nivel basal de daño cromosómico, evaluado como la frecuencia de CBMN, se asoció con las diferentes regiones consideradas en nuestro estudio. La frecuencia de CBMN antes de la aspersión, también se asoció con la región, el sexo y la edad. La diferencia de sexo en la incidencia previa de MN en los leucocitos periféricos, una frecuencia consistentemente mayor en las mujeres y una fuerte correlación entre la frecuencia de MN y el incremento en la edad, están bien documentadas (Bonassi et al., 1995,2001; Bolognesi et al., 1997a).

Los datos no demostraron un efecto significativo del tabaquismo, confirmando los hallazgos de la literatura (Bonassi et al., 2003), pero la prevalencia de tabaquismo en nuestra población de estudio fue baja (7-20%, Tabla 1). No se observó asociación con el consumo de alcohol. Una mayor frecuencia basal de CBMN y una mayor frecuencia en el segundo período muestreado sugirieron una mayor susceptibilidad de los sujetos afrodescendientes en comparación con el grupo de sujetos mestizos.

Hubo algún indicio de asociación entre las CBMN y la exposición a plaguicidas en general. La menor frecuencia de CBMN se observó en la Sierra Nevada de Santa Marta, donde los individuos autoinformaron no utilizar plaguicidas. La frecuencia media de CBMN en este grupo de individuos ($1,83 \pm 0,97$) fue similar a la observada en sujetos sanos no expuestos para el mismo rango de edad (Bolognesi et al. Comunicación personal). Las medias de las frecuencias más altas de CBMN observadas en Boyacá y el Valle del Cauca ($5,64 \pm 1,72$ y $5,75 \pm 2,48$, respectivamente) y en Nariño y Putumayo ($4,12 \pm 1,65$ y $3,65 \pm 1,51$, respectivamente), comparadas con Santa Marta, están acordes con estudios de biomonitorización similares

llevados a cabo en sujetos expuestos a plaguicidas, utilizando la prueba de MN u otros indicadores genéticos de resultado (Bolognesi 2003, Bull et al., 2006).

No hubo una clara relación entre las CBMN y el uso reportado de plaguicidas clasificados como genotóxicos. Los participantes en Boyacá y el Valle del Cauca mostraron mayor frecuencia de CBMN que los de Putumayo y Nariño. Sin embargo, una mayor proporción de participantes en las últimas regiones autoinformó uso de plaguicidas genotóxicos (76,6% en Nariño y 61,7% en Putumayo). No se dispone de información sobre otros factores relevantes como la frecuencia de uso, la dosis aplicada, el tiempo de exposición y las medidas protectoras empleadas y por consiguiente no se caracterizan las exposiciones para explicar las diferencias. Hubo otras inconsistencias, por ejemplo en Boyacá, donde se esperaba un uso más frecuente de plaguicidas, sólo 24,2% de los participantes autoinformaron un uso comparado con los valores más altos de Nariño y Putumayo. No obstante, es posible que en áreas como Boyacá, los individuos pudieran estar potencialmente expuestos a plaguicidas persistentes aplicados en el pasado y aún presentes en el ambiente.

No hubo evidencia de una asociación entre las CBMN y la deficiencia de ácido fólico. Una evaluación de la ingesta de ácido fólico a partir de la encuesta semicuantitativa de frecuencia de ingesta mostró que, de acuerdo con las recomendaciones aceptadas (Herbert 1987), la dieta de las poblaciones de estudio no era deficiente en ácido fólico y que sólo había pequeñas diferencias entre las regiones. En consistencia con estos datos, no se encontró asociación entre los MN y la ingesta de ácido fólico, como variable continua o por cuartiles.

