

Programa de pos-graduación en Genética

Tesis de Maestría

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO POR
EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MERCURIO Y CADMIO EN
POBLACIONES INSULARES DEL DISTRITO DE
CARTAGENA, BOLÍVAR**

EDER JAIR CANO PÉREZ

Barraquilla (Atlántico), Colombia

2021

Universidad Simón Bolívar
Programa de pos-graduación en Genética

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO POR
EXPOSICIÓN AMBIENTAL A MERCURIO Y CADMIO EN
POBLACIONES INSULARES DEL DISTRITO DE
CARTAGENA, BOLÍVAR**

Tesis presentada al Programa de
Postgrado en Genética como
requisito parcial para obtener
el grado de Maestro.

EDER JAIR CANO PÉREZ

Tutor:

MSc. Dacia Malambo García
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

Cotutor:

PhD. Cristiano Trindade
UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR

Barraquilla (Atlántico), Colombia

2021

Dedicatorias

Dedico este trabajo principalmente a mis padres, Dioselina Pérez y Roberto Cano por todo el apoyo y el esfuerzo que realizaron para que yo lograra ser el profesional que hoy soy

A mis hermanos Kevin y Karen por los buenos momentos y la compañía

A mí querida abuela Micaela por sus sabios consejos, la crianza, el cuidado y el amor que siempre me brindó

A mis sobrinas Elizeth e Isabela por ser los grandes tesoros de la familia

A mis demás familiares que de una u otra forma aportaron su granito para poder cumplir mis sueños y metas

Dedico este logro a mi alma gemela, mi complemento y compañera de vida, Patricia Ospino. Gracias por toda la compañía, apoyo y amor

Agradecimientos

- Agradezco muy especialmente a mis tutores y asesores: la Profesora Dacia Malambo García, el Dr. Cristiano Trindade y la Dra. Doris Gómez, por enseñarme, apoyarme y guiarme en el camino de la investigación científica, nuevamente gracias por darme su confianza al otorgarme la responsabilidad de un proyecto de esta calidad y magnitud.
- A los profesionales Mashiel Fernández, Katia Gazabón y Yocelyn Cabarcas, por el acompañamiento y la ayuda que me brindaron durante la etapa de campo. Igualmente agradezco a todos los líderes comunitarios y habitantes de las comunidades de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba por su colaboración y participación en este trabajo
- Agradezco al Dr. Jose Luis Marrugo y a todo el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Universidad de Córdoba por su colaboración en los procesos y análisis de las muestras
- Agradezco al Grupo de Investigación UNIMOL y sus miembros, especialmente a Jaison Torres por toda su colaboración. Igualmente, agradezco a la Universidad de Cartagena por hacer posible este trabajo
- A todos los profesores y compañeros de posgrado, por el aprendizaje y todos los buenos momentos compartidos
- Finalmente, agradezco a la Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas, institución donde desarrollé mi formación postgrado.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas.....	10
Introducción.....	12
1. Problema de Investigación.....	15
1.1 Planteamiento del problema	15
1.2 Justificación	17
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Marco Teórico.....	19
4. Diseño Metodológico.....	33
4.1 Tipo de estudio.....	33
4.2 Área de estudio.....	33
4.3 Población y muestra.....	33
4.4 Criterios de selección y registro de los participantes.....	36
4.5 Obtención de las muestras biológicas.....	37
4.6 Análisis de metales pesados en sangre	37
4.7 Ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt)	38
4.8 Aspectos éticos y normas de bioseguridad.....	38
4.9 Análisis estadísticos.....	40
5. Resultados	42
5.1 Caracterización demográfica de la muestra poblacional.....	42
5.2 Marcador de exposición: análisis de mercurio y cadmio en sangre.....	45
5.3 Análisis de citoma de micronúcleo bucal.....	51
5.4 Correlaciones entre mercurio en sangre, variables demográficas y parámetros del BMCyt	57

6. Discusion.....	61
7. Conclusiones y Recomendaciones	
7.1 Conclusiones.....	74
7.2 Recomendaciones.....	75
8. Referencias bibliográficas	76

Resumen

La contaminación de los ecosistemas por metales pesados constituye un problema ambiental y de salud pública, principalmente en las poblaciones humanas directamente expuestas. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos genotóxicos causado por exposición ambiental a mercurio y cadmio en poblaciones de la zona insular del distrito de Cartagena, Bolívar. Un total de 94 individuos de las comunidades de Ararca (n= 16), Barú (n= 31), Caño del Oro (n= 22) y Tierra Bomba (n= 25) participaron en el estudio. Se midieron las concentraciones de mercurio y cadmio en sangre y se utilizó el ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt) para evaluar los efectos de la exposición. Se establecieron diferencias entre grupos y se realizaron análisis de correlación y regresiones ajustadas. La mediana de mercurio en sangre (7,34 µg/L; RIQ: 4,54 -11,20) de los individuos estudiados estuvo por encima del límite permitido por la OMS (5,0 µg/L). Veinte individuos presentaron cadmio en sangre, cuya mediana (0,45 µg/L, RIQ: 0,33-1,02) estuvo muy por debajo del límite sugerido por el CDC (5,0 µg/L). El consumo de pescado y el tiempo de residencia en la zona se correlacionaron significativamente con el mercurio en sangre. Las frecuencias de micronúcleos, cariorrexis y cariólisis fue significativamente mayor en los habitantes que presentaron mercurio >10 µg/L en comparación con las personas que presentaron niveles inferiores al umbral permitido (<5 µg/L). Adicionalmente, los análisis de correlaciones y regresiones ajustadas por variables de confusión mostraron que el Hg en sangre es un predictor consistente para la frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y cariólisis. Los hallazgos descritos permiten pensar que se debe prestar más atención en la prevención primaria por contaminación con metales pesados en estas poblaciones, especialmente el mercurio.

Palabras clave: cadmio, citotoxicidad, genotoxicidad, mercurio, metales pesados, micronúcleo, mucosa bucal

Abstract

Contamination of ecosystems by heavy metals constitutes an environmental and public health problem, mainly in exposed human populations. The objective of this study was to evaluate the genotoxic effects caused by environmental exposure to mercury and cadmium in populations of the insular zone of the Cartagena, Bolívar. A total of 94 individuals from the communities of Ararca (n= 16), Barú (n= 31), Caño del Oro (n= 22) and Tierra Bomba (n= 25) participated in the study. Mercury and Cadmium concentrations in blood were measured and the buccal micronucleus cytome assay (BMCyt) was used to assess the effects of exposure. Differences between groups were established and correlation analyzes and adjusted regressions were performed. The median blood mercury (7.34 µg/L; IQR: 4.54 - 11.20) of the individuals studied was above the limit allowed by the WHO (5.0 µg/L). Only 20 individuals presented cadmium in their blood, whose median (0.45 µg / L, IQR: 0.33-1.02) was well below the limit suggested by the CDC (5.0 µg/L). Fish consumption and time of environmental exposure were significantly correlated with blood mercury. The frequency of micronuclei, karyorrhexis, and karyolysis was significantly higher in the inhabitants who presented mercury above 10 µg/L compared to the people who presented levels below the permitted threshold (<5 µg/L). Furthermore, correlation analyzes and regressions adjusted for confounding variables showed that Hg in the blood is a consistent predictor for the frequency of micronuclei, karyorrhexis, and karyolysis. The findings described suggesting that more attention should be paid to primary prevention due to contamination with heavy metals in these populations, especially mercury.

Keywords: cadmium, cytotoxicity, mercury genotoxicity, heavy metals, micronucleus, buccal mucosa

Lista de figuras

Pág.

Ilustración 1. Concentraciones promedio de varios metales medidos en los sedimentos de la bahía de Cartagena **¡Error! Marcador no definido.**9

Ilustración 2. Mecanismos moleculares de la genotoxicidad del mercurio ... **¡Error! Marcador no definido.**

Ilustración 3. Mecanismos moleculares de la genotoxicidad del cadmio **¡Error! Marcador no definido.**

Ilustración 4. Parámetros del ensayo del citoma de micronúcleo bucal **¡Error! Marcador no definido.**

Ilustración 5. Localización de los sitios de estudio. Comunidades de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, Distrito de Cartagena, Bolivar . **¡Error! Marcador no definido.**

Ilustración 6. Tendencia de los niveles de mercurio en sangre con la edad y tiempo de residencia en el sitio de estudio categorizado por sexo y en forma general **¡Error! Marcador no definido.**

Ilustración 7. Fotografías (100X) de los tipos de anomalías detectadas en células exfoliadas de la mucosa bucal. **¡Error! Marcador no definido.**

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Caracterización demográfica de la población de estudio	43
Tabla 2. Concentraciones de mercurio y cadmio en sangre de la población de estudio (mediana y RIQ) ($\mu\text{g/L}$).....	46
Tabla 3. Comparación entre las distintas categorías de niveles de cadmio en sangre. (mediana y RIQ) ($\mu\text{g/L}$).....	46
Tabla 4. Concentración de mercurio en sangre de acuerdo a sexo, edad, tiempo de residencia, consumo de agua y pescado en la población de estudio	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 5. Biomarcadores del ensayo de citoma de acuerdo a las categorías de niveles de mercurio en sangre (mediana y RIQ). ...	¡Error! Marcador no definido.1
Tabla 6. Biomarcadores del ensayo de citoma por comunidad estudiada (mediana y RIQ).....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 7. Biomarcadores del ensayo de citoma de acuerdo a las categorías de edad, tiempo de residencia y consumo de pescado (mediana y RIQ).	¡Error!
Marcador no definido.4	

Tabla 8. Correlación de Spearman entre variables demográficas, niveles de metales en sangre y biomarcadores del citoma ¡Error! Marcador no definido.	7
Tabla 9. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de micronúcleo considerando diferentes características sociodemográficas.....	59
Tabla 10. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de cariorrexis considerando diferentes características sociodemográficas.....	60
Tabla 11. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de cariólisis considerando diferentes características sociodemográficas.....	60
Tabla 12. Comparación de Hg en sangre con otras poblaciones colombianas expuestas.....	64
Tabla 13. Comparación de la frecuencia de micronúcleos con otras poblaciones expuestas a Hg.....	70

Introducción

Los metales pesados son un grupo de elementos que se encuentran naturalmente en la corteza terrestre, por tanto, se encuentran presentes en ecosistemas acuáticos y terrestres. No obstante, los efectos antropogénicos como las actividades derivadas de la industria y la investigación, han provocado un aumento en la concentración de una variedad de estos metales en los diferentes ambientes, consiguiendo cambios drásticos en los ciclos geoquímicos de estos elementos (1, 2).

Algunos metales como el zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y cobalto (Co) son requeridos por el cuerpo humano, aun así, pueden ser tóxicos si se ingieren en concentraciones más altas. Existen otros como el mercurio (Hg), cadmio (Cd) y plomo (Pb), que no se les conoce función o participación alguna en el metabolismo humano, de hecho, su acumulación en el cuerpo resulta ser perjudicial para la salud (3). Por esta razón, se podrían considerar como los metales pesados de más interés en investigación, siendo el efecto genotóxico (daño en el ADN) uno de los focos de estudio.

En la Costa Caribe colombiana, se ha reportado el hallazgo de altos niveles de estos metales en algunos ambientes acuáticos y terrestres impactados por actividades relacionadas con la minería (legal e ilegal) y la industria (4-6). Así mismo, también se ha documentado la presencia de estos metales en las poblaciones humanas del

caribe y los efectos que algunos de estos (Hg, Pb y Cd) ocasionan en la integridad del genoma en los habitantes de la región (7).

En el distrito de Cartagena en el departamento de Bolívar, se conoce que la Bahía de la ciudad ha sido uno de los ecosistemas acuáticos más influenciados por la contaminación de metales pesados a lo largo de los años. Las principales fuentes de contaminación provienen de las crecientes actividades industriales que rodean la Bahía y de los sedimentos que son arrastrados por el canal del dique desde otras áreas del departamento y el país, hacia la Bahía (8).

En los últimos años, diversos estudios ecológicos realizados en la zona han reportado la presencia niveles elevados de cromo (Cr), níquel (Ni), Cu, Cd y Hg en los sedimentos de la Bahía de Cartagena (8, 9). Además, existen informes en donde se ha identificado altos niveles de Cd en ostras (10) y niveles importantes de Hg en diferentes organismos marinos y terrestres de este cuerpo de agua, como peces (11, 12), crustáceos (13), moluscos (14) y aves (15). En cuanto a las poblaciones humanas, se han reportado niveles elevados de Hg en el cabello y sangre de habitantes de algunas comunidades costeras e insulares del distrito (13, 14, 16), que evidentemente debido a sus actividades pesqueras tradicionales y su permanente interacción con las zonas marinas impactadas, aumentan los riesgos de exposición a estos agentes que pueden ingresar al organismo mediante vías digestivas, respiratorias y cutáneas.

Al menos 6 comunidades de pescadores componen la zona insular y costera del

distrito de Cartagena, y en algunos de estos se ha mencionado que existe un aumento en la frecuencia de enfermedades congénitas o teratogénicas en sus habitantes (17, 18). Al respecto se desconoce si esta predisposición pudiera o no estar relacionada a la exposición ambiental a metales pesados. Igualmente, existe una carencia de estudios relacionados a los efectos que estos metales, en especial Hg y Cd, pueden ocasionar en el material genético de estas poblaciones expuestas. Por esta razón, es importante evaluar el efecto genotóxico asociado a los niveles de estos metales en sangre como medida preventiva en las comunidades directamente implicadas, ya que la inestabilidad en las células causadas por la naturaleza bioacumulable de estos metales puede dar lugar a enfermedades crónicas que con alguna frecuencia no se manifiestan de forma inmediata, pero sí de manera progresiva en el tiempo, afectando incluso la descendencia (3). Teniendo en cuenta estos antecedentes, este estudio propone evaluar mediante el ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt), el efecto genotóxico ocasionado por la presencia de concentraciones de Hg y Cd en sangre en poblaciones insulares y costeras del distrito de Cartagena, y establecer una correlación entre estas variables

1. Problema de Investigación

1.1 Planteamiento del problema

Hg y Cd son dos de los metales pesados más monitorizados en las poblaciones humanas expuestas, ya que la presencia de estos metales en el cuerpo resulta ser un riesgo para la salud (3). Por esta razón, la evaluación del efecto genotóxico asociado a los niveles de estos metales en sangre juega un papel fundamental en el monitoreo primario de la integridad y bienestar del material genético de las poblaciones.

Conociendo la presencia de estos elementos en el sedimento y organismos marinos de la Bahía de Cartagena, así como en los habitantes de múltiples comunidades pesqueras aledañas, posiblemente originada por vertimientos de industrias ubicadas en el área y a lo largo del canal del dique, es pertinente abordar esta problemática dándole prioridad en temas de salud pública, además de su implicación ecológica.

Algunas comunidades como Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, pertenecen a los anexos periurbanos y rurales de la zona costera e insular del distrito de Cartagena. Estas comunidades presentan condiciones notablemente vulnerables, con niveles bajos de educación e ingresos, con economías mayormente basada en el turismo y la pesca, con poco o ningún acceso a acueducto o alcantarillado y limitado acceso en la atención en salud (19, 20). Así

mismo, las evidencias arrojadas por algunas investigaciones encaminadas a la evaluación de metales pesados en algunas de estas comunidades revelan un panorama aún más desfavorable (13, 16), y dada la carencia de estudios tendientes a valorar el efecto que metales como Hg y Cd pueden inducir en el genoma de las poblaciones más expuestas, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe una relación entre las concentraciones de Hg y Cd en sangre y el daño en el material genético detectado mediante el análisis de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt) en las comunidades costeras e insulares del distrito de Cartagena-Bolívar, Colombia?

1.2 Justificación

Los resultados de este proyecto fortalecerá el campo de estudio relacionado con los efectos genotóxicos causado por metales pesados en las poblaciones más expuestas del distrito de Cartagena, que sentarán bases sólidas hacia la ejecución de futuras investigaciones dirigidas al biomonitoreo de estas y otras comunidades potencialmente expuestas a metales pesados en el distrito.

Desde el punto de vista social, los resultados de esta investigación proporcionarán información relevante que permitirán a los organismos de salud locales y departamentales fundamentar decisiones pertinentes relacionadas con el desarrollo de estrategias de salud pública encaminadas en la prevención y mitigación de los riesgos en la salud por exposición a metales pesados tanto en las poblaciones estudiadas como el distrito en general. Así mismo, permitirá a los organismos ambientales fortalecer las estrategias de educación ambiental a través de campañas sobre el buen manejo de los recursos hídricos y naturales en las comunidades estudiadas y otras potencialmente expuestas.

Igualmente, este proyecto representará la suficiencia en investigación de un estudiante del programa de Maestría en Genética de la Universidad Simón Bolívar, que le permitirá obtener su título a través del cumplimiento de uno de los requisitos de grado, contribuyendo así al fortalecimiento de los grupos de investigación de las Instituciones participantes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto genotóxico causado por exposición ambiental a mercurio y cadmio en poblaciones de la zona costera e insular del distrito de Cartagena, Bolívar

2.2. Objetivos específicos

- Analizar las concentraciones de mercurio total y cadmio total en la sangre de los habitantes de las zonas insulares de Cartagena
- Determinar las alteraciones presentes en el material genético mediante el análisis del citoma de micronúcleo en células de la mucosa bucal (BMCyt)
- Evaluar la correlación entre los niveles de metales en la sangre y los biomarcadores del BMCyt de los individuos de la zona costera e insular de Cartagena.

3. Marco Teórico

3.1. Problemática ambiental por metales pesados en la Bahía de Cartagena

La Bahía de Cartagena es considerado un punto importante para el desarrollo económico de la ciudad, constituyendo una de las zonas industrializadas más importantes del país, tanto el transporte como la ejecución de diversos procesos industriales dependen de este cuerpo de agua. Es conocido desde hace décadas la problemática ambiental que padece la Bahía de Cartagena debido a la contaminación multifactorial por metales pesados (8). Históricamente, se ha identificado altos niveles de Hg en los sedimentos a lo largo y ancho de la Bahía, en organismos marinos, aves y poblaciones humanas (14). Sin embargo, además del Hg, otros metales como Cr, Cu, Ni y Cd, se han encontrado en altas concentraciones en la superficie del sedimento de la Bahía de Cartagena (**Figura 1**) (8, 9).

La Bahía de Cartagena está hidrodinámicamente regulada por el Canal del Dique, una corriente de agua dulce que conecta el río Magdalena con el mar. Se ha reportado que esta corriente de agua transporta cerca de 2000 toneladas de sedimentos al día, provenientes de los terrenos de la cuenca del Magdalena, la cual cubre un área extensa de hasta 260.000 km², incluyendo muchas zonas de Colombia impactadas por la creciente industrialización. Por tanto, es sensato considerar esta entrada de agua dulce como la principal fuente y acumulación de metales pesados en la Bahía de Cartagena (8, 9). Otra posible fuente del aumento

de los metales podría ser las industrias de la zona de Mamonal que operan en la línea costera de la Bahía, sin embargo, se ha mencionado que no se cuenta con la suficiente evidencia sobre los vertimientos de estas industrias sobre el cuerpo de agua. Aun así, existe un referente histórico de contaminación por Hg causado por una planta de cloralkali que operaba en la Bahía entre 1967 y 1978, dejando concentraciones peligrosas de 33.2 mg/ kg en los sedimentos (21).

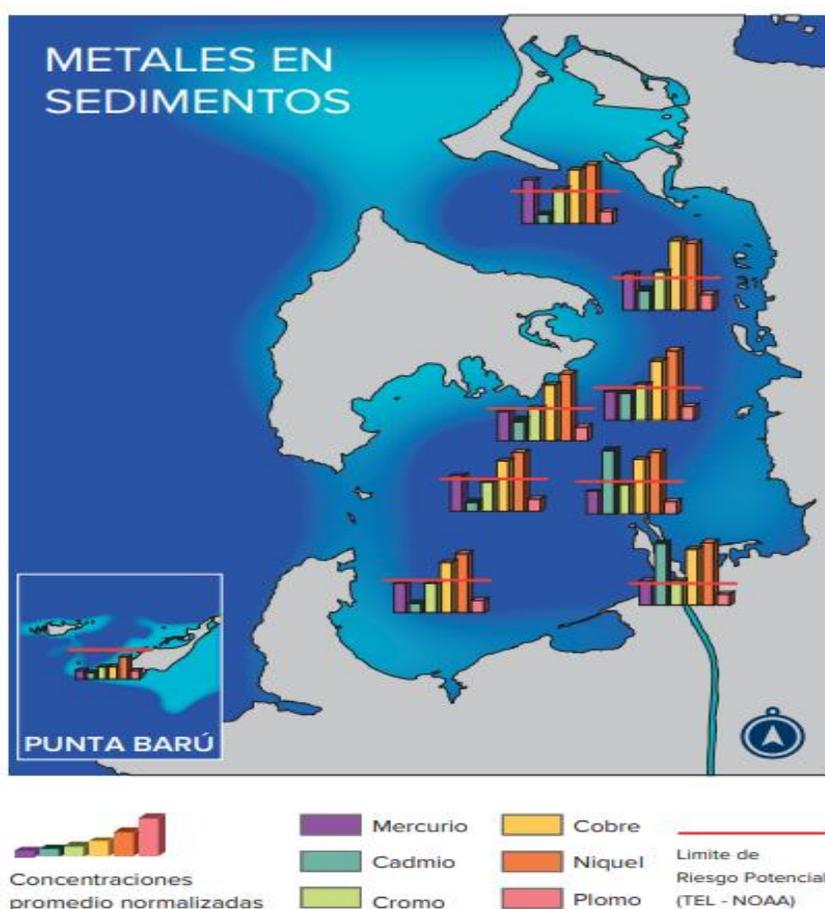


Figura 1. Concentraciones promedio de varios metales medidos en los sedimentos de la Bahía de Cartagena (tomado de Tasic, 2017 (9)).

3.2. Características, aplicaciones y fuentes de exposición a metales pesados

3.2.1. Mercurio

El Hg es considerado un contaminante global. En el medio natural, el Hg proviene de la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones volcánicas y la evaporación de las masas de agua. Es utilizado en pilas, lámparas y termómetros. También se lo usa en odontología, en las amalgamas para obturación de caries y en la industria farmacéutica (22). Las principales fuentes de emisión de Hg son la fabricación de cloro en celdas de Hg, producción de metales no ferrosos y la combustión de carbón mineral. Es tóxico y no se lo encuentra naturalmente en organismos vivos. Las intoxicaciones con Hg pueden provocar temblores, gingivitis, alteraciones psicológicas y aborto espontáneo. La principal ruta de ingreso a los seres humanos se da por la vía digestiva durante la ingesta de alimentos contaminados (especialmente organismos marinos como peces) y por vía respiratoria mediante la inhalación del vapor de Hg o aire contaminado (23). El promedio máximo permitido de Hg en sangre según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 5 µg/L (24).

3.2.2. Cadmio

El Cd se encuentra naturalmente en los minerales. Se utiliza generalmente como estabilizador en diferentes productos como pigmentos de color, varias aleaciones y en productos relacionados con el cloruro de polivinilo (PVC) (22). Otra fuente importante de exposición al Cd son los fertilizantes fosfatados (25). En humanos, la exposición prolongada al Cd puede ocasionar disfunción renal (26), enfermedades pulmonares (27), efectos neurotóxicos (28), puede provocar osteoporosis (29) y diferentes tipos de cáncer (3). La principal ruta de ingreso es mediante el consumo de alimentos marinos y otros alimentos de tipo vegetal. El promedio máximo permitido de Cd en sangre según el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) es de 5 µg/L (30).

3.3. Mecanismos de genotoxicidad causada por metales pesados

3.3.1. Mecanismos moleculares por el cual el mercurio causa daño en el ADN

Uno de los primeros mecanismos moleculares descritos para explicar las posibles consecuencias genotóxicas del Hg fue el estrés oxidativo (daño del ADN debido a la acción de los radicales libres generados por el metal) (31, 32). Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas que naturalmente desempeñan roles importante en la funcionamiento fisiológico y metabólico en las células, sin embargo,

también pueden causar daños en el ADN que consecuentemente pueden ocasionar el desarrollo de mutaciones y conducir a las células a procesos cancerígenos (33). Las especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) constituyen el principal tipo de radicales libres implicados en los mecanismos patogénicos. Entre los ROS más importantes encontramos: radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, singlete de oxígeno, radical alquilo, radical peróxilo y óxido nítrico (34). El Hg y sus compuestos poseen la capacidad de inducir daño celular a través de un aumento de los niveles de ROS y, por lo tanto, la producción de ROS es uno de los principales mecanismos moleculares involucrado en la genotoxicidad del Hg (34).

En general, los radicales libres pueden ocasionar mutaciones genéticas al interactuar directamente con el ADN o pueden inducir cambios conformacionales en las proteínas responsables de la formación y el mantenimiento del ADN, es decir, las enzimas reparadoras, las ADN polimerasas e incluso las proteínas motoras de tubulina y quinesina, responsables del huso mitótico y la segregación cromosómica (32, 35, 36). Por otro lado, además de una acción indirecta sobre el sistema de reparación del ADN (a través del aumento de radicales libres), el Hg también podría unirse directamente al núcleo de "dedos de zinc" de las enzimas reparadoras del ADN, afectando su actividad. Estos "dedos de zinc" son la secuencia específica de la cadena proteica que se une al ADN y contienen un átomo de zinc y cuatro cisteínas y/o histidinas. Por tanto, la alta afinidad del Hg por los grupos sulfhidrilos presentes en estas cisteínas pueden deformar gravemente la integridad estructural

y la actividad de las enzimas (37). Así mismo el Hg y sus compuestos también poseen la capacidad de interactuar directamente con la molécula de ADN formando aductos de ADN, sin embargo no se ha demostrado que la presencia de Hg cambie la conformación de la molécula de ADN, aun así estos datos ya apuntan a un mecanismo adicional que puede explicar los posibles efectos genotóxicos de los compuestos de Hg en el genoma de las células (38). La **figura 2** resume las diferentes vías por el cual el Hg y sus compuestos pueden afectar el ADN de una célula.

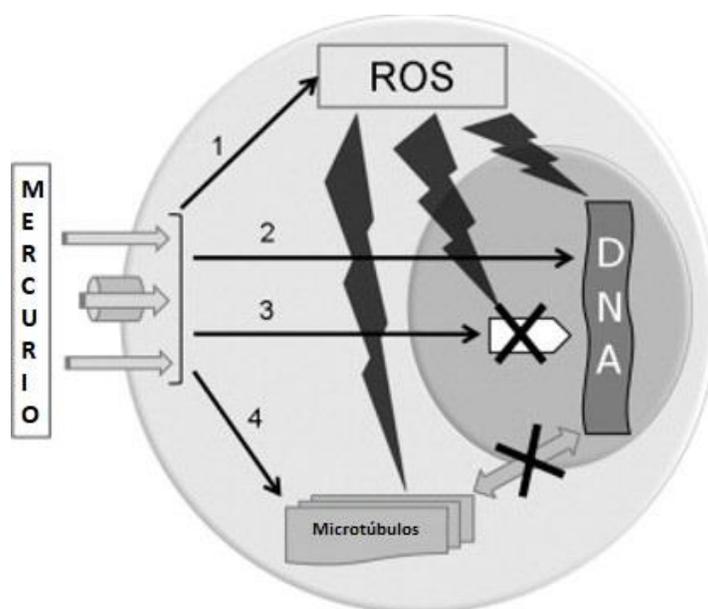


Figura 2. Mecanismos moleculares de la genotoxicidad del mercurio. 1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediado por Hg, los ROS pueden afectar el ADN de forma directa, o de forma indirecta afectando las enzimas de reparación y microtúbulos. 2. Unión directa entre el Hg y ADN (auctos de ADN). 3. Unión

directa entre el Hg y dedos de zinc de las enzimas reparadoras, evitando la reparación del ADN 4. Unión directa entre Hg y microtúbulos, evitando la formación de huso mitótico y la segregación cromosómica. (tomado y adaptado de Crespo-López et al, 2009 (31))

3.3.2 Mecanismos moleculares por el cual el cadmio causa daño en el ADN

Hasta ahora se ha identificado una variedad de diferentes mecanismos de acción en los que el Cd y sus compuestos pueden afectar la integridad del ADN, la **Figura 3** ofrece una descripción esquemática de las diferentes vías. El Cd ha sido clasificado como carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Dicha clasificación se basa en los resultados de múltiples estudios que han relacionado la exposición ocupacional al Cd con el cáncer de pulmón en humanos (39). Sin embargo, es prudente mencionar que también existen reportes que indican que el Cd posee un rol en la generación de otros tipos de cáncer en humanos, tales como el cáncer de riñón, hígado, sistema hematopoyético, vejiga, estómago, próstata y páncreas (40-43). En definitiva, toda la evidencia apunta que la exposición ambiental u ocupacional al Cd induce una inestabilidad genómica, que eventualmente resulta en la acumulación de alteraciones en el genoma que pueden provocar eventos carcinogénicos (44).

A diferencia del Hg, se ha mencionado que el Cd no posee capacidad de afectar el ADN de manera directa (interacción Cd-ADN) en el medio fisiológico, no obstante, algunas investigaciones indican que el Cd bivalente [Cd (II)] puede unirse al ADN aislado en condiciones *in vitro* (45). Al igual que el Hg, una propiedad característica de los compuestos de Cd que probablemente sea más relevante por su actividad genotóxica es la formación de ROS (46). Se ha observado que el Cd induce estrés oxidativo en modelos *in vitro* y también en experimentos con animales (47). Otros estudios han observado que, en células y tejidos expuestos al Cd, hubo una actividad reducida de las enzimas antioxidantes y del contenido de glutatión intracelular. Además, también se postuló que el Cd provoca la liberación de hierro de las membranas biológicas, lo que conduce a un aumento de las concentraciones de estos iones, que pueden participar en la producción de ROS (48).

Otro mecanismo relevante que puede conducir a la inestabilidad genética son las interacciones con los procesos de reparación del ADN (49). La evidencia experimental actual indica que el metal interfiere con todas las principales vías de reparación. Como se mencionó anteriormente en los mecanismos del Hg, uno de los modos de acción del Cd es la unión a las cisteínas en los dominios de dedos de zinc de las enzimas-proteínas, lo que conduce a alteraciones conformacionales y, finalmente, al deterioro de las funciones de estas enzimas (44).