La frecuencia de CBMN aumentó después de las aspersiones con glifosato pero no de manera consistente. Los resultados obtenidos con una segunda muestra, tomada inmediatamente después de la aspersión de glifosato, mostró un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de CBMN en las tres regiones donde se asperjó glifosato. No obstante, este hallazgo no fue consistente con las dosis de aplicación utilizadas en las regiones. El aumento en la frecuencia de CBMN en el Valle (dosis de aplicación = 1 kg a.e. glifosato/ha) fue mayor en Nariño y Putumayo ($3,69$ kg a.e. glifosato/ha).

No hubo asociación significativa entre el contacto directo autoinformado con las aspersiones de erradicación y la frecuencia de CBMN. Al comparar la frecuencia de CBMN en participantes que autoinformaron haber estado expuestos a glifosato porque habían entrado al campo inmediatamente después de la aspersión (para recoger hojas de coca), habían sentido caer gotas en su piel o creían haber

estado expuestos porque habían tenido contacto con el químico en el aire, se observó un incremento, pero no estadísticamente significativo, en la frecuencia de MN entre los individuos directamente expuestos y los que vivían en la misma zona pero que no estuvieron presentes durante la aspersión. La disminución en la frecuencia de CBMN en el periodo de recuperación después de la aspersión de glifosato no fue consistente. La tercera muestra, 4 meses después de la aspersión, demostró una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de CBMN sólo en Nariño.

En general, estos resultados sugieren que el daño genotóxico asociado a la aspersión con glifosato, evidenciado mediante la prueba de MN, es bajo y al parecer transitorio. Las frecuencias de CBMN en Nariño y Putumayo, durante la segunda y la tercera muestras, cayeron dentro del rango de valores observados en Boyacá, una zona en la cual las personas estaban expuestas a una mezcla compleja de diferentes plaguicidas (incluyendo glifosato). En el Valle del Cauca se observó un mayor aumento en la frecuencia de CBMN, pero éste no se puede atribuir solamente a la exposición al glifosato, puesto que la dosis de aplicación del herbicida en esta área fue un tercio de la dosis de Nariño y Putumayo. Esta conclusión está adicionalmente sustentada por la frecuencia de MN en células mononucleadas (CMMN), que indica el nivel previo de mutaciones cromosómicas o genómicas acumuladas *in vivo* (Manteuca et al., 2006). Un aumento estadísticamente significativo de CMMN fue observado en Boyacá y el Valle del Cauca antes y después de las aspersiones aéreas, lo cual sugiere que la exposición a otros compuestos genotóxicos en estas poblaciones era independiente de la exposición al glifosato. La evidencia indica que el riesgo genotóxico potencialmente asociado con la exposición al glifosato, en áreas en las que el plaguicida es aplicado para la erradicación de la coca y la amapola, es de poca relevancia biológica. Una de las fortalezas de nuestro estudio fue la detección de daño cromosómico, evaluado como la frecuencia de MN en la sangre periférica de los sujetos expuestos, dada la posibilidad de comparar los niveles basales, previos a la aspersión, con los efectos detectados inmediatamente después de ésta. El glifosato persiste en el medio ambiente durante un corto tiempo (la vida media para disponibilidad biológica en el suelo y los sedimentos es horas, 1-3 días en el agua (Giesy et al., 2000), es rápidamente excretado por los mamíferos y otros vertebrados (Williams et al., 2000, Acquavella et al., 2004) y se espera que tenga efectos crónicos.

Uno de los principales inconvenientes de los estudios de epidemiología ambiental es la caracterización de la exposición a los agentes que están siendo investigados. En este estudio se utilizaron dos

abordajes para caracterizar las exposiciones al glifosato; el ecológico y el del autoinforme. En el diseño de estudio ecológico, se comparó la frecuencia de CBMN en los participantes de diferentes regiones con diferentes patrones de uso de plaguicidas. Según se expuso anteriormente (Sanin et al., 2009), este diseño ecológico puede determinar una clasificación errónea de las exposiciones (Arbuckle et al., 2004) pero, como evaluación exploratoria de la exposición, es útil (Ritter et al., 2006).