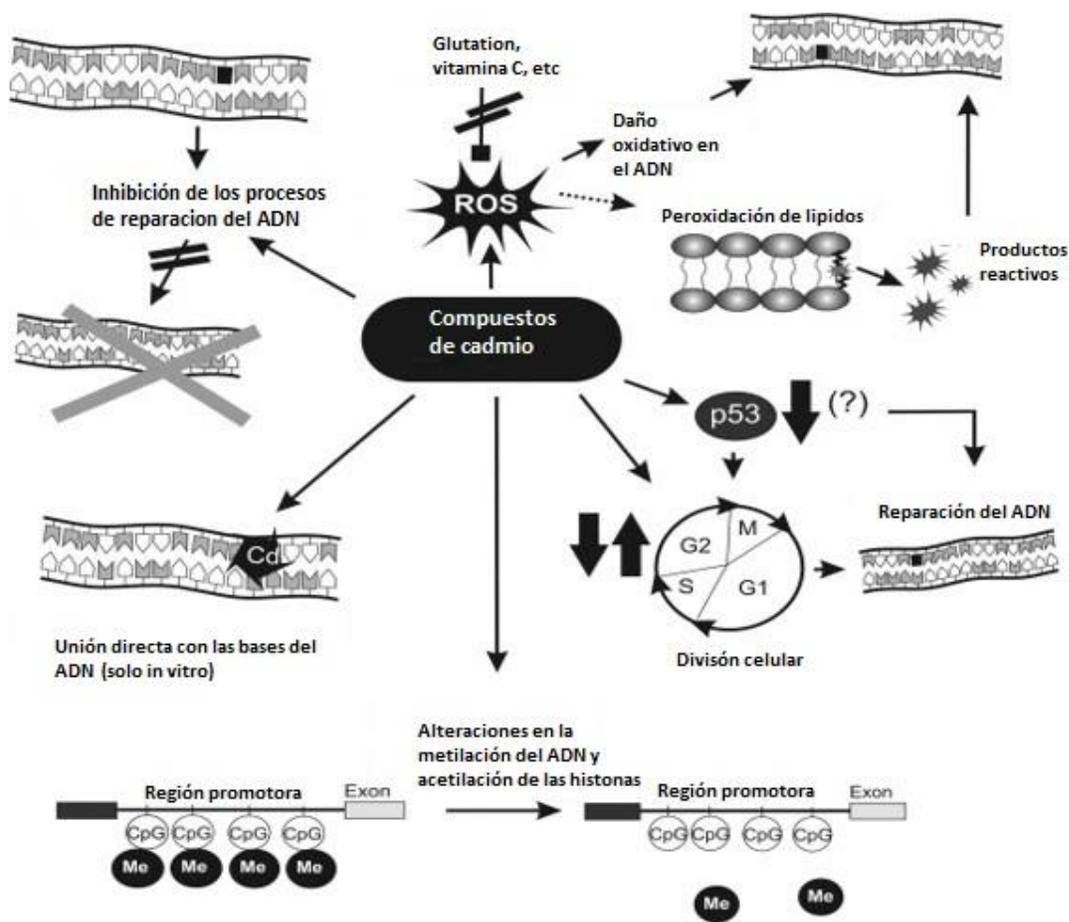


Figura 3. Mecanismos moleculares de la genotoxicidad del Cd. (tomado y adaptado de Nersesyan et al. (50))

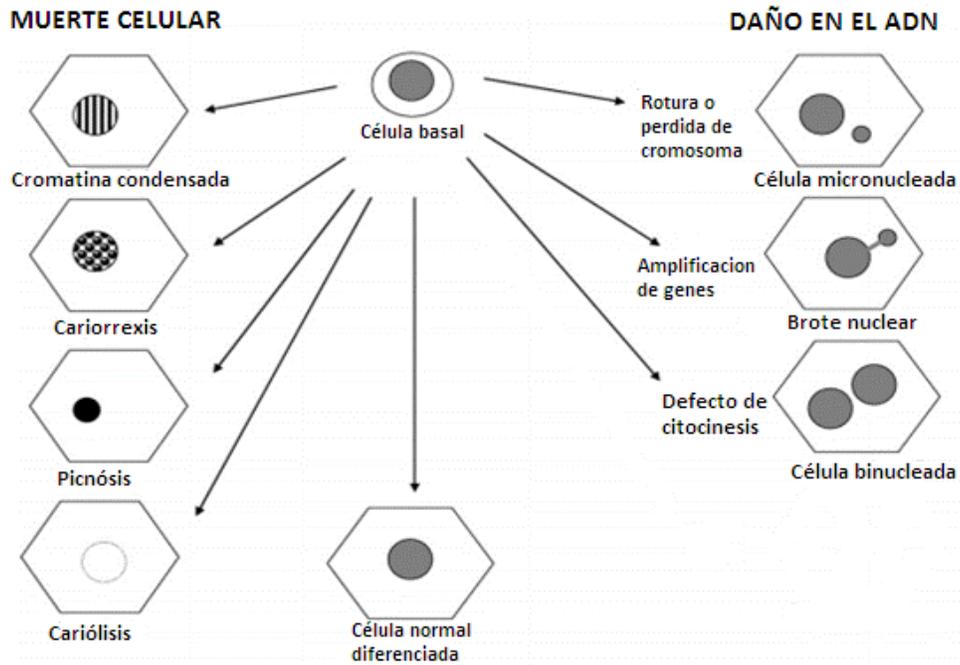
3.4. Biomarcadores de genotoxicidad: Ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt)

El BMCyt es un ensayo mínimamente invasivo utilizado para estudiar el daño del ADN, la inestabilidad cromosómica y la muerte celular del tejido de la mucosa bucal (51). Este método es utilizado constantemente en estudios epidemiológicos

moleculares encaminados a la evaluación de los efectos de diferentes factores del estilo de vida o la exposición a agentes citotóxicos y/o genotóxicos (52-54). La literatura científica evidencia que los biomarcadores de este ensayo se han asociado con un mayor riesgo de envejecimiento acelerado, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (55, 56).

El BMCyt es una de las opciones empleadas por los investigadores para el estudio de agentes genotóxicos debido a su conocida sencillez en los procedimientos y a la valiosa información otorgada por este ensayo. En esta prueba, las células son exfoliadas de la mucosa oral, posteriormente son lavadas, fijadas, teñidas y analizadas bajo microscopio, permitiendo reconocer micronúcleos y estructuras no micronucleadas como brotes nucleares, defectos en la citocinesis representados en células binucleadas y eventos de apoptosis como células cariorrexicas, cariolíticas, cromatina condensada y picnóticas (**Figura 4**) (51, 54).

I)



II)

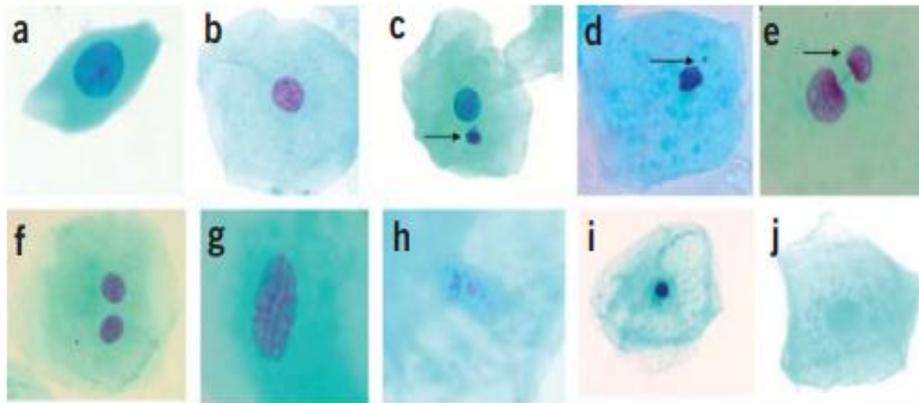


Figura 4. Parámetros del ensayo del citoma de micronúcleo bucal. **I)** esquema de los diferentes tipos de células y el posible mecanismo de su origen. **II)** diferentes tipos de células teñidas usando Feulgen y Light Green. a) Células basales b) Células diferenciadas. c-d) Células con micronúcleo. e) Brotes nucleares. f) Células

binucleadas g) Cromatina condensada h) Cariorrexis i) Picnósis j) Cariólisis (tomado y adaptado de Thomas *et al.* (51) y Holland *et al.* (54)).

Micronúcleos: Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular (**Figura 4II-c,d**); se originan por pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros durante la división nuclear y tienen valor en el diagnóstico de genotoxicidad. Las frecuencias basal para las células micronucleadas en la mucosa oral suelen estar dentro del rango de 0.5-2.5 MN/ 1,000 células (54).

Brotos nucleares: Las células con brotes nucleares contienen núcleos con una aparente constricción aguda en un extremo del núcleo que sugiere un proceso de gemación (**Figura 4II-e**), es decir, eliminación de material nuclear por gemación. El brote nuclear y el núcleo siempre están unidos y presentan las mismas propiedades de tinción. En algunas ocasiones la separación es tan fina que solo una especie de puente nuclear los mantiene unidos (51). Actualmente, los mecanismos del origen de los brotes nucleares son poco claros. Sin embargo, se ha sugerido que podría estar relacionado con la eliminación del ADN amplificado o la reparación del ADN (57).

Células binucleadas: Como su nombre lo indica, las células binucleadas contienen dos núcleos en lugar de uno, estos núcleos a menudo pueden observarse muy cerca uno del otro y poseen las mismas proporciones y propiedades de tinción (**Figura**

4II-f). La importancia de evaluar este tipo de células es subestimada con alguna frecuencia, sin embargo probablemente estas células sean indicativas de defectos en la citocinesis (51). Además, se ha indicado que la frecuencia de no disyunción cromosómica es más alta en células binucleadas que en células mononucleadas (con citocinesis completa) (58).

Cromatina condensada: Básicamente, en este tipo de células se observa que la cromatina se agrega en algunos sectores del núcleo, ocasionando que se pierda cromatina en otras áreas. Como consecuencia, la célula muestra un patrón nuclear rugosamente estriado en el que la cromatina agregada se tiñe intensamente (**Figura 4II-g**). Se ha indicado que estas células posiblemente experimentan la etapa temprana de la apoptosis o muerte celular (51).

Cariorrexis: Podría mencionarse que las células cariorrecticas es la etapa siguiente a las células con cromatina condensada, puesto que las células cariorrecticas se caracterizan por poseer núcleos con una agregación de la cromatina mucho más extensa que las células de cromatina condensada (**Figura 4II-h**). Esto resulta en una consecuente desintegración nuclear, indicando que estas células atraviesan una etapa tardía de apoptosis (51, 59).

Cariólisis: Las células cariolíticas son células en las que el núcleo está completamente carente de ADN y durante la visualización se aprecia una célula carente de núcleo debido a la falta de tinción del material genético (**Figura 4II-j**). Por lo tanto, la cariólisis representa una etapa muy tardía en el proceso de muerte

celular, es decir, es la etapa posterior a la cariorrexis y la cromatina condensada (51, 59).

Picnósis: Estas células se caracterizan por presentar un pequeño núcleo contraído, lo que resulta en una alta condensación de la cromatina, tiñéndose de manera intensa (**Figura 4II-i**) (51, 59). El diámetro nuclear suele ser de uno a dos tercios de un núcleo en células normales. El significado biológico de estas células es poco claro, al igual que los mecanismos involucrados a su formación. Sin embargo, se ha mencionado que las células picnóticas pueden estar sufriendo una forma única y diferente de muerte celular (54).

4. Diseño Metodológico

4.1. Tipo de estudio

El presente es un estudio analítico y de corte transversal en el cual el evento de interés fue evaluar la presencia o ausencia de efectos genotóxicos asociados a metales pesados en poblaciones insulares de Cartagena.

4.2. Área de estudio

Esta investigación se realizó en los corregimientos de Ararca, Barú, Caño del oro y Tierra Bomba, cuatro comunidades tradicionales de pescadores ubicados en zonas insulares y costeras del distrito de Cartagena en el departamento de Bolívar (**Figura 5**). Ararca cuenta con 900 habitantes que viven en 219 viviendas, ubicadas a 15 kilómetros del casco urbano de Cartagena y tiene interacción directa con la Bahía de Cartagena y el canal del dique; Barú es una isla habitada por 1922 personas que viven en 448 hogares, ubicada a 34 kilómetros de la zona urbana de Cartagena (19). Caño del Oro y Tierra Bomba son comunidades pertenecientes a la isla de Tierra Bomba, los cuales cuentan con poblaciones de 1257 y 1472 habitantes respectivamente.

4.3. Población y muestra

La población analizada en este estudio fueron personas establecidas en los corregimientos de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba (total de 5551 habitantes).

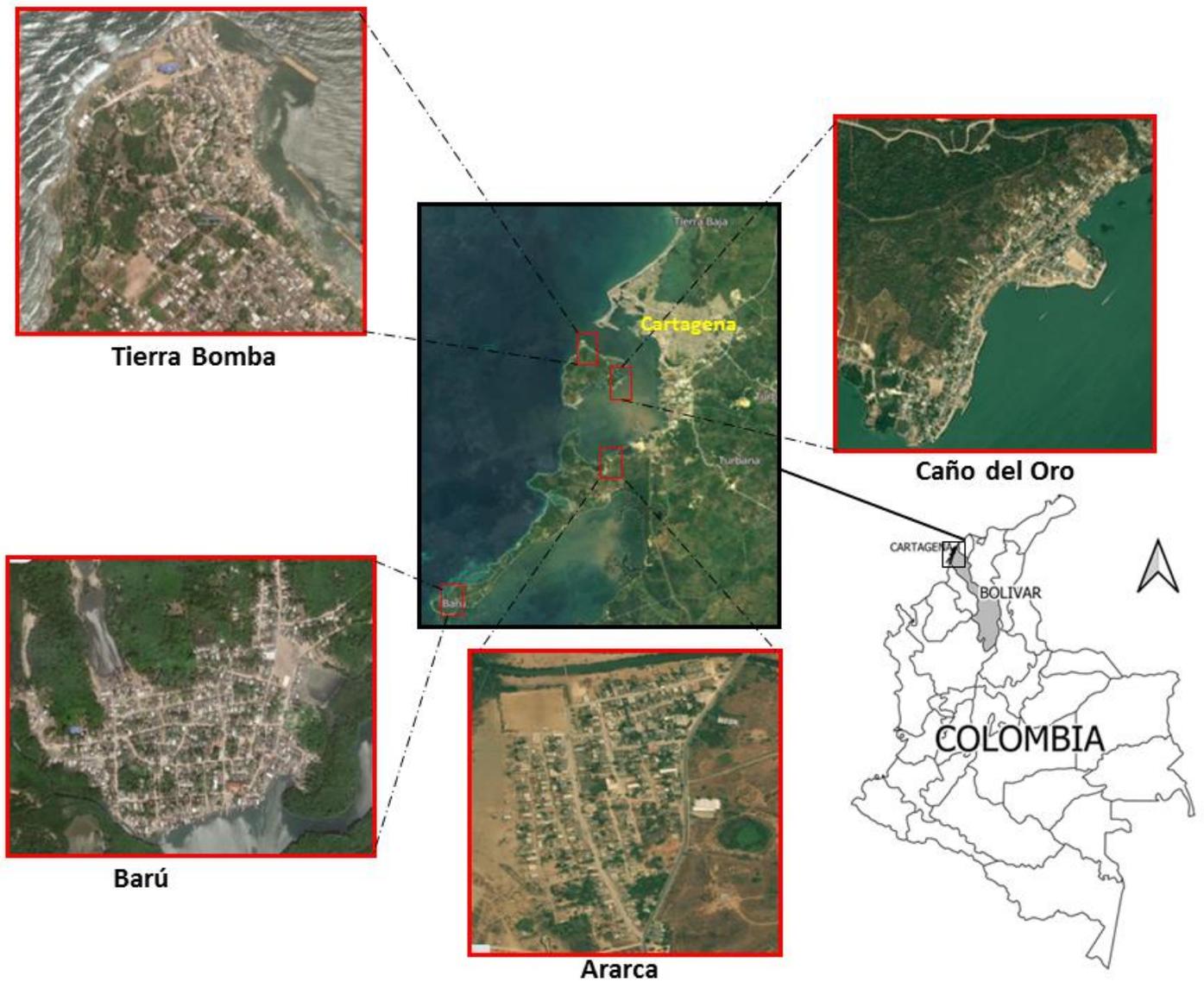


Figura 5. Localización de los sitios de estudio. Comunidades de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, Distrito de Cartagena, Bolívar. Fuente: Imagen propia diseñada a partir de Google Earth Pro

El tamaño de la muestra total y la proporción por sitio se estimó utilizando la fórmula de estimación de muestra poblacional con población definida:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde N es el tamaño total de la población (5551 habitantes), Z^2 corresponde al nivel de confianza de 95% ($1,96^2$), P es la proporción esperada de individuos con efectos genotóxicos asociados a metales pesados, en este caso, como no se cuenta con datos previos en la zona, se estimó una proporción del 50% (0,5) (60), siendo q el equivalente de 1-p, es decir (0,5) y d^2 es el error máximo permitido de 10% (0,1). De este modo, el tamaño calculado de la muestra, necesario para el estudio, fue de 94 individuos.

La distribución de las muestras entre las diferentes comunidades evaluadas se realizó mediante una asignación proporcional, en la cual el porcentaje de participación de cada municipio en el tamaño de la muestra fue igual a la participación de cada municipio en el tamaño total de la población. En este sentido, el número de personas evaluadas por comunidad se estableció de la siguiente manera: 16 de Ararca, 31 de Barú, 22 Caño del Oro y 25 de Tierra Bomba, para una muestra total de 94 individuos.