Otros autores han intentado mejorar la evaluación de la exposición a los plaguicidas en los estudios epidemiológicos. Un estudio utilizó un cuestionario auto administrado para evaluar la exposición a glifosato, la cual fue definida como a) alguna vez personalmente mezcló o aplicó productos que contenían glifosato; b) días de uso acumulativo durante la vida o “días de exposición acumulativa” (veces al día por años de uso/año); y c) días de exposición acumulativa ponderada por intensidad (veces al día por años de uso/ nivel de intensidad de las veces estimadas en el año (De Roos et al., 2005). Recientemente fue desarrollada una calificación de la exposición a plaguicidas basada en el autoinforme de las prácticas laborales para estimar el nivel de exposición anual (Firth et al., 2007). Con base en un algoritmo para calcular la exposición al glifosato durante la vida, a partir de la información del cuestionario, se encontró una correlación moderada con las concentraciones de glifosato en orina y ninguna correlación con la exposición autoinformada (Acquavella et al., 2004).

En nuestro estudio, se utilizaron preguntas relacionadas con el contacto directo con la aspersión, pero éstas no consideraron el área de piel expuesta, la región de piel expuesta, las diferencias en las dosis de penetración, ni la higiene personal.

Dada esta situación, se utilizó el mejor enfoque posible, una cohorte prospectiva, pero reconocemos la necesidad de utilizar mejores procedimientos. Con base en las guías aplicables de Bradford-Hill (Hill 1965), no es posible asignar causalidad al aumento en la frecuencia de CBMN observada en nuestro estudio. Hubo una menor frecuencia de CBMN y CMMN en la región sin uso de plaguicida en comparación con las regiones donde se utilizaron plaguicidas (incluido el glifosato), lo cual es consistente con otros reportes de la literatura. Aunque la temporalidad quedó satisfecha con el aumento en la frecuencia de CBMN después de la aspersión, esta respuesta no mostró fuerza en cuanto no se correlacionó consistentemente con la dosis de aplicación. La recuperación también fue inconsistente con la disminución en la frecuencia de CBMN en las áreas de aspersiones para erradicación, pero no lo fue en las áreas donde se aplicaron dosis menores en la caña de

azúcar. Se requieren estudios adicionales para caracterizar mejor el potencial riesgo genotóxico asociado a la aplicación del glifosato para la maduración de la caña de azúcar. El bajo número de individuos incorporado en este estudio y la escasa información sobre la exposición impiden cualquier conclusión. En Colombia se utilizan muchos plaguicidas en la agricultura convencional y en la producción de coca también (Solomon et al., 2007a; 2007b), sin embargo, no se dispone de suficiente información para correlacionar la frecuencia de MN con la exposición a plaguicidas.

REFERENCIAS

- Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., and Bleeke, M. 2004. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study, *Environ. Health Persp.*, 112:321-326.
- Arbuckle, T. E., Cole, D. C., Ritter, L., and Ripley, B. D. 2004. Farm children's exposure to herbicides: Comparison of biomonitoring and questionnaire data, *Epidemiology* 15:187-194.
- Baylis, A. D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects, *Pest Manage. Sci.*, 56:299-308.
- Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res.*, 543:251-272.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, D., Pasquini, P., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., and Bonassi, S. 1997a. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes, *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 6:249-256.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggeri, P., and Abbondandolo, A. 1997b. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation, Roundup, *J. Agric. Food. Chem.*, 45:1957-1962.
- Bonassi, S., Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Bigatti, P., Camurri, L., Dalpra, L., De Ferrari, M., Forni, A., Lando, C., Padovani, P., Pasquini, R., Stella, M., and Puntoni, R. 1995. Influence of sex on cytogenetic endpoints: evidence from a large human sample and review of the literature, *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 4:671-679.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., and Zijno, A. 2001. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.*, 37:31-45.
- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.-P., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Fenech, M., and The HUMN collaborative group. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project, *Mutat. Res.*, 543:155-166.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., and Battershill, J. M. 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review, *Mutagenesis*, 21:93-103.
- Costa, C., Teixeira, J. P., Silva, S., Roma-Torres, J., Coelho, P., Gaspar, J., Alves, M., Laffon, B., Rueff, J., and Mayan, O. 2006. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides, *Mutagenesis*, 21:343-350.
- De Roos, A. J., Blair, A., Rusiecki, J. A., Hoppin, J. A., Svec, M., Dosemeci, M., Sandler, D. P., and Alavanja, M. C. 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study, *Environ Health Persp.*, 113:49-54.
- De Roos, A. J., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Holmes, F. F., Burmeister, L. F., and Blair, A. 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men, *Occup. Environ. Med.*, 60:E11.
- Dimitrov, B. D., Gadeva, P. G., Benova, D. K., and Bineva, M. V. 2006. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems, *Mutagenesis*, 21:375-382.
- Duke, S. O., and Powles, S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide, *Pest Manage. Sci.*, 64:319-325.
- Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., and Akerman, M. 2008. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis, *Int. J. Cancer*, 123:1657-1663.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Prot.*, 2:1084-1104.
- Fenech, M., and Morley, A. A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 147:29-36.
- Fenech, M., and Rinaldi, J. 1994. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid, *Carcinogenesis*, 15:1405-1411.
- Firth, H. M., Rothstein, D. S., Herbison, G. P., and McBride, D. I. 2007. Chemical exposure among NZ farmers, *Int. J. Environ. Health Res.*, 17:33-44.
- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R., and Dunkelberg, H. 1997. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone marrow micronucleus test, *Arch. Toxicol.*, 71:193-197.
- Giesy, J. P., Dobson, S., and Solomon, K. R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167:35-120.
- Gopalan, H. N. B., and Njagi, G. D. E. 1981. Mutagenicity testing of pesticides: III. *Drosophila*: recessive sex-linked lethals, *Genetics.*, 97 (Suppl):S44.
- Grisolia, C. K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides, *Mutat. Res.*, 518:145-150.
- Hardell, L., and Eriksson, M. 1999. A case-control study of non-hodgkin lymphoma and exposure to pesticides, *Cancer*, 85:1353-1360.
- Hardell, L., Eriksson, M., and Nordstrom, M. 2002. Exposure to pesticides as risk factor for non-Hodgkin's lymphoma and hairy cell leukemia: pooled analysis of two Swedish case-control studies, *Leuk. Lymphom.*, 43:1043-1049.
- Herbert, V. 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of folate in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 45:661-670.
- Heydens, W. F., Healy, C. E., Hotz, K. J., Kier, L. D., Martens, M. A., Wilson, A. G. E., and Farmer, D. R. 2008. Genotoxic potential of glyphosate formulations: Mode-of-action investigations, *J. Agric. Food. Chem.*, 56:1517-1523.
- Hill, A. B. 1965. The environment and disease: association or causation?, *Proc. R. Soc. Med.*, 58:295-300.