4.4. Criterios de selección y registro de los participantes

Las visitas a los corregimientos se realizaron con el apoyo de un grupo multidisciplinar de investigadores del grupo UNIMOL de la Universidad de Cartagena, conformado por profesionales de la salud y trabajadores sociales. Estos profesionales asistieron en el acercamiento con la población, el registro de las personas y la recolección de las muestras biológicas.

El registro consistió en una encuesta que incluyó información general sobre algunos parámetros de estilo de vida de los individuos, tales como: consumo de alcohol o tabaco, hábitos alimenticios, fuente de consumo de agua y tratamiento, actividad laboral, tiempo de residencia en el lugar, breve historia clínica y antecedentes de exposición a agentes genotóxicos como sustancias químicas o radiación.

De acuerdo con la información provista por la encuesta, se incluyeron en el estudio aquellas personas que tengan más de 3 años viviendo en la zona de estudio, que no presenten antecedentes de alcoholismo o tabaquismo, ni enfermedades como cáncer o enfermedades crónicas degenerativas en los anteriores 6 meses a la visita, así mismo tampoco deben estar bajo tratamiento farmacológico alguno y no presentar antecedentes de exposición prolongada a algún otro agente químico o físico (como rayos X) conocido capaz de generar genotoxicidad. No cumplir con algunos de estos criterios se tomó como criterio de exclusión.

Todas las personas que participaron firmaron un consentimiento informado sin excepción, en el que se les explicó los objetivos del estudio y autorizaron el uso de sus muestras biológicas para fines científicos.

4.5. Obtención de las muestras biológicas

A todas las personas incluidas en el estudio se les recolectaron muestras de sangre periférica y células de la mucosa bucal. Para análisis de Hg y Cd, se recolectaron entre 3 y 6 ml de sangre periférica en tubos con EDTA y almacenadas en hielo. Para el ensayo de BMCyt, se recolectaron muestras de células de la mucosa bucal exfoliadas mediante una serie de masajes en la parte interna de las mejillas con la ayuda de un hisopo y se suspendieron en solución salina fría (0,9%), previamente, a cada persona se le pidió que se enjugara la boca con agua de botella proporcionada por los investigadores. Cada muestra biológica fue codificada con un consecutivo único que permitiese identificar a cada persona y que fuera posible verificar su trazabilidad durante el estudio. Finalmente, las muestras fueron transportadas al laboratorio del grupo UNIMOL, Universidad de Cartagena, para la realización de los posteriores ensayos de laboratorio.

4.6. Análisis de metales pesados en sangre

La determinación de Hg total y Cd en sangre se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad de Córdoba. Los análisis de Hg total en sangre se realizó mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Vapor Frío (CVAAS), utilizando Thermo equipment Scientific™, modelo iCE, serie

3000, a una longitud de onda de 253,7 nm con un límite de detección de 0,40 µg/L (61). Los análisis de Cd en sangre se realizaron mediante Espectrometría de Absorción Atómica en Horno de Grafito con un límite de detección de 0,20 µg/L (7). Todos los análisis se realizaron a partir de 2 ml de muestra de sangre periférica recolectada en tubos *vacutainers* con anticoagulante EDTA y almacenada a 4°C. Las unidades de concentración se determinaron en µg/L.

4.7. Ensayo de citoma de micronúcleo bucal (BMCyt)

Después de los masajes bucales, las células eran suspendidas en tubos de centrifuga de 15 ml que contenían 5 ml de solución salina 0,9% (p/v), una vez en el laboratorio, las muestras eran centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos y las células bucales sedimentadas se lavaron dos veces con solución salina y una vez con fijador de Carnoy (metanol y ácido acético glacial, 3:1) en las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, se gotearon entre 80 y 100 µL de suspensión celular en un portaobjetos inclinados para obtener una buena extensión celular (53). Las células fijadas se tiñeron mediante el método de Feulgen de acuerdo con las recomendaciones de Thomas *et al.* (51). En resumen, los portaobjetos fueron tratados en un ciclo de etanol al 50 y 20% durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego en agua destilada durante 2 minutos. Seguidamente, los portaobjetos se sumergieron en HCL 5 M durante 30 minutos, en este punto, se utilizó una lámina no sumergida en HCL como control negativo del proceso. Finalizado el tiempo, los portaobjetos fueron enjuagados con agua corriente durante

3 minutos y sumergidos en un recipiente que contenga Reactivo de *Schiff* durante 1 hora en oscuridad total a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos fueron enjuagados 5 minutos con agua corriente y luego enjuagados con agua destilada. Finalmente, los portaobjetos fueron sumergidos en *Light Green* 0,2% (p/v) durante 20 a 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secando por 15 min a temperatura ambiente.

Los portaobjetos teñidos se evaluaron utilizando un microscopio óptico Nikon, se visualizaron y analizaron 1000 células por individuo empleando un aumento 100X. El análisis de alteraciones, como la presencia de daño en el ADN (micronúcleos y brotes nucleares), muerte celular (cromatina condensada, picnósis, cariorrexis y cariólisis) y defecto de citocinesis (células binucleadas), se realizaron según recomendaciones de Thomas *et al.* (51).

4.8. Aspectos éticos y normas de bioseguridad

Este estudio se realizó bajo el marco del proyecto *Basin Sea Interactions with Communities* (BASIC-Cartagena), un proyecto multicéntrico de investigación aplicada sobre las Interacciones entre cuencas, mar y comunidades en la zona costera de Cartagena. Todos los participantes de este proyecto firmaron un consentimiento informado sin excepción. El proyecto actual recibió aprobación del comité de ética de la Universidad de Cartagena, Cartagena.

Debido a la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 que afecta actualmente a la humanidad con la enfermedad COVID-19, se aplicaron los protocolos y medidas

de bioseguridad durante el contacto, registro y toma de muestras de las personas participantes según los protocolos de bioseguridad del Laboratorio UNIMOL y de la Universidad de Cartagena resolución No. 00813 del 16 de junio de 2020, el cual está fundamentado por las normas del Ministerio de Salud. A razón, el artículo 12 promueve que el personal de la Universidad que desarrolle funciones fuera del campus debe acatar los protocolos de bioseguridad en los lugares donde ejecute las actividades o prestación del servicio. Por lo anterior, el equipo de investigación del presente proyecto utilizó en todo momento los implementos de protección personal tales como tapabocas N95, bata desechable, gorro, guantes y gafas, así mismo se les exigió a las personas participantes el uso de tapa bocas, si esta no la poseía, el equipo de investigación le proporcionó uno. Se realizaron desinfecciones constantes con alcohol al 70% antes y después de la atención a cada individuo. La atención de las personas se realizó en sitios ventilados y respetando el distanciamiento físico (al menos 2 metros) en el caso de que hayan 2 o más personas interesadas en participar.

4.9. Análisis estadísticos

Se verificó el supuesto de normalidad de las variables mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* o *Shapiro wilk* según el caso con el fin de escoger el análisis paramétrico o no paramétrico de los datos. Como las variables no se distribuyeron normalmente, los resultados se presentaron en mediana y rango intercuartilico (RIQ: percentil 25 – percentil 75). Los análisis de las diferencias significativas entre grupos se realizaron mediante U de *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* para múltiples

comparaciones con test de *Dunn* post-hoc para cada apareamiento. Las correlaciones entre los niveles de metales en sangre, variables demográficas cuantitativas y el daño en el material genético se llevaron a cabo mediante coeficiente de *Spearman*. Adicionalmente, se realizaron regresiones lineales simples y ajustadas por diferentes variables de confusión utilizando una función robusta para una mejor estimación de la varianza. Las variables epidemiológicas tenidas en cuenta en los individuos tales como el sexo y aspectos del estilo de vida (cualitativos) se analizaron mediante *Chi*-cuadrado o test Exacto de *Fisher*. Todos los análisis se realizaron en el software estadístico SPSS v.9.0. La significancia estadística estuvo definida como $p < 0,05$.

5. Resultados

En total, 94 individuos cumplieron los criterios de inclusión para el estudio, estos individuos se obtuvieron de 4 comunidades pesqueras ambientalmente expuestas a metales pesados tales como mercurio y cadmio, y en la que han habitado por lo menos durante 3 años.

5.1. Caracterización demográfica de la muestra poblacional

En la **tabla 1** se resumen las principales características demográficas de la población de estudio, obtenidas mediante el análisis de las encuestas realizadas durante las visitas a los sitios. En general, la mediana de edad del grupo de estudio fue de 31,5 años (RIQ: 23-42,25) y estuvo conformado por 69 mujeres (73,4%) y 25 varones (26,6%). Del total de sujetos incluidos, 7 fueron menores de edad. No se presentaron diferencias significativas en la mediana de edad entre las 4 comunidades ($p>0,05$).

En cuanto al grado de escolaridad, 4 individuos del grupo de estudio presentaron analfabetismo, el 32,98% no terminaron su estudio escolar (primaria o secundaria), mientras que más del 47,87% terminó la secundaria, el 12,76% tenía un grado técnico o tecnólogo y solo 2 individuos tenían grado universitario.

Con respecto a la ocupación, el 56,38% ($n=53$) de los participantes eran amas de casa, el 30,85% ($n=29$) de los individuos se encontraban empleadas, el 9,57% ($n=9$)

eran estudiantes y 3 (3,19%) se encontraban desempleadas en el momento de la entrevista. Entre de las 29 personas empleadas, el 34,48% (10/29) se dedicaban a oficios relacionados con el turismo, el 13,79% (4/29) se dedicaban al comercio y 2 (6,89%) eran pescadores. Otras ocupaciones como servicios de vigilancia, servicios de salud, artesanía, cosmetología y oficios varios representaron el 44,84% restante (13/29). Referente al consumo de alcohol, el 90,43% refirió no consumir alcohol de forma frecuente, mientras que el 9,57% de ellos eran consumidores habituales (representado como aquella persona que consumía más de 10 cervezas por semana). Aun así, para evitar sesgos en los resultados, en este estudio nos abstuvimos de incluir personas que consumieran bebidas alcohólicas en exceso de forma periódica, o con antecedente reciente de alcoholismo.

El 78,72% (n=74) de la población de estudio manifestó que el agua de consumo la obtenían de la lluvia o del agua que almacenaban en estanques, además cerca del 81,08% (60/74) no le daba ninguna clase de tratamiento al agua antes de consumir. Estas comunidades, a excepción de Ararca, no cuentan con un sistema de acueductos de agua potable, por lo que la mayor parte del agua de consumo provienen de la lluvia o del agua proveniente de Cartagena que es transportada en un buque cisterna, el cual es almacenado posteriormente en estanques por largos periodos de tiempo. Solo el 22,42% del total de personas estudiadas le aplicaba algún tipo de tratamiento al agua de consumo, estos tratamientos incluían hervir el agua o filtrarla de forma artesanal.

Tabla 1. Caracterización demográfica de la población de estudio

Variable demográfica	Grupo expuesto				
	Ararca n=16	Barú n=31	Caño del oro n= 22	Tierra Bomba n=25	Total n= 94
Edad (mediana y RIQ)	35 (24-45)	32 (22-42,75)	32 (22-48)	31,5 (23-41,5)	31,5 (23-42,25)
Sexo					
Femenino	13	16	18	22	69 (73,40%)
Masculino	3	15	4	3	25 (26,60%)
Escolaridad					
Ninguna	1	2	1	0	4 (4,25%)
Primaria o secundaria inconclusa	6	11	11	3	31 (32,98%)
Bachiller	7	14	8	16	45 (47,87%)
Estudios Técnicos o tecnólogos	2	3	2	5	12 (12,76%)
Estudios Universitarios	0	1	0	1	2 (2,12%)
Ocupación					
Ama de casa	12	10	14	17	53 (56,38%)
Empleado	4	17	2	6	29 (30,85%)
Desempleado	0	0	2	1	3 (3,19%)
Estudiante	0	4	4	1	9 (9,57%)
Tiempo de residencia en el lugar					
≤ 25 años	4	11	7	9	31 (17,02%)
> 25 años	12	20	15	16	63 (82,98%)
Consumo de alcohol					
Consumidor *	1	7	1	0	9 (9,57%)
No consumidor	15	24	21	25	85 (90,43%)
Consumo de pescado					
No consume	1	0	2	0	3 (3,19%)
Ocasional (< 1 vez por semana)	5	3	1	1	10 (10,64%)
Semanal	7	13	10	13	43 (45,75%)
Diario	3	15	9	11	38 (40,42%)
Fuente de consumo de agua					
Buque cisterna o agua de lluvia	0	29	21	24	74 (78,72)
Acueducto o comercial	16	2	1	1	20 (21,28)

* > 10 cervezas cada fin de semana

Con respecto al consumo de alimentos, el pescado se señaló como la principal fuente de proteína, el 40,42% de los participantes en el grupo de estudio lo consumía diariamente y, el 45,75%, al menos una vez por semana. Así mismo, todos los participantes refirieron seguir una dieta balanceada, con un gran consumo de arroz, harinas, granos, frutas y vegetales.

5.2. Marcador de exposición: análisis de mercurio y cadmio en sangre

Los niveles de metales pesados en las muestras analizadas por comunidad se muestran en la **tabla 2**. Se encontró que la mediana de Hg total en sangre sobrepasaron los límites permisibles para poblaciones ambientalmente expuestas a Hg según lo establecido por la OMS (5,0 µg/L) (24), tanto por comunidades como de forma general (total de individuos). En resumen, la mediana de Hg total en sangre en el grupo de estudio fue de 7,39 µg/L (RIQ: 4,54 -11,20), y en particular, el corregimiento de Barú presentó niveles significativamente más altos con respecto a Ararca y Caño del Oro, pero no con Tierra Bomba. Además, según las concentraciones de Hg en las muestras individuales, se encontró que el 71,27% del total de individuos sobrepasaron los límites de Hg (67/94), y de forma particular, se observó que el 56,25, el 83,87, el 54,54 y el 80,0% de las muestras de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, respectivamente, sobrepasaron los límites permitidos de Hg establecidos por la OMS.

Respecto a los análisis de Cd en sangre, es importante mencionar que no fue posible realizar el análisis de este metal a 4 individuos debido a escases de la

muestra. Se observó que 77,77% (70/90) de los individuos estudiados presentaron valores menores al límite de detección de Cd en sangre según la metodología utilizada (0,2 µg/L). Los valores mínimos y máximos de Cd en sangre entre los 20 individuos a los que le fue posible detectar el metal, fue de 0,2 a 2,99 µg/L, con una mediana de 0,43 µg/L (RIQ: 0,33-1,02), indicando que ninguno de los individuos estudiados presentó niveles de Cd superiores al permitido por el CDC (5 µg/L) (30). Además, observamos que los 20 sujetos con Cd en sangre estuvieron distribuidos equitativamente entre las comunidades de Barú (n=5), Caño del Oro (n=6) y Tierra Bomba (n=8), solo un individuo era residente de la comunidad de Ararca; en cuanto al sexo, 14 eran mujeres y 6 hombres. Con el fin de explorar posibles variables involucradas en la ausencia o presencia de Cd en sangre, decidimos comparar ambos grupos. Al comparar la edad y tiempo de residencia entre el grupo sin Cd en sangre y con Cd en sangre se encontró que no hubo diferencia estadística entre ellos (**tabla 3**), las medianas de edad para el grupo sin Cd y con Cd fueron de 31,5 años para ambos grupos. Mientras que la mediana de tiempo de residencia fue de 25 años (RIQ: 15,0-40,0) y 30 años (RIQ: 20,25 – 48,25) para el grupo sin Cd y con Cd respectivamente. Otras variables como el sexo y consumo de pescado tampoco evidenciaron diferencias estadísticas (**tabla 3**). Conociendo esta información, decidimos que los posteriores análisis exploratorios entre niveles de metales en sangre y las distintas variables demográficas y/o biológicas se realizarán principalmente con Hg debido a la poca relevancia estadística de los datos de Cd.

Tabla 2. Concentraciones de mercurio y cadmio en sangre de la población de estudio (mediana y RIQ) ($\mu\text{g/L}$)

Marcador de exposición	Grupo de estudio					Límites permisibles OMS
	Ararca	Barú	Caño del Oro	Tierra Bomba	Total	
Concentración de Hg en sangre (n=94)						
Mediana	6,47a	10,03b	5,50a	7,26ab	7,39	
RIQ	2,45 - 8,30	6,94 - 13,19	2,56 - 8,85	5,55 - 13,51	4,54 -11,20	5,0
Mínimo	0,43	2,73	0,55	3,38	0,43	
Máximo	18,5	25,77	14,41	36,01	36,01	
Concentración de Cd en sangre (n=20)					Total	Límites permisibles CDC
Mediana	-	-	-	-	0,43	
RIQ	-	-	-	-	0,33-1,02	5,0
Mínimo	-	-	-	-	0,2	
Máximo	-	-	-	-	2,99	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$. Concentración de Hg en sangre: *Kruskal-Wallis* y test de *Dunn* para cada comparación en pareja

Tabla 3. Comparación entre las distintas categorías de niveles de cadmio en sangre (mediana y RIQ) ($\mu\text{g/L}$).

	Grupo sin cadmio en sangre (n=70)*	Grupo con cadmio en sangre (n=20)	p-valor
Sexo			
Femenino	53	14	0,774
Masculino	17	6	
Edad (mediana y RIQ)	31,5 (23,75 – 41,0)	31,5 (23,25 – 50,75)	0,919
Tiempo de residencia	25 (15,0-40,0)	30 (20,25 – 48,25)	0,183
Consumo de pescado a diario			
Si	26	11	0,199
no	44	9	

* $< 0,2 \mu\text{g/L}$, límite de detección de Cd en sangre por la técnica de medición

Sexo y consumo de pescado: Exacto de *Fisher*. Edad y tiempo de residencia: U de *Mann-Whitney*.

En la **Figura 6** se observa la línea de tendencia de las concentraciones de Hg en sangre cuando las enfrentamos a las variables “edad” y “tiempo de residencia en el lugar”, además, pese a la inequidad en la proporción de varones y mujeres en la población de estudio, decidimos categorizar la muestra por sexos. Se encontró que en mujeres existe un comportamiento creciente de los niveles de Hg en sangre a medida que aumenta la edad o el tiempo de residencia en el área de estudio, así mismo, el tiempo de residencia tuvo una tendencia positiva en el aumento del Hg en hombres, sin embargo, la edad por sí sola no mostró una tendencia aparente.

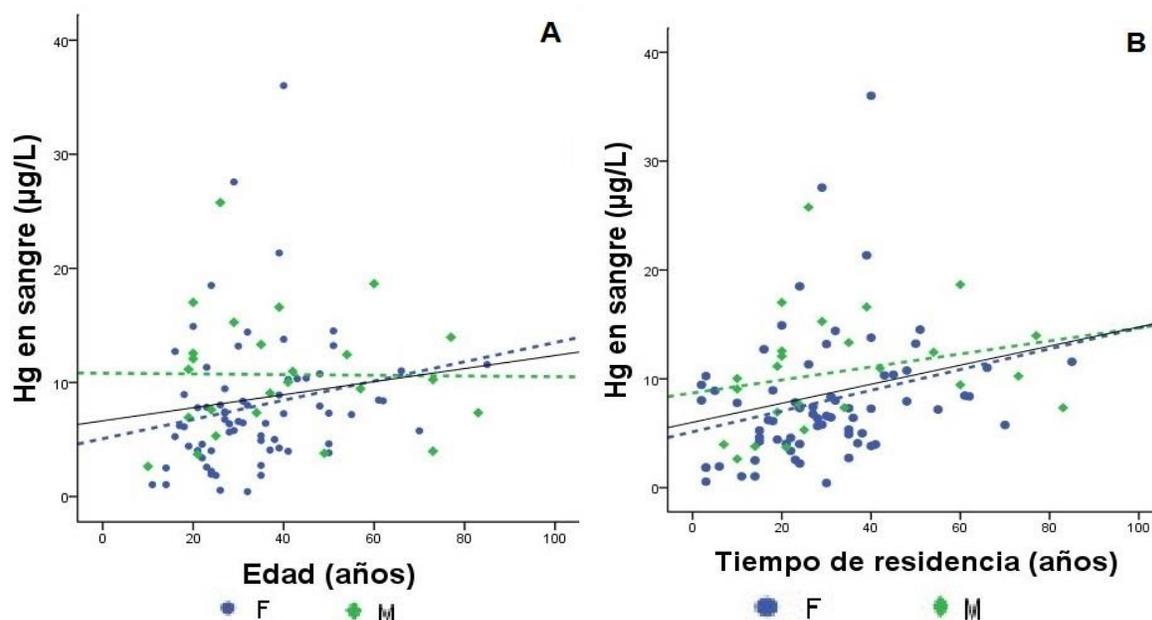


Figura 6. Tendencia de los niveles de mercurio en sangre con la edad y tiempo de residencia en el sitio de estudio categorizado por sexo y en forma general (línea negra)

Teniendo en cuenta lo anterior, decidimos comparar los niveles de Hg en sangre entre las categorías (sexo, edad y tiempo de residencia en el sitio) y otras variables demográficas capaz de incidir sobre los niveles de Hg en sangre, tales como el consumo de pescado y fuente de agua de consumo. En la variable consumo de pescado, comparamos las categorías “consumidor diario”, “consumidor semanal” y el conjunto entre “consumidor ocasional” y “no consumidores”. Para el caso de las variables “edad” y “tiempo de residencia en el sitio” categorizamos entre menores y mayores a 25 años por efectos de equidad muestral entre los grupos. La **tabla 4** evidencia que las concentraciones de Hg en sangre fueron mayores en hombres que mujeres ($p=0.022$). El grupo de individuos con más de 25 años viviendo en la zona de estudio presentaron mayores niveles de Hg en sangre en comparación a aquellos habitantes con menos tiempo ($p=0,007$), el mismo comportamiento se observó con la edad de los individuos, sin embargo, este no fue estadísticamente significativo.

Con respecto a la fuente de agua de consumo, no se observó diferencia en los niveles de Hg entre el grupo cuya fuente de agua de consumo provenía de fuentes inadecuadas y los que consumían agua de acueducto o comercial ($p > 0,05$). El grupo que consumía pescado de forma diaria presentó mayores concentraciones respecto a aquellos que consumían de forma semanal y a los que consumían ocasionalmente o no consumían, así mismo, los dos últimos grupos, presentaron diferencias significativas entre ellos. Cabe mencionar que todas las medianas de

concentración de Hg en sangre obtenida en el actual análisis, se encontraban por encima del límite permitido.

Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre el Hg en sangre y las variables demográficas: edad, tiempo de residencia y el consumo de pescado. Los resultados mostraron que todos los factores demográficos se correlacionaron significativamente con las concentraciones del metal, siendo el consumo de pescado el de mayor coeficiente de correlación ($\rho=0,415$; $p<0,001$), seguido por el tiempo de residencia ($\rho=0,374$; $p<0,001$) y la edad ($\rho=0,260$; $p=0,012$).

Tabla 4. Concentración de mercurio en sangre de acuerdo a sexo, edad, tiempo de residencia, consumo de agua y pescado en la población de estudio (mediana y RIQ).

Variable demográfica		Mercurio en sangre ($\mu\text{g/L}$)	p-valor
Sexo	F (n= 69)	7,3 (4,5 - 10,7)	0,022
	M (n= 25)	10,25 (7,35 - 13,65)	
Edad (años)	≤ 25 (n= 31)	6,2 (3,79 - 12,07)	0,078
	> 25 (n= 63)	8,39 (6,37 - 13,19)	
Tiempo de residencia (años)	≤ 25 (n= 45)	6,94 (3,92 - 10,03)	0,007
	> 25 (n= 49)	9,06 (6,44 - 14,19)	
Fuente de agua de consumo	Acueducto/ comercial (n= 20)	7,59 (4,0 - 9,35)	0,256
	lluvia y/o estanques (n= 74)	8,01 (5,33 - 13,20)	
Consumo de pescado	Diario (n= 38)	10,28 (7,18 - 14,52) a	<0,001
	Semanal (n= 43)	7,31 (4,62 - 10,97) b	
	Ocasional/no consume (n= 13)	5,31 (1,85 - 8,13) c	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p<0,05$.

Sexo, edad, tiempo de residencia y fuente de agua: U de *Mann-Whitney*. Consumo de pescado *Kruskal-Wallis* y test de *Dunn* para cada comparación en pareja

5.3. Análisis de citoma de micronúcleo bucal

El BMCyt fue la técnica empleada para evidenciar efectos genotóxicos en los habitantes de las comunidades pesqueras ambientalmente expuestas a Hg y Cd. En este estudio, se realizó un análisis para hallar posibles diferencias significativas entre 3 grupos distintos de niveles de Hg en sangre, es decir, entre los que presentaron niveles de Hg inferiores al umbral 5 µg/L, los que presentaron entre 5,01-10,0 µg/L y los que presentaron niveles superiores a 10,0 µg/L. La variable de niveles de Hg en sangre es de carácter cuantitativa continua y se categorizó únicamente en esta ocasión.

En la **Tabla 5** se muestran las diferencias significativas y la estadística descriptiva que resulta al comparar los eventos genotóxicos entre las categorías de los niveles de Hg en sangre. Las variables de daño evaluadas para el ensayo de citoma fueron: número de células con micronúcleos y brotes nucleares como medida de daño en el ADN; número de células con cromatina condensada, picnósis, cariorrexis y cariólisis como medida de muerte celular; finalmente, el número de células binucleadas como medida de defectos de citocinesis (**Figura 7**). Se encontraron diferencias significativas en los biomarcadores micronúcleos, cariorrexis y cariólisis entre las diferentes categorías de niveles de Hg en sangre. El grupo con niveles de Hg >10 µg/L presentó mayor frecuencia de micronúcleo y cariorrexis en comparación con el grupo con niveles de Hg <5 µg/L, pero no con los que presentaron Hg entre 5,01-10,0 µg/L. Por otro lado, la frecuencia de células

cariolíticas fue mayor en el grupo con niveles de Hg >10 µg/L en comparación con los otros dos grupos.

Tabla 5. Biomarcadores del ensayo de citoma de acuerdo a las categorías de niveles de mercurio en sangre (mediana y RIQ).

BMCyt	Categorías de niveles de mercurio en sangre		
	≤ 5 µg/L (n=27)	5,01-10,0 µg/L (n= 35)	> 10 µg/L (n=32)
Micronúcleo	4,0 (3,0 – 6,0) a	5,0 (4,0 – 7,0) ab	6,0 (5,0 – 8,0) b
Brote nuclear	5,0 (3,0 – 8,0) a	5,0 (4,0 – 9,0) a	6,0 (5,0 - 8,0) a
Binucleada	8,0 (5,0 – 10,0) a	8,0 (5,0 – 9,0) a	7,0 (6,0 – 9,0) a
Cromatina condensada	42,0 (35,0 – 52,0) a	54,0 (39,0 – 65,0) a	44,5 (36,0 – 76,25) a
Cariorrexis	47,0 (36,0 – 70,0) a	63,0 (36,0 – 83,0) ab	79,5 (59,25 – 93,75) b
Cariólisis	35,0 (26,0 – 52,0) a	38,0 (20,0 – 56,0) a	64,0 (45,0 – 79,75) b
Picnósis	3,0 (2,0 – 5,0) a	4,0 (1,0 – 6,0) a	5,0 (1,0 – 6,0) a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron mediante *Kruskal-Wallis* y test de *Dunn* para cada comparación en pareja.

Por otro lado, al comparar las frecuencias de los biomarcadores del citoma por comunidad, se encontraron diferencias significativas entre algunos de estas poblaciones. En resumen, se identificaron diferencias solo en los biomarcadores de muerte celular: cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis (**Tabla 6**). Se observó que la frecuencia de alteraciones nucleares detectadas por el ensayo de citoma bucal fueron generalmente menores en el grupo de Ararca en comparación con las otras comunidades.

Tabla 6. Biomarcadores del ensayo de citoma por comunidad estudiada (mediana y RIQ).

BMCyt	Grupo de estudio				Total
	Ararca	Barú	Caño del Oro	Tierra Bomba	
Micronúcleo	5,0 (3,25-5,75)a	6,0 (4,0-7,0)a	5,0 (3,0-7,25)a	5,0 (4,0-8,0)a	5,0 (4,0-7,0)
Brote nuclear	6,0 (4,25-7,0)a	5,0 (4,0-7,0)a	7,0 (5,0-11,0)a	4,0 (3,5-8,0)a	6,0 (4,0-8,0)
Binucleada	7,0 (5,0-10,75)a	7,0 (6,0-8,0)a	9,0 (5,75-11,25)a	8,0 (6,0-10,0)a	8,0 (6,0-9,0)
Cromatina condensada	42,0 (25,25-45,00)a	52,0 (35,0-57,25)b	53,0 (40,5-77,5)b	44,0 (28,5-63,5)ab	45,0 (35,75-65,0)
Cariorraxis	32,5 (17,25-48,00)a	74,0 (60,0-88,0)b	68,0 (50,0-83,75)b	76,0 (41,5-92,5)b	63,5 (41,75-86,0)
Cariólisis	29,0 (17,25-48,00)a	52,0 (17,25-48,00)b	36,5 (17,25-48,00)ab	45,0 (17,25-48,00)ab	45,0 (28,0-65,0)
Picnósis	3,5 (0,0-7,5)a	4,0 (2,0-5,0)a	2,0 (0,75-5,25)a	5,0 (1,00-6,0)a	4,0 (1,0-6,0)

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$

Todos los análisis se realizaron mediante *Kruskal-Wallis* y test de *Dunn* para cada comparación en pareja

Al igual que en el apartado anterior (**5.2.** Marcador de exposición), decidimos comparar la frecuencia de anomalías nucleares entre las categorías de las variables: sexo, edad, tiempo de residencia, consumo de pescado y fuente de agua de consumo. La **Tabla 7** muestra los resultados de estas comparaciones. Se encontraron mayores frecuencias de cariorrexia y cariólisis entre los habitantes que cuentan con más de 25 años viviendo en el área de estudio, estos mismos biomarcadores también fueron estadísticamente más frecuentes en las personas que consumían agua de fuentes inadecuadas, adicionalmente, células con cromatina condensada y con micronúcleos también fueron más frecuentes en este

subgrupo en comparación con aquellos que consumían agua de acueducto. Por otro lado, se observó diferencias entre las categorías de consumo de pescado. Los marcadores de muerte celular: cariorrexis y cariolisis fueron significativamente más frecuentes en el subgrupo de habitantes que consumía pescado de forma diaria en comparación al consumidor semanal u ocasional.

Tabla 7. Biomarcadores del ensayo de citoma de acuerdo a las categorías de edad, tiempo de residencia y consumo de pescado (mediana y RIQ).

Variables demográficas		Parámetros del BMCyt						
		Micronúcleo	Brote nuclear	Binucleada	Cromatina condensada	Cariorrexis	Cariólisis	Picnósis
Sexo	M	5,0 (3,0-7,0)	5,0 (4,0-6,0)	7,0 (5,75-9,0)	44,0 (35,0-57,25)	74,5 (58,0-89,25)	49,5 (37,25-69,5)	4,5 (0,75-6,25)
	F	5,0 (4,0 – 7,0)	5,0 (4,0-8,75)	8,0 (6,0-10,75)	44,0 (36,25-66,50)	62,0 (38,75-83,0)	42,0 (26,0-64,5)	4,0 (1,0-5,75)
	<i>p</i> -valor	0,531	0,394	0,239	0,279	0,126	0,184	0,565
Edad (años)	≤ 25 años	5,0 (4,0-7,0)	5,0 (4,0-8,0)	7,0 (6,0-9,0)	42,0 (35,0-56,0)	58,0 (32,0-86,0)	40,0 (20,0-65,0)	4,0 (1,0-6,0)
	> 25 años	5,0 (4,0-7,0)	6,0 (4,0-8,0)	8,0 (6,0-9,0)	50,0 (39,0-72,0)	69,0 (49,0-86,0)	45,0 (29,0-65,0)	4,0 (1,0-6,0)
	<i>p</i> -valor	0,987	0,734	0,984	0,074	0,095	0,326	0,824
Tiempo de residencia en el lugar	≤ 25 años	5,0 (4,0-7,0)	5,0 (4,0-7,0)	8,0 (6,0-9,0)	43,0 (37,0-54,0)	58,0 (32,0-81,0)	39,0 (26,0-54,0)	4,0 (1,0-6,0)
	> 25 años	5,0 (4,0-8,0)	6,0 (4,0-8,0)	8,0 (6,0-9,0)	52,0 (35,0-74,0)	75,0 (58,0-90,0)	48,0 (29,0-71,0)	4,0 (1,0-6,0)
	<i>p</i> -valor	0,428	0,402	0,970	0,105	0,004	0,045	0,668
Fuente de consumo de agua	Acueducto/comercial	5,0 (3,0-5,0)	6,0 (4,0-7,0)	7,5 (5,0-10,75)	43,0 (23,5-51,50)	37,0 (19,75-63,25)	29,0 (14,0-43,5)	2,5 (0,0-5,75)
	Lluvia/cisterna	6,0 (4,0-8,0)	5,5 (4,0-8,0)	8,0 (6,0-9,0)	47,0 (38,75-71,25)	73,0 (54,75-89,0)	48,0 (30,75-69,25)	4,0 (1,75-6,0)
	<i>p</i> -valor	0,34	0,967	0,989	0,037	0,001	0,003	0,217
Consumo de pescado	Diario	5,5 (4,0-8,25) a	6,0 (4,0-8,0) a	8,0 (6,0-11,25) a	45,0 (30,5-75,0) a	77,0 (60,0-98,5) a	52,0 (30,25-78,0) a	3,5 (1,0-6,0) a
	Semanal	5 (4,0-7,0) a	5,0 (4,0-7,0) a	7,0 (5,0-9,0) a	44,0 (30,0-63,0) a	58,0 (37,0-81,0) b	44,0 (28,0-63,0) b	4,0 (2,0-6,0) a
	Ocasional/ninguno	5 (3,5-5,5) a	5,0 (4,0-8,0) a	8,0 (5,5-9,0) a	49,0 (40,0-64,0) a	58,0 (40,5-70,0) b	38 (26,5-49,5) b	3,0 (0,0-6,0) a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$.

Sexo, edad, tiempo de residencia y fuente de agua: U de *Mann-Whitney*. Consumo de pescado: *Kruskal-Wallis* y test de *Dunn* para cada comparación en pareja

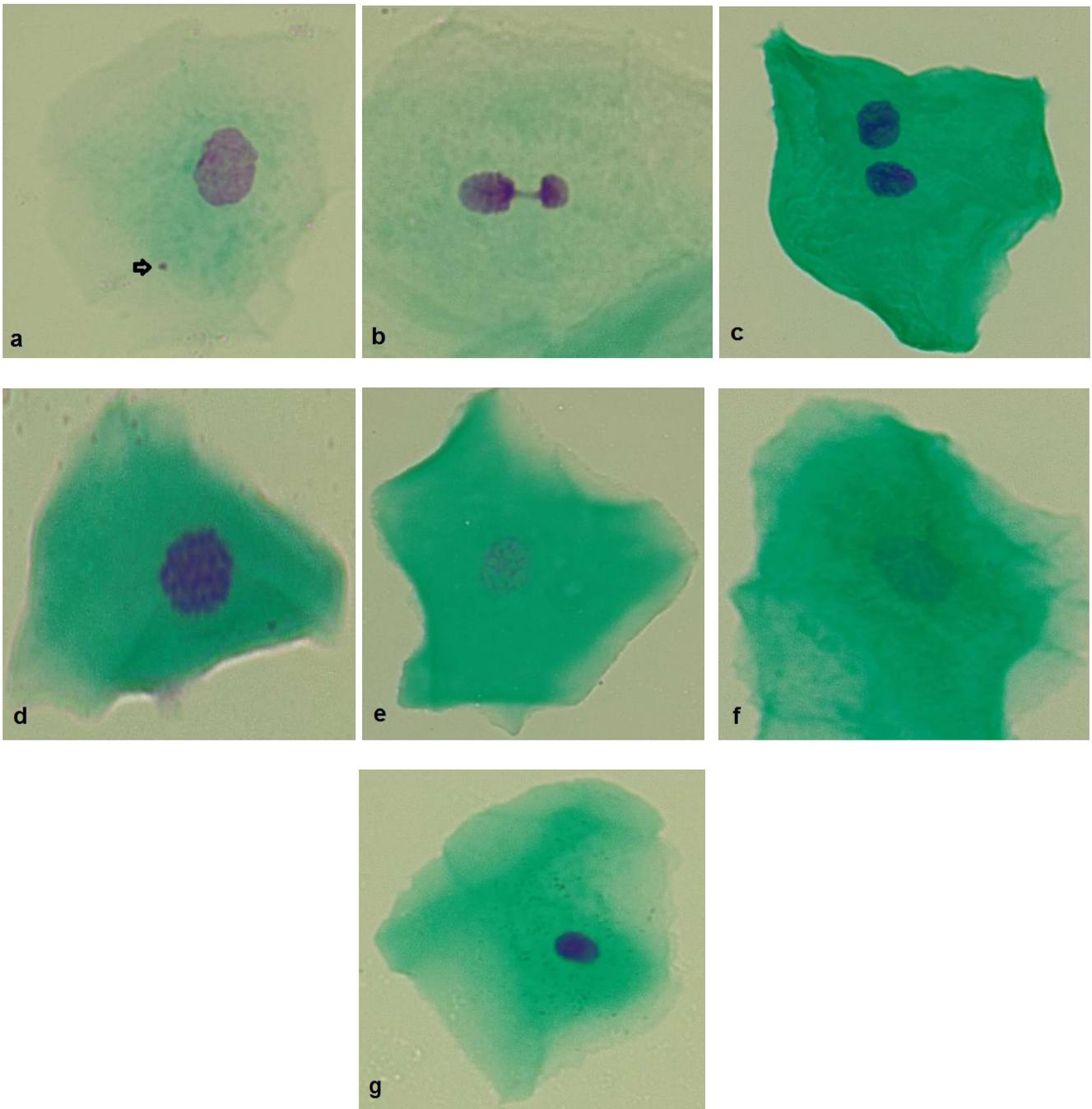


Figura 7. Fotografías (100X) de los tipos de anomalías en células exfoliadas de la mucosa bucal. **a)** célula con micronúcleo. **b)** célula con brote nuclear. **c)** célula binucleada. **d)** célula con cromatina condensada. **e)** célula cariorrética. **f)** célula cariolítica. **h)** célula picnotica.

Fuente: Imágenes propias de este estudio

5.4. Correlaciones entre mercurio en sangre, variables demográficas y parámetros del BMCyt

Finalmente, para dar respuesta a uno de los objetivos específicos de este estudio, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de metales pesados en sangre y cada parámetro del BMCyt. Por razones ya explicadas, los análisis de correlación se realizaron solo con las concentraciones de Hg en sangre. Además del marcador de exposición, se consideraron en el análisis de correlación variables demográficas como la edad, el tiempo de residencia y el consumo de pescado. Todo lo anterior con el fin de conocer el grado o magnitud de las relaciones presentes entre las variables, la dirección de esta relación y su respectiva significancia.

Las correlaciones de Spearman para los niveles de metales en sangre, los biomarcadores del BMCyt y variables demográficas se muestran en la **Tabla 8**. En resumen, se observaron correlaciones significativas entre el Hg en sangre y la frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y kariólisis, con coeficientes cercanos 0,37 y un comportamiento directamente proporcional al marcador de exposición (correlación positiva). En cuanto a las variables demográficas, se pudo evidenciar correlaciones positivas significativas entre el tiempo de residencia y la frecuencia de cariorrexis, y el consumo de pescado con la frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y kariólisis. Por otro lado, múltiples correlaciones entre los diferentes parámetros del BMCyt fueron identificados (**Tabla 8**).

Tabla 8. Correlación de Spearman entre variables demográficas, niveles de metales en sangre y biomarcadores del BMCyt.

Variables	Hg en sangre	Edad	Tiempo de residencia	Consumo de pescado	Micronúcleo	Brote nuclear	Binucleada	Cromatina condensada	Cariorrexis	Cariólisis	Picnósis
Hg en sangre	1,000										
Edad	0,260*	1,000									
Tiempo de residencia	0,374**	0,687**	1,000								
Consumo de pescado	0,415**	0,010	0,321**	1,000							
Micronúcleo	0,377**	-0,150	0,017	0,254*	1,000						
Brote nuclear	0,195	0,001	0,097	0,109	0,324**	1,000					
Binucleada	0,059	0,083	0,047	0,115	0,112	0,374**	1,000				
Cromatina condensada	0,139	0,004	0,068	0,044	0,151	0,160	0,033	1,000			
Cariorrexis	0,375**	0,079	0,254*	0,352**	0,378**	0,153	-0,081	0,237*	1,000		
Cariólisis	0,393**	0,040	0,173	0,306**	0,368**	0,194	0,054	0,238*	0,601**	1,000	
Picnósis	0,148	-0,014	0,037	0,035	0,283**	0,108	0,177	-0,004	0,113	0,312**	1,000

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

Finalmente, se emplearon regresiones lineales simples y ajustadas por distintas variables sociodemográficas de confusión con el fin de examinar el peso (importancia) de la variable independiente principal “niveles de Hg en sangre” sobre los parámetros del BMCyt al cual se correlacionó en el análisis de Spearman (bivariado). En este sentido se analizaron los parámetros micronúcleos, cariorrexis y cariólisis, que además de la variable independiente principal, presentaron correlaciones en al menos una variable demográfica. Aun así, decidimos explorar todas las posibles variables sociodemográficas disponibles: sexo, edad, tiempo de residencia, consumo de agua y consumo de pescado. Los resultados mostraron que independientemente de la o las variables de ajuste, el Hg en sangre se mantuvo consistentemente como un predictor significativo para la frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y cariólisis (**Tabla 9, 10 y 11**).

Tabla 9. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de micronúcleo considerando diferentes características sociodemográficas.

Modelos	Micronúcleos		
	Coefficiente	95% CI	p-valor
Modelo A: micronúcleos considerando Hg en sangre	0,017	0,008 - 0,027	<0,001
Modelo B: modelo A ajustado por sexo	0,019	0,102 - 0,029	<0,001
Modelo C: modelo B ajustado por edad	0,02	0,011 - 0,030	<0,001
Modelo D: modelo C ajustado por tiempo de residencia	0,019	0,009 - 0,029	<0,001
Modelo E: modelo D ajustado por consumo de agua	0,018	0,008 - 0,028	0,001
Modelo F: modelo E ajustado por consumo de pescado	0,017	0,005 - 0,028	0,005

Tabla 10. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de cariorrexis considerando diferentes características sociodemográficas

Modelos	Cariorrexis		
	Coeficiente	95 % CI	p-valor
Modelo A: Cariorrexis considerando Hg en sangre	0,220	0,138 - 0,29	< 0.001
Modelo B: modelo A ajustado por sexo	0,204	0,114 - 0,291	< 0.001
Modelo C: modelo B ajustado por edad	0,190	0,095 - 0,284	< 0.001
Modelo D: modelo C ajustado por tiempo de residencia	0,159	0,058 - 0,260	0,002
Modelo E: modelo D ajustado por consumo de agua	0,133	0,038 - 0,229	0,007
Modelo F: modelo E ajustado por consumo de pescado	0,115	0,008 - 0,222	0,035

Tabla 11. Análisis de consistencia del Hg en sangre para la frecuencia de Cariólisis considerando diferentes características sociodemográficas

Modelos	Cariólisis		
	Coeficientes	95% CI	p-valor
Modelo A: Cariólisis considerando Hg en sangre	0,218	0,158 - 0,278	< 0.001
Modelo B: modelo A ajustado por sexo	0,217	0,153 - 0,282	< 0.001
Modelo C: modelo B ajustado por edad	0,211	0,140 - 0,283	< 0.001
Modelo D: modelo C ajustado por tiempo de residencia	0,198	0,120 - 0,275	< 0.001
Modelo E: modelo D ajustado por consumo de agua	0,186	0,111 - 0,261	< 0.001
Modelo F: modelo E ajustado por consumo de pescado	0,185	0,101 - 0,270	< 0.001

6. Discusión

Existen antecedentes sobre la presencia de metales pesados en poblaciones humanas de la zona insular y costera de Cartagena. Sin embargo, este es el primer estudio que presenta evidencia relacionada con los efectos genotóxicos ocasionado por la exposición a metales pesados utilizando el ensayo BMCyt en las comunidades de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, comunidades pesqueras del distrito de Cartagena, Bolívar.

En este estudio, se pudo observar que en el total de la muestra estudiada, la participación de las mujeres fue superior a los hombres. Este comportamiento se debe a que los hombres se encontraban en mayor frecuencia laborando durante las visitas, ocasionando un sesgo muestral donde los hombres tuvieron menos probabilidades de participar porque la mayoría de este grupo se encontraba fuera del hogar. Adicionalmente, se pudo notar una postura de rechazo hacia la toma de la muestra sanguínea, evitando su participación en el estudio. Esta negligente participación masculina se reportó en un estudio comunitario realizado por Ruiz-Díaz *et al.* (19) en dos de las 4 comunidades analizadas en nuestro estudio (Ararca y Barú).

Tomando como referencia el estudio de Ruiz-Díaz y colaboradores (19), en el cual se describió las características socioeconómicas, las condiciones de agua potable, saneamiento e higiene de las comunidades de Ararca y Barú, encontraron que estas comunidades presentan condiciones notablemente vulnerables, con niveles bajos

de educación e ingresos, con una economía mayoritariamente basada en la explotación de recursos naturales, como el turismo y la pesca artesanal. Los autores reportan que, de 220 sujetos encuestados, el 45,90% no terminó la primaria o secundaria, el 55,9% eran amas de casa y solo el 25,5% se encontraban empleados, siendo el turismo, el comercio y la pesca las actividades más comunes, también informan el consumo de agua de fuentes no adecuadas como agua de lluvia, buque cisternas y pozos, y la falta de aplicación de tratamiento antes del consumo. Estos hallazgos están en línea a lo encontrado en el presente estudio a pesar de tratarse de una cohorte de sujetos más pequeña, además pese que en el anterior estudio no se evaluaron las poblaciones de Caño del Oro y Tierra Bomba, la similitud en el estilo de vida entre estas comunidades hace que los resultados sean comparables. En concordancia, los resultados anteriormente expuestos están en línea con los indicadores e informes de calidad de vida publicados por el distrito de Cartagena (20).

El oficio de la pesca artesanal en estas comunidades es conocido como una actividad principalmente masculina. En este estudio participaron 25 hombres, de los cuales solo 2, con edades de 57 y 77 años, se dedicaban a la pesca artesanal. Se ha reportado que es poco probable que los jóvenes y las nuevas generaciones de estas comunidades se involucren en esta actividad, lo que sugiere un cambio generacional en las preferencias ocupacionales posiblemente motivado por una reducción persistente en la rentabilidad de las actividades relacionadas con la pesca (19). Aun así, el consumo de pescado en las comunidades sigue siendo

notablemente alto, registrándose un consumo diario en el 40,42% y al menos una vez por semana en el 45,72% de los encuestados.

Claramente, nuestros resultados mostraron que, en promedio, las personas residentes de estas comunidades presentan concentraciones de Hg total en sangre superiores al nivel de referencia aceptados para poblaciones ambientalmente expuestas por la OMS (5 µg/L) (24), el cual también es usado como referencia nacional en Colombia (62). Al comparar estos resultados con los antecedentes en la zona, encontramos que nuestras cifras son considerablemente menores a los reportados por un estudio realizado en 498 pescadores de Cartagena que incluyó habitantes de Caño del Oro y Tierra Bomba, los autores reportaron rangos de concentraciones de Hg total en sangre de 0-30, 31-90 y ≥ 91 µg/L en el 44, 50,2 y 5,2% de los individuos respectivamente (14). Es pertinente mencionar que el estudio anterior se remonta a los últimos años de operación de la planta de cloralkali que dejó concentraciones peligrosas de Hg en los sedimentos (21). Así mismo nuestros valores de Hg en sangre son menores a las de otras poblaciones de la costa Caribe colombiana ambientalmente expuestas (7, 61, 63-65); similares a los encontrados en la Región de la Mojana (66) y Putumayo, y mayores a lo reportado en mineros de los departamentos de Bolívar, Caldas y Cauca (61) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Comparación de Hg en sangre con otras poblaciones colombianas expuestas

Referencia	Departamento	Municipio/localidad	Tipo de exposición	Hg en sangre	
				Promedio \pm DE o Mediana (RIQ)	Mínimo - Máximo
Este estudio	Bolívar	Comunidades insulares de Cartagena	Ambiental	7,38 (4,54 -11,20)	0,42-36,01
(7)	Sucre	San marcos	Ambiental	15,32 \pm 7,40	6,30-36,6
(7)	Sucre	Sucre	Ambiental	11,77 \pm 2,73	8,56-18,30
(7)	Sucre	Majagua	Ambiental	13,21 \pm 3,32	8,54-17,53
(7)	Sucre	Guaranda	Ambiental	14,30 \pm 12,06	8,34-16,43
(63)	Córdoba	Municipios de la Cuenca del Rio San Jorge	Ambiental	21,9 \pm 9,3	ND
(66)	Sucre	Municipios de la Región de La Mojana	Ambiental/ocupacional	5,5 (2,7–11,2)	ND
(65)	Amazonas	Puerto Nariño	Ambiental	13,7 \pm 1,23	3,50-39,9
(61)	Córdoba	ND	Ocupacional	21,97 (4,48-49,38)	2,31-49,8
(61)	Vaupés	ND	Ocupacional	22,69 (16,73-35,54)	5,53-282,97
(61)	Guainía	ND	Ocupacional	13,16 (9,17-32,12)	3,77-39,08
(61)	Antioquia	ND	Ocupacional	10,13 (6,82-16,42)	2,58-59,44
(61)	Putumayo	ND	Ocupacional	5,94 (3,21-15,17)	2,58-32,56
(61)	Bolívar	ND	Ocupacional	2,74 (1,43-4,89)	0,76-10,21
(61)	Cauca	ND	Ocupacional	1,42 (1,05-2,32)	0,75-9,54
(61)	Caldas	ND	Ocupacional	1,0 (0,52-1,91)	0,52-7,42

Al comparar las concentraciones de Hg por sexo, se observó que los hombres, a pesar de representar el 25% de la muestra poblacional, presentaban mayores concentraciones de Hg en sangre comparados con las mujeres. Similarmente, un estudio previo realizado en poblaciones de la línea costera del Caribe Colombiano, en la que se incluyó la comunidad de Caño del Oro, encontró que los hombres presentaban mayores concentraciones de Hg total en cabello en comparación con

las mujeres, estos hallazgos pueden atribuirse a que los hombres consumen mayores cantidades de pescado y organismos marinos contaminados en comparación con las mujeres (13). Resultados similares se han observado en el análisis de Hg en sangre y cabello entre hombres y mujeres en estudios realizados en Colombia (65-67) y otras regiones del mundo (68).

Al hacer la comparación de los niveles de Hg entre las categorías de edad (menores y mayores de 25 años) no se encontraron diferencias significativas. En contraste, al comparar el tiempo de residencia de los individuos en la zona en los mismos intervalos de tiempo se encontró una diferencia estadísticamente significativa (**Tabla 4**). Aun así, en su naturaleza continua, ambas variables se correlacionaron significativamente con el Hg en sangre. Estos hallazgos reflejan la naturaleza bioacumulable del Hg a través del tiempo de exposición ambiental (66, 69).

Toxicológicamente, el consumo de pescado está directamente relacionado con la adquisición de Hg en humanos (70, 71). En nuestro estudio, se encontró que las personas que consumían pescado de forma diaria presentaban mayores niveles de Hg en sangre en comparación con las personas que consumían al menos una vez por semanal u ocasionalmente. Adicionalmente, una correlación significativa fue identificada entre el consumo de pescado y las concentraciones del metal en sangre, sugiriendo esta variable como un indicador de exposición al Hg en estas comunidades. La contaminación por Hg en peces y otros organismos marinos de la Bahía de Cartagena es conocida, y similar a nuestros resultados, se ha reportado

correlaciones directas entre la frecuencia de ingestión de pescado y la concentración de Hg total en cabello y sangre en personas que viven a lo largo de la Bahía de Cartagena, la Costa Caribe Colombiana y otras regiones de Colombia (13, 16, 65, 67, 72-74).

En cuanto a Cd, nuestros resultados mostraron que el 22,22% (20/90) de los individuos estudiados presentaron Cd en sangre, y que los valores mínimos y máximos entre los que presentaron el metal fueron de 0,2 a 2,99 $\mu\text{g/L}$, con una mediana de 0,43 $\mu\text{g/L}$ (IQR, 0,33-1,02), indicando que ninguno de los individuos estudiados presentó niveles de Cd superiores al permitido por el CDC (5 $\mu\text{g/L}$). Las concentraciones de Cd en la sangre de adultos sanos no expuestos suelen estar en el rango de 0,1 a 4 $\mu\text{g/L}$, según lo informado por la OMS (75) y el CDC (30).

Se conoce que las personas pueden estar ocupacionalmente expuestas a Cd durante la manipulación de productos industriales como pigmentos de color, productos relacionados con el cloruro de polivinilo (PVC) y a fertilizantes fosfatados por mencionar algunos (22, 25). Sin embargo, se ha señalado que en individuos no expuestos ocupacionalmente, la alimentación y el tabaco constituyen dos de las principales fuentes de exposición (76, 77). En primer lugar, el Cd llega al suelo de los terrenos agrícolas a través de deposición aérea, fertilizantes fosfatados y por abono de estiércol, de esa manera el metal llega a los productos vegetales que después son consumidos por el hombre, principalmente el arroz (77, 78). Así mismo, el Cd también se acumula en organismos marinos, constituyendo otra importante

ruta trófica de exposición (79). En el presente trabajo, las personas expuestas a agentes químicos (incluyendo fertilizantes) y al tabaco fueron excluidas para los objetivos del estudio, además, el área no se caracteriza por ser una zona principalmente agrícola. Esto permite pensar que el consumo de organismos marinos se constituye como la principal fuente de exposición a Cd en estas poblaciones, aun así, el consumo de pescado no mostró diferencias relacionadas con la ausencia o presencia del metal en sangre. Hallazgos similares se reportaron en un estudio en donde el consumo de pescado no se relacionó con los niveles de Cd en sangre (65). Todo lo anterior puede explicar la ausencia de Cd en sangre en la mayoría de los individuos estudiados y la baja concentración en los que presentaron el metal.

En este estudio, los parámetros del ensayo de citoma de micronúcleo bucal: frecuencia de micronúcleo, cariorrexis y cariólisis fueron estadísticamente mayores en las personas que presentaron niveles de Hg superiores a 10 µg/L (mediana de 13,21 µg/L; RIQ: 11,05-16,27) en comparación a lo que presentaron niveles menores a 5 µg/L (mediana de 3,71 µg/L; RIQ: 1,95-4,08). Además, se identificaron correlaciones positivas significativas entre las concentraciones de Hg y los parámetros del citoma anteriormente mencionados (micronúcleo, cariorrexis y cariólisis). Estos resultados sugieren que el Hg está relacionado con el aumento de daño en el ADN en las comunidades insulares de Cartagena.

El Hg puede generar daños en el ADN (genotoxicidad) por medio de tres mecanismos o vías principales. Primero, la generación de radicales libres y estrés oxidativo; un aumento en los radicales libres, principalmente los ROS, tiene la capacidad de inducir daño al ADN, daño a nivel celular y, por tanto, la formación de carcinogénesis (31, 80, 81). Segundo, acción sobre los microtúbulos; el Hg y sus compuestos tiene la capacidad de inhibir la formación de microtúbulos o sus proteínas motoras impidiendo la división celular normal (82, 83). Tercero, influencia en la reparación del ADN; se ha informado que una exposición relativamente baja a concentraciones de Hg puede interferir con los mecanismos de reparación genética al inhibir la enzima ADN polimerasa (84)

Múltiples estudios han demostrado a través del BMCyt y el ensayo de citoma de micronúcleos de bloqueo de citocinesis en linfocitos de sangre periférica (CBMCyt), un significativo aumento en el daño del ADN en los grupos expuestos ocupacional u ambientalmente a Hg en comparación a grupos no expuestos, también han reportado correlaciones directas entre las concentraciones de este metal en sangre y los parámetros de cada ensayo. En referencia, Cruz-Esquivel *et al.* (63), en un estudio realizado en municipios a lo largo de la cuenca del río San Jorge en el departamento de Córdoba, reportó un significativo aumento en todos los parámetros del BMCyt en el grupo ambientalmente expuesto a Hg ($p < 0,05$), adicionalmente fue identificada una correlación significativa entre las concentraciones de Hg total en sangre y la frecuencia de cariólisis ($\rho = 0,321$, $p = 0,044$). Complementariamente, un estudio previo realizado en la misma zona indicó una mayor frecuencia de

aparición de micronúcleos (FAM) en linfocitos de sangre periférica en poblaciones ubicadas en áreas mineras (FAM = 0.18-2.56) en comparación con un grupo control (FAM = 0,0), posiblemente debido a las altas concentraciones de Hg total en sangre registradas ($20,32 \pm 8,45 \mu\text{g/L}$) (64). En la Región de la Mojana, en el departamento de Sucre, se encontró un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los habitantes ambientalmente expuestos al Hg en comparación con los controles ($p < 0,02$), adicionalmente fue identificada una correlación positiva significativa entre las concentraciones de Hg total en sangre y la frecuencia de micronúcleos en linfocitos ($p < 0,05$) (85). Un estudio más reciente realizado en La Mojana, encontró que el Hg total en cabello se relacionó con un aumento de micronúcleos en linfocitos en el grupo expuesto (74). Un estudio realizado con pescadores del norte del Mar Tirreno ambientalmente expuesto a Hg encontró una correlación estadística entre la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y la concentración de Hg total en sangre ($\rho = 0.674$, $p = 0.00041$) (86). Así mismo, un pequeño estudio realizado con trabajadores de una fábrica productora de Hg reportó un significativo incremento en el porcentaje de micronúcleos en los individuos con Hg en orina cuando se comparó con un grupo no expuesto (87). Otras poblaciones expuestas al Hg en donde no se evaluó el metal en muestras biológicas han reportado significancias en la frecuencia de anomalías nucleares en células de la mucosa oral respecto al grupo control, sugiriendo la exposición como el principal factor de daño (88, 89).

Tabla 13. Comparación de la frecuencia de micronúcleos con otras poblaciones expuestas a Hg

Referencia	Área de estudio	Ensayo	Tipo de exposición a Hg	Frecuencia en micronúcleos	Comentarios
				Promedio ± DE o Mediana (RIQ)	
Este estudio	Comunidad es insulares de Cartagena, Colombia	BMCyt	Ambiental	5,0 (4,0-7,0)	Hg evaluado en sangre
(63)	Municipios de la Cuenca del río San Jorge, Cordoba, Colombia	BMCyt	Ambiental	6,16 ± 1,76	Hg evaluado en sangre
(89)	Mitrovica, Republica de Kosovo	BMCyt	Ambiental	6,1 ± 3,8	Hg no evaluado en muestras biológicas. Frecuencia de MN excluyendo fumadores
(88)	Municipios a lo largo del Río Santiago, México	BMCyt	Ambiental	4,8 ± 7,3	Hg no evaluado en muestras biológicas
(74)	Región de la Mojana	CBMNcyt	Ambiental	5,54 ± 3,98	Hg evaluado en cabello
(85)	Norte del Mar Tirreno	CBMNcyt	Ambiental	8,74 ± 2,56	Hg evaluado en orina

Como se evidenció anteriormente, los estudios en la literatura emplean mayoritariamente el ensayo CBMNcyt para evaluar la genotoxicidad por mercurio, y generalmente la frecuencia de micronucleos es utilizado como el principal parámetro de daño. En este trabajo, no se aplicó el ensayo CBMNcyt, sin embargo, se ha demostrado una estrecha correlación positiva entre la frecuencia de micronúcleos en BMCyt y CBMNcyt (90, 91). Por tanto, a pesar de las diferencias metodológicas, fuentes de exposición y entornos, nuestros hallazgos son generalmente similares y consistentes con los múltiples informes en la literatura (**Tabla 13**), lo que sostiene que el Hg es un metal pesado que se relaciona con el aumento de anomalías nucleares en las poblaciones expuestas ambiental u ocupacionalmente.

Anteriormente, se abordó los resultados de las concentraciones de Cd en sangre encontradas, discutiéndose en parte las razones de la relativa poca presencia del metal en la población. Sin embargo, es válido mencionar que la pertinencia de estudiar este metal radica en que el Cd puede inducir a daños en el ADN a través de los mecanismos moleculares principales ya conocidos, es decir, la generación de radicales libres y estrés oxidativo (83), y daños en las enzimas involucradas en la reparación del ADN (92). Además, estudios han demostrado que la exposición ambiental u ocupacional al Cd induce una mayor frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica (85, 93, 94), así como el aumento en el daño de ADN detectados por otros bioensayos (7, 93-95).

En general, la variable demográfica como el sexo no tuvo una incidencia significativa relacionada con el daño genético entre el grupo de estudio ($p > 0.05$), y no se identificó correlación significativa entre la edad y la frecuencia de los parámetros del BMCyt. No obstante, se observaron correlaciones significativas entre el tiempo de residencia en el sitio, el consumo de pescado y algunos biomarcadores del citoma. Es posible que estas correlaciones se deban a la co-ocurrencia que existe entre la acumulación de Hg en sangre, el consumo de pescado y el tiempo de exposición ambiental de los individuos. Además, los análisis de consistencia mostraron que independientemente de la o las variables de ajuste, el Hg en sangre se mantuvo consistentemente como un predictor significativo para la frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y cariólisis. Por otro lado, llama la atención que 4 parámetros del BMCyt (micronúcleo, cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis) fueron significativamente más frecuentes en las personas que consumen agua de fuentes no adecuadas. Durante los análisis no se encontró una diferencia en los niveles de Hg en sangre entre las categorías de fuente de agua de consumo, lo que permite pensar que el aumento en el daño genético posiblemente se deba a otros agentes genotóxicos presentes en el agua de consumo no adecuada. Tampoco se descarta la posibilidad de que estos resultados sean producto del no apareamiento en la muestra de ambas categorías, lo que posiblemente representaría poco peso estadístico. Aun así, esta variable no afectó el poder predictivo del Hg en sangre para los parámetros del BMCyt.

Este estudio presentó como principal limitación la ausencia de un grupo control, representado como individuos no expuestos a la fuente de contaminación, en este caso, el área de estudio. Además, el pequeño tamaño muestral entre algunas categorías de las diferentes variables puede no garantizar un peso estadístico durante los análisis. Por tanto, este trabajo se presenta como un estudio principalmente exploratorio y los hallazgos reportados deben complementarse con análisis más robustos. Se proyecta completar este estudio introduciendo un grupo control para complementar los resultados aquí presentados.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

El presente estudio presenta la primera evidencia relacionada con la evaluación del efecto genotóxico por exposición ambiental a metales pesados medidos a través del ensayo de BMCyt en las comunidades de Ararca, Barú, Caño del Oro y Tierra Bomba, zona insular del distrito de Cartagena, Bolívar. Los principales resultados mostraron que, en promedio, todas las comunidades estudiadas presentaron niveles de Hg ligeramente mayores al límite permitido por la OMS, mientras que en Cd estuvieron muy por debajo del límite sugerido por el CDC. Los resultados de este estudio también sugieren que el consumo de pescado y la exposición prolongada al ambiente, en términos de tiempo residiendo en el lugar, fueron indicadores importantes de la exposición al Hg.

Los hallazgos relacionados al BMCyt mostraron que en general, los habitantes con niveles de Hg en sangre por encima de 10 µg/L presentan mayor frecuencia de micronúcleos, cariorrexis y kariólisis en comparación con las personas que presentaron niveles inferiores al umbral permitido (5 µg/L). En concordancia, los análisis de correlación y regresión indican un incremento en la frecuencia de estos biomarcadores a medida que aumentan las concentraciones de Hg en sangre, reconociendo la presencia de Hg como un agente genotóxico en estas poblaciones. Los hallazgos descritos permiten pensar que se debe prestar más atención a la

prevención primaria por contaminación debida a metales pesados, especialmente el Hg. Por otro lado, este estudio demuestra que las células bucales presentan una fuente adecuada y no invasiva para evaluar biomarcadores de daño en el ADN en individuos expuestos a metales pesados, representando una metodología útil y aplicable en futuras investigaciones.

7.2. Recomendaciones

1. Los hallazgos de este estudio permiten recopilar datos importantes sobre la integridad del material genético de las poblaciones estudiadas, invitando a la academia y a las entidades de salud locales a continuar el biomonitoreo o la vigilancia de la integridad genética primaria y de salud general de estas comunidades de manera longitudinal o transversal.
2. Se recomienda ampliar los estudios de este campo con herramientas y análisis que permitan complementar los resultados y visualizar de forma detallada los efectos que los diferentes agentes genotóxicos encontrados en el área pueden ocasionar en la integridad del material genético y la salud de la población.
3. Es recomendable realizar jornadas, campañas o acompañamiento a las poblaciones en riesgo con el fin de informar un resumen de los resultados aquí encontrados y concientizar a los habitantes sobre los principales riesgos de exposición y los efectos que trae consigo la contaminación por metales pesados.

8. Referencias bibliográficas

1. Men C, Liu R, Wang Q, Guo L, Shen Z. The impact of seasonal varied human activity on characteristics and sources of heavy metals in metropolitan road dusts. *Science of The Total Environment*. 2018;637-638:844-54.
2. Semenov DO, Fatjejev AI, Smirnova KB, Shemet AM, Lykova OA, Tyutyunnyk NV, et al. Geochemical and anthropogenic factors of variability of heavy metals content in the soils and crops of Ukraine at the example of copper. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2019;191(8):527.
3. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(1):157-84.
4. Rocha-Román L, Olivero-Verbel J, Caballero-Gallardo KR. Impacto de la minería del oro asociado con la contaminación por mercurio en suelo superficial de San Martín de Loba, sur de Bolívar (Colombia). *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 2018;34(1):10.
5. Olivero J, Mendonza C, Mestre J. Mercurio en cabello de diferentes grupos ocupacionales en una zona de minería aurífera en el Norte de Colombia. *Revista de Saúde Pública*. 1995;29:376-9.

6. Doria Herrera G, Castillo M, Polo F, Investigaciones C, Monteria C. Evaluación ambiental de los niveles de níquel, cadmio y mercurio en la cuenca del río San Jorge en el departamento de Córdoba. Universidad de Córdoba. 2005.
7. Calao CR, Marrugo JL. Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica*. 2015;35(Sup2):139-51.
8. Tosic M, Restrepo JD, Lonin S, Izquierdo A, Martins F. Water and sediment quality in Cartagena Bay, Colombia: Seasonal variability and potential impacts of pollution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2019;216:187-203.
9. Tosic M. La Bahía de Cartagena: Un destino final de la contaminación en Colombia. In: *Agenda del Mar, editor. Arrastrando la montaña hacia el mar. Colombia*2017.
10. Manjarrez Paba G, Castro Angulo I, Utria Padilla L. Bioacumulación de cadmio en ostras de la bahía de Cartagena: Bio-accumulation cadmium in oysters of Cartagena bay. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*. 2008;7:11-20.
11. Olivero-Verbel J, Caballero-Gallardo K, Torres-Fuentes N. Assessment of mercury in muscle of fish from Cartagena Bay, a tropical estuary at the north of Colombia. *International Journal of Environmental Health Research*. 2009;19(5):343-55.

12. Alonso D, Pineda P, Olivero J, González H, Campos N. Mercury levels in muscle of two fish species and sediments from the Cartagena Bay and the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Environmental Pollution*. 2000;109(1):157-63.
13. Olivero-Verbel J, Johnson-Restrepo B, Baldiris-Avila R, Güette-Fernández J, Magallanes-Carreazo E, Vanegas-Ramírez L, et al. Human and crab exposure to mercury in the Caribbean coastal shoreline of Colombia: Impact from an abandoned chlor-alkali plant. *Environment International*. 2008;34(4):476-82.
14. Guerrero E, Restrepo M, Podleskyl E. Contaminacion por mercurio en la Bahía de Cartagena. *Biomédica*. 1995;15:144-54.
15. Olivero-Verbel J, Agudelo-Frias D, Caballero-Gallardo K. Morphometric parameters and total mercury in eggs of snowy egret (*Egretta thula*) from Cartagena Bay and Totumo Marsh, north of Colombia. *Marine Pollution Bulletin*. 2013;69(1):105-9.
16. Manjarres-Suarez A, Olivero-Verbel J. Hematological parameters and hair mercury levels in adolescents from the Colombian Caribbean. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(12):14216-27.
17. Pizarro, D. Estudio Socioeconomico de la población de Santa Ana, Barú. 2008.

18. Espitia-Almeida F, Ospina-Mateus L, Mora G, Gómez-Camargo D, Malambo-García D. Anomalías congénitas en familias de Ararca (Isla de Barú). Bolívar-Colombia. Revista de ciencias biomédicas. 2015;6:251-8.
19. Ruiz-Díaz MS, Mora-García GJ, Salgado-Madrid GI, Alario Á, Gómez-Camargo DE. Analysis of Health Indicators in Two Rural Communities on the Colombian Caribbean Coast: Poor Water Supply and Education Level Are Associated with Water-Related Diseases. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2017;97(5):1378-92.
20. Cartagena cómo vamos. Informe de calidad de vida 2018. Available at http://www.cartagenacomovamos.org/nuevo/wp-content/uploads/2019/09/Informe_de_Calidad_de_Vida-2018_Cartagena_C%C3%B3mo_Vamos.pdf.
21. Escobar J, Granados E, Podlesky E, Valle V. Estudio de la contaminación con mercurio en la Bahía de Cartagena, Colombia. Instituto Nacional de Los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente-Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. 1977.
22. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdisciplinary toxicology. 2014;7(2):60-72.

23. Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, Yang L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(9):8244-59.
24. World Health Organization (WHO). UNEP United Nations Environment Programme, IOMC Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure, 2008.
25. Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure -- a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1998(1):1-51.
26. Orłowski C, Piotrowski JK. Biological levels of cadmium and zinc in the small intestine of non-occupationally exposed human subjects. *Human & Experimental Toxicology*. 2003;22(2):57-63.
27. Fernández MA, Sanz P, Palomar M, Serra J, Gadea E. Fatal Chemical Pneumonitis due to Cadmium Fumes. *Occupational Medicine*. 1996;46(5):372-4.
28. Bonithon-Kopp C, Huel G, Grasmick C, Sarmini H, Moreau T. Effects of pregnancy on the inter-individual variations in blood levels of lead, cadmium and mercury. *Biological research in pregnancy and perinatology*. 1986;7(1):37-42.
29. Prozialeck WC, Edwards JR. Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic

interventions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.

2012;343(1):2-12.

30. Centers for disease control and prevention (CDC). Laboratory procedure manual: cadmium, lead, manganese, mercury, and selenium. 2014. Available at

https://www.cdc.gov/Nchs/Data/Nhanes/Nhanes_13_14/PbCd_H_MET.pdf.

31. Crespo-López ME, Macêdo GL, Pereira SID, Arrifano GPF, Picanço-Diniz DLW, Nascimento JLMd, et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research*. 2009;60(4):212-20.

32. Schurz F, Sabater-Vilar M, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis*. 2000;15(6):525-30.

33. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*. 2007;401(1):1-11.

34. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001;1(6):529-39.

35. Stoiber T, Bonacker D, Böhm KJ, Bolt HM, Thier R, Degen GH, et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes

of mercury (II). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2004;563(2):97-106.

36. Cebulska-Wasilewska A, Panek A, Żabiński Z, Moszczyński P, Au W. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005;586(2):102-14.

37. Asmuß M, Mullenders LH, Hartwig A. Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicology letters*. 2000;112:227-31.

38. Li Y, Jiang Y, Yan X-P. Probing mercury species– DNA interactions by capillary electrophoresis with on-line electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Analytical chemistry*. 2006;78(17):6115-20.

39. IARC, Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, International Agency on Research on Cancer, Lyon, France, 1993, pp. 119–238.

40. Rapisarda V, Miozzi E, Loreto C, Matera S, Fenga C, Avola R, et al. Cadmium exposure and prostate cancer: insights, mechanisms and perspectives. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:1687-700.

41. Mezynska M, Brzóska MM. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(4):3211-32.
42. Il'yasova D, Schwartz GG. Cadmium and renal cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;207(2):179-86.
43. Lockett BG, Su LJ, Rood JC, Fonham ETH. Cadmium exposure and pancreatic cancer in south Louisiana. *J Environ Public Health*. 2012;2012:180186-.
44. Filipič M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012;733(1):69-77.
45. Waalkes MP, Poirier LA. In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicology and applied pharmacology*. 1984;75(3):539-46.
46. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of toxicology*. 2008;82(8):493.
47. Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;238(3):209-14.

48. Casalino E, Sblano C, Landriscina C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997;346(2):171-9.
49. Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Götte W, et al. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*. 2003;24(1):63-73.
50. Nersesyan A, Kundi M, Waldherr M, Setayesh T, Mišák M, Wultsch G, et al. Results of micronucleus assays with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016;770:119-39.
51. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009;4(6):825.
52. Stick HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal of Cancer*. 1983;31(3):305-8.
53. León-Mejía G, Luna-Rodríguez I, Trindade C, Oliveros-Ortíz L, Anaya-Romero M, Luna-Carrascal J, et al. Cytotoxic and genotoxic effects in mechanics occupationally exposed to diesel engine exhaust. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;171:264-73.

54. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008;659(1):93-108.
55. Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2008;638(1):37-47.
56. Rosin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1992;267(2):265-76.
57. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2002;504(1):131-6.
58. Shi Q, King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 2005;437(7061):1038-42.

59. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: A Field Test in Snuff Users. *American Journal of Epidemiology*. 1991;134(8):840-50.
60. Fernández P. Determinación del tamaño muestral. *Cuadernos de Atención Primaria*. 1996;3:138-14.
61. Calao-Ramos C, Bravo AG, Paternina-Uribe R, Marrugo-Negrete J, Díez S. Occupational human exposure to mercury in artisanal small-scale gold mining communities of Colombia. *Environment International*. 2021;146:106-216.
62. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Intoxicaciones por Sustancias Químicas. MSPS; Bogotá, Colombia: 2016. p. 56. versión 2.
63. Cruz-Esquivel Á, Marrugo-Negrete J, Calao-Ramos C. Genetic damage in human populations at mining sites in the upper basin of the San Jorge River, Colombia. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26(11):10961-71.
64. Madrid GL. Genotoxicidad de metales pesados (Hg, Zn, Cu, Pb y Cd) asociado a explotaciones mineras en pobladores de la cuenca del río San Jorge del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. 2011;1(23).
65. Alcalá-Orozco M, Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J. Biomonitoring of Mercury, Cadmium and Selenium in Fish and the Population of Puerto Nariño, at

the Southern Corner of the Colombian Amazon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2020;79(3):354-70.

66. Díaz SM, Muñoz-Guerrero MN, Palma-Parra M, Becerra-Arias C, Fernández-Niño JA. Exposure to Mercury in Workers and the Population Surrounding Gold Mining Areas in the Mojana Region, Colombia. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(11):2337.

67. Salazar-Camacho C, Salas-Moreno M, Marrugo-Madrid S, Marrugo-Negrete J, Díez S. Dietary human exposure to mercury in two artisanal small-scale gold mining communities of northwestern Colombia. *Environment International*. 2017;107:47-54.

68. Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. Current Hair Mercury Levels in Japanese: Survey in Five Districts. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2003;199(3):161-9.

69. Holmes P, James KAF, Levy LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Science of The Total Environment*. 2009;408(2):171-82.

70. Wattigney WA, Irvin-Barnwell E, Li Z, Ragin-Wilson A. Biomonitoring of mercury and persistent organic pollutants in Michigan urban anglers and association with fish consumption. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2019;222(6):936-44.

71. Kimáková T, Kuzmová L, Nevolná Z, Bencko V. Fish and fish products as risk factors of mercury exposure. *Ann Agric Environ Med.* 2018;25(3):488-93.
72. Valdelamar-Villegas J, Olivero-Verbel J. High Mercury Levels in the Indigenous Population of the Yaigojé Apaporis National Natural Park, Colombian Amazon. *Biological Trace Element Research.* 2020;194(1):3-12.
73. Marrugo-Negrete JL, Ruiz-Guzmán JA, Díez S. Relationship Between Mercury Levels in Hair and Fish Consumption in a Population Living Near a Hydroelectric Tropical Dam. *Biological Trace Element Research.* 2013;151(2):187-94.
74. Galeano-Páez C, Espitia-Pérez P, Jimenez-Vidal L, Pastor-Sierra K, Salcedo-Arteaga S, Hoyos-Giraldo LS, et al. Dietary exposure to mercury and its relation to cytogenetic instability in populations from “La Mojana” region, northern Colombia. *Chemosphere.* 2021;265:129066.
75. World Health Organization (WHO). *Environmental Health Criteria 134: Cadmium.* 1992.
76. Richter P, Faroon O, Pappas RS. Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(10):1154.
77. Dharma-wardana MWC. Fertilizer usage and cadmium in soils, crops and food. *Environmental Geochemistry and Health.* 2018;40(6):2739-59.

78. Ramírez A. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2002;63(1):51-64.
79. Bosch AC, O'Neill B, Sigge GO, Kerwath SE, Hoffman LC. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(1):32-48.
80. Carvalho LVB, Hacon SS, Vega CM, Vieira JA, Larentis AL, Mattos RCOC, et al. Oxidative Stress Levels Induced by Mercury Exposure in Amazon Juvenile Populations in Brazil. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(15).
81. Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJS, Garcia SC, Mergler D, et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Science of The Total Environment*. 2010;408(4):806-11.
82. Bonacker D, Stoiber T, Wang M, Böhm KJ, Prots I, Unger E, et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of Toxicology*. 2004;78(10):575-83.
83. Stoiber T, Bonacker D, Böhm KJ, Bolt HM, Thier R, Degen GH, et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2004;563(2):97-106.

84. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(2):321-36.
85. Márquez MH, Negrete JLM, editors. *Genotoxicidad de metales presentes en el agua de bebida en la Región de la Mojana, departamento de Sucre, Colombia*. 2014; 2016.
86. Franchi E, Loprieno G, Ballardin M, Petrozzi L, Migliore L. Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1994;320(1):23-9.
87. Queiroz M, Bincoletto C, Quadros M, Capitani ED. Presence of Micronuclei in Lymphocytes of Mercury Exposed Workers. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 1999;21(1):141-50.
88. Gómez-Meda BC, Zúñiga-González GM, Sánchez-Orozco LV, Zamora-Perez AL, Rojas-Ramírez JP, Rocha-Muñoz AD, et al. Buccal micronucleus cytome assay of populations under chronic heavy metal and other metal exposure along the Santiago River, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2017;189(10):522.
89. Letaj K, Elezaj I, Selimi Q, Kurteshi K. The Effects of Environmental Pollution with Heavy Metals in Frequency of Micronuclei in Epithelial Buccal Cells of Human Population in Mitrovica. *Journal of Chemical Health Risks*. 2012;2(3).

90. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2010;705(1):11-9.
91. León-Mejía G, Quintana M, Debastiani R, Dias J, Espitia-Pérez L, Hartmann A, et al. Genetic damage in coal miners evaluated by buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014;107:133-9.
92. Zhou Z-h, Lei Y-x, Wang C-x. Analysis of Aberrant Methylation in DNA Repair Genes During Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Cadmium. *Toxicological Sciences*. 2012;125(2):412-7.
93. Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003;540(1):19-28.
94. Fu J, Huang X, Zhu X. Study on peripheral blood lymphocytes chromosome abnormality of people exposed to cadmium in environment. *Biomedical and environmental sciences: BES*. 1999;12(1):15-9.
95. Forni A. Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans. *Toxicology Letters*. 1994;72(1):185-90.