- Kier, L. D., Stegeman, S. D., Dudek, S., McAdams, J. G., Flowers, F. J., Huffman, M. B., and Heydens, W. F. 1997. Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor formulations, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 36 :305.
- Li, A. P., and Long, T. J. 1988. An evaluation of genotoxic potential of glyphosate, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10:537-546.
- Manteuca, R., Lombaert, N., V, A. P., Decordier, I., and Kirsch-Volders, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88:1515-1531.
- Marc, J., Bellé, R., Morales, J., Cormier, P., and Mulner-Lorillon, O. 2004a. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition, *Toxicol. Sci.*, 82:436-442.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., and Bellé, R. 2004b. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation, *Biol. Cell.*, 96:245-247.
- Martinez, A., Reyes, I., and Reyes, N. 2007. Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells, *Biomédica*, 27:594-604.
- McDuffie, H. H., Pahwa, P., McLaughlin, J. R., Spinelli, J. J., Fincham, S., Dosman, J. A., Robson, D., Skinnider, L., and Choi, N. W. 2001. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: Cross-Canada study of pesticides and health, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10:1155-1163.
- Monroy, C. M., Cortes, A. C., Sicard, D. M., and Groot, H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad de células humanas espuestas in vitro a glifosato, *Biomédica*, 25:335-345.
- Montero, R., Serrano, L., Araujo, A., Davila, V., Ponce, J., Camacho, R., Morales, E., and Mendez, A. 2006. Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes, *Mutagenesis*, 21:335-342.
- Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyasawa, T., Kato, K., and Shirasu, Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems, *Mutat. Res.*, 116:185-216.
- Paz-y-Miño, C., Sánchez, M. E., Arévalo, M., Muñoz, M. J., Witte, T., De-la-Carrera, G. O., and Paola, L. E. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate, *Genet. Mol. Biol.*, 30:456-460.
- Peixoto, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere*, 61:1115-1122.
- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., and Parodi, S. 1998. ³²P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup, *Environ. Mol. Mutagen.*, 31:55-59.
- Rank, J., Jensen, A. G., Skov, B., Pedersen, L. H., and Jensen, K. 1993. Genotoxicity testing of Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test and *Allium* anaphase-telophase test, *Mutat. Res.*, 300:29-36.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., and Seralini, G.-E. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase, *Environ. Health Persp.*, 113:716-720.
- Ritter, L., Goushoeff, N. C. I., Arbuckle, T., Cole, D., and Raizenne, M. 2006. Addressing the linkage between exposure to pesticides and human health effects -research trends and priorities for research 1, *J. Toxicol. Environ. Health. B*, 9:441-456.
- Rull, R. P., Ritz, B., and Shaw, G. M. 2006. Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications, *Am. J. Epidemiol.*, 163:743-753.
- Sanin, L.-H., Carrasquilla, G., Solomon, K. R., Cole, D. C., and Marshall, E. J. P. 2009. Regional differences in time to pregnancy among fertile women from five Colombian regions with different uses of glyphosate, *J. Toxicol. Environ. Health A.*, This issue
- Sirisattha, S., Momse, Y., Kitagawa, E., and Iwahashi, H. 2004. Genomic profile of roundup treatment of yeast using DNA microarray analysis, *Environ. Sci.*, 11:313-323.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Brain, R. A., Cerdeira, A. L., Crossan, A. N., Marshall, A. J., Sanin, L. H., and Smith, L. 2007a. Comparative hazard assessment of the substances used for production and control of coca and poppy in Colombia, in *Rational Environmental Management of Agrochemicals: Risk Assessment, Monitoring, and Remedial Action. ACS Symposium Series No. 966* (Vol. 966), eds. Kennedy, I. R., et al., Washington, DC, USA: American Chemical Society, pp. 87-99.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., and Sanin, L.-H. 2007b. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 190:43-125.
- UNODC. 2007. World Drug Report 2007, United Nations Office on Drugs and Crime, Accessed, January 29, 2008. <http://www.unodc.org/>
- USEPA. 1993. R.E.D. Facts Glyphosate, Technical Report EPA 738-R-93-014, United States Environmental Protection Agency.
- Wigle, D. T., Arbuckle, T. E., Turner, M. C., Berube, A., Yang, Q., Lui, S., and Krewski, D. 2008. Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants, *J. Toxicol. Environ. Health. B*, 11:373-517.
- Wildeman, A. G., and Nazar, R. N. 1982. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides, *Can. J. Genet. Cytol.*, 24:437-449.
- Williams, G. M., Kroes, R., and Munro, I. C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate, for humans, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 31:117-165.
- Woodburn, A. T. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide, *Pest Manage. Sci.*, 56:309-312.
- World Health Organization International Program on Chemical Safety 1994. *Glyphosate* (Vol. 159), Geneva: