

Biomédica 2015;35(Supl.2):139-51
doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2392>

ARTÍCULO ORIGINAL

Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013

Clelia Rosa Calao, José Luis Marrugo

Grupo de Investigación en Aguas, Química Aplicada y Ambiental, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia

Introducción. En Colombia, la minería es una actividad económica importante; sin embargo, genera grandes cantidades de residuos que contienen elementos potencialmente tóxicos, como los metales pesados, que contaminan los ecosistemas y ponen en riesgo la salud humana. La región de La Mojana es una de las zonas más ricas en biodiversidad del planeta y se ha visto sometida a procesos de contaminación muy relacionados con la minería de oro que se desarrolla en sus alrededores.

Objetivo. Evaluar la genotoxicidad en una población expuesta a residuos de metales pesados en la región de La Mojana.

Materiales y métodos. Se evaluaron los efectos genotóxicos y su relación con la concentración de metales pesados (mercurio, cadmio y plomo) en muestras de sangre de la población expuesta y el grupo de control. El grupo expuesto lo conformaron habitantes de los municipios de Guaranda, Sucre, Majagual y San Marcos; en el grupo de control se incluyó a habitantes del municipio de Montería. Se determinó el daño en el ADN mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas. Las concentraciones de mercurio se establecieron mediante espectrometría de absorción atómica con vapor frío, en tanto que las de cadmio y plomo se determinaron por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito.

Resultados. Las concentraciones de los metales sobrepasaron los límites permitidos por la Organización Mundial de la Salud. Se evidenciaron efectos genotóxicos posiblemente asociados a la presencia de los metales en la sangre. Se encontraron asociaciones significativas ($p < 0,05$) entre la presencia de mercurio y de cadmio, y el daño en el ADN.

Conclusión. Estos resultados sugieren que el daño genético registrado en pobladores de la región de La Mojana, Colombia, puede estar asociado a la presencia de los metales estudiados en las muestras de sangre.

Palabras clave: metales pesados, genotoxicidad, ensayo cometa, contaminación ambiental, linfocitos, ADN.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2392>

Genotoxic effects in a human population exposed to heavy metals in the region of La Mojana, Colombia, 2013

Introduction: Mining is an economically important activity in Colombia which generates large quantities of residues containing potentially toxic elements such as heavy metals. These contaminate ecosystems and place human health at risk. La Mojana lies within one of the most biodiversity-rich zones on Earth and has been subjected to processes of contamination closely related to gold mining activities in the surrounding areas.

Objective: To evaluate genotoxicity in the population of La Mojana region exposed to heavy metals.

Materials and methods: Genotoxic effects and their relationship with concentrations of heavy metals (mercury, cadmium and lead) in blood were evaluated among an exposed population and a control group. The exposed group comprised inhabitants of the municipalities of Guaranda, Sucre, Majagual and San Marcos; inhabitants of the municipality of Montería were chosen as a control group. DNA damage was determined using the alkaline comet assay. Concentrations of mercury were determined by cold vapor atomic absorption spectrometry, and those of cadmium and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry.

Results: Concentrations of the heavy metals exceeded the limits permitted by the World Health Organization. Genotoxic effects were found in the exposed population, possibly associated with the

Contribución de los autores:

Clelia Rosa Calao: ejecución del estudio en campo y realización de pruebas biológicas (ensayo cometa), análisis de resultados y redacción del artículo

José Luis Marrugo: concepción y diseño del estudio, revisión del manuscrito en cuanto a la dinámica de la contaminación con metales pesados y su relación con la salud pública como aplicación de la vigilancia ambiental

presence of these metals in blood. Significant associations ($p < 0.05$) were found between mercury and cadmium levels and damage to DNA.

Conclusion: These results suggest that the genetic damage recorded among inhabitants of the region of La Mojana, Colombia, may be associated with the presence of heavy metals in the blood.

Key words: Metals, heavy; genotoxicity; comet assay; environmental pollution; lymphocytes; DNA.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2392>

En la actualidad, muchos problemas de salud, incluidos varios tipos de cáncer, podrían estar asociados con la exposición a uno o varios contaminantes en circunstancias específicas, como el alto grado de exposición ambiental u ocupacional a contaminantes químicos en mezclas complejas procedentes de la industria, y presentes en el agua, los alimentos y el humo de cigarrillo, entre otros (1,2).

Los metales pesados, como el mercurio, el cadmio y el plomo, contenidos en estas mezclas, contaminan el ambiente acuático, atmosférico y terrestre, y provienen de actividades antropogénicas como la minería de oro y la fundición de metales, la producción química, la industria de cloro-álcali, la manufactura de cemento, los residuos industriales, municipales y hospitalarios, las emisiones de los rellenos sanitarios, la agricultura y algunas prácticas forestales (3). En la clasificación de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) se considera al mercurio, el plomo y el cadmio como posibles carcinógenos para los seres humanos (los dos primeros en el grupo 2B y el último en el grupo 1) (4). Varios estudios en los que se han utilizado herramientas de toxicogenómica, han demostrado que los metales pesados son capaces de catalizar el deterioro oxidativo de las biomoléculas (5).

Por otra parte, diferentes legislaciones sanitarias a nivel mundial establecen límites permisibles de metales pesados en el agua de consumo, para garantizar un nivel mínimo de riesgo para la salud humana. En Colombia, la norma oficial para la calidad del agua establece que la concentración de mercurio, cadmio y plomo en el agua de consumo, no debe sobrepasar valores de 1, 3 y 10 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

Jadhav, *et al.* (6), llevaron a cabo un estudio en India con ratones machos expuestos durante 90 días a agua de consumo que contenía una mezcla de estos tres metales y encontraron un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, así como una disminución en el glutatión y en las actividades de la antioxidasa del riñón, el hígado y el cerebro, con concentraciones 10 y 100 veces superiores a las normales para el agua de consumo. Además, en este experimento se ensayaron concentraciones iguales al máximo límite permisible por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y no se encontraron efectos observables (cadmio: 0,005 mg/L, mercurio: 0,008 mg/L; plomo: 0,018 mg/L).

La presencia de los metales pesados y de compuestos orgánicos complejos en los recursos hídricos y en el medio ambiente, es responsable de innumerables situaciones de impacto sobre la salud pública en general (7). En Japón, se han presentado casos críticos, como la contaminación por cadmio en el río Jintsu (8,9) y por metilmercurio en la bahía de Minamata (8,10).

En Colombia, la minería es una actividad de gran importancia económica, sin embargo, en la mayoría de los casos se hace con muy poco seguimiento ambiental. Una de las consecuencias de la actividad asociada a la explotación de los recursos metálicos, es la producción de grandes cantidades de residuos que generan focos de emisión de contaminantes que pueden contener elementos potencialmente tóxicos, como los metales pesados, según los parámetros de la *Environmental Protection Agency* (EPA) de los Estados Unidos. En este caso, su peligrosidad es mayor debido a que no se han degradado o destruido, por lo que, una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante muchos años, aumentar su concentración en los seres vivos y acumularse (11). En el caso del mercurio, este tiene una gran capacidad de 'biomagnificarse' y, conforme aumentan los niveles de la cadena trófica, también lo hace el grado de acumulación del metilmercurio en los tejidos de los seres vivos (12).

La región de La Mojana es una de las zonas más ricas en biodiversidad en Colombia, productora de alimentos y abundante en recursos hídricos,

Correspondencia:

Clelia Rosa Calao, Grupo de Investigación en Aguas, Química Aplicada y Ambiental, Departamento de Química, Universidad de Córdoba, Carrera 6 N° 76-103, Montería, Colombia
Teléfono y fax: (574) 786 0381, extensión 310
cleli37@hotmail.com

Recibido: 20/05/14; aceptado: 29/04/15

que presta muchos servicios ambientales. Históricamente, la región se ha visto afectada por las inundaciones de los ríos que la circundan, el Magdalena, el Cauca y el San Jorge, los cuales sufren el impacto de la minería de oro y el consecuente proceso de contaminación gradual con metales pesados, principalmente el mercurio (8,13,14) (Marrugo J, Lans E. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el Departamento de Córdoba. Informe de investigación, 2006). Además, en las cuencas de estos ríos se desarrollan explotaciones de ferromanganeso y carbón, las cuales también liberan una mezcla compleja de metales pesados y otros contaminantes a la atmósfera, el agua y el suelo (Marrugo J, Lans E. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el Departamento de Córdoba. Informe de investigación. 2006). Esta mezcla llega a la región de La Mojana, bien sea por transporte atmosférico o por las inundaciones que se dan con frecuencia en esta zona (15). Dichas actividades mineras son un factor de riesgo para las comunidades de la zona si se tiene en cuenta que muchas poblaciones usualmente toman el agua de sistemas de abastecimiento que la captan en fuentes superficiales o subterráneas, sin tratamiento adecuado para su potabilización. La contaminación por metales pesados a la que está expuesta la población humana, puede generar diversos efectos tóxicos en su salud, debido a que muchos de dichos metales actúan de manera individual o en sinergia, y ocasionan efectos genotóxicos, carcinógenos, hematotóxicos y neurotóxicos, así como en el sistema endocrino, entre otros (16).

La evaluación de los biomarcadores de genotoxicidad es una metodología eficiente para tamizar el potencial efecto peligroso de un gran número de químicos o mezclas complejas. Uno de los métodos utilizados para evaluar las rupturas del ADN, que constituyen lesiones premutágenas y marcadores del daño genético, es el ensayo cometa, también conocido como "electroforesis alcalina de células individuales" (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*, SCG) (17,18). Este se ha utilizado para evaluar la capacidad de los contaminantes que inducen daño en el ADN y su aplicabilidad en la vigilancia ambiental con métodos biológicos ha llamado la atención (19).

A pesar de que en la región de La Mojana se ha evidenciado la acumulación de metales pesados en el agua, los sedimentos, los peces y las plantas (13,14,20), así como en los humanos (21), no existen reportes sobre los efectos genotóxicos de estos metales en la población expuesta. El objetivo principal de este estudio fue evaluar los efectos genotóxicos en linfocitos de sangre periférica de pobladores de la región de La Mojana, mediante el ensayo cometa, y determinar su posible relación con las concentraciones de metales pesados detectadas en sus muestras de sangre.

Materiales y métodos

Área de estudio

La región de La Mojana está ubicada en el noroeste de Colombia, entre los 8° 00' y los 9° 30' de latitud norte y entre los 75° 15' y los 73° 45' de longitud oeste. Tiene una superficie de 5.545 km² y una población de 420.575 habitantes (22), e incluye los municipios de Achí, Ayapel, Caimito, Guaranda, Majagual, San Benito, San Marcos, Magangué, San Jacinto y Sucre. La región está rodeada por tres ríos: el Magdalena, el Cauca y el San Jorge, y es atravesada por canales que drenan el área durante los períodos de inundación, los cuales ocurren principalmente en la región oeste, en la cuenca del San Jorge. Durante la temporada de lluvias (de mayo a diciembre), esta zona recibe descargas de mercurio y otros metales pesados transportados por el río Cauca, y provenientes de los residuos de la extracción del oro en las minas ubicadas en los departamentos de Bolívar y Antioquia que circundan la región de La Mojana (12,23,24) (figura 1).

Tipo de estudio

El estudio fue de tipo descriptivo y corte transversal, y se orientó a evaluar la presencia o ausencia de efectos genotóxicos asociados a metales pesados en poblaciones de la región de La Mojana.

Población objetivo y tamaño de la muestra

La población objeto de estudio incluyó a individuos entre los 18 y los 50 años de edad, habitantes de cuatro municipios de la región de La Mojana: San Marcos (23.960 individuos), Guaranda (7.193 individuos), Sucre (10.728 individuos) y Majagual (15.856 individuos), para un total de 57.737 personas según el censo del DANE de 2005 (25).

El tamaño de la muestra se calculó mediante la fórmula 1, asumiendo un valor de p de 0,5 (26), es decir que el 50 % de los individuos podrían

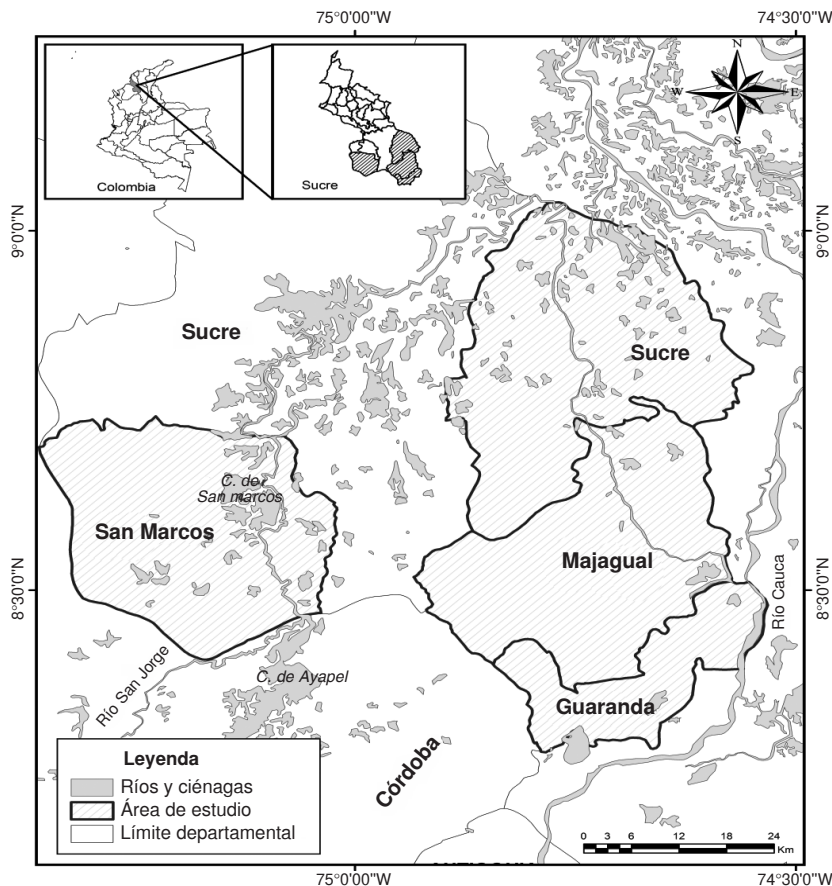


Figura 1. Mapa de la zona de estudio

presentar la característica evaluada (efectos genotóxicos asociados a metales pesados), pues no había estudios previos que permitieran conocer la proporción de población afectada. De este modo, el tamaño calculado de la muestra, necesario para el estudio, fue de 61 individuos, con un nivel de confianza establecido del 95 % y un error máximo permitido del 8 %.

La distribución de las muestras entre los diferentes municipios evaluados, se hizo 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 por municipio fue el siguiente: 29 de San Marcos, 8 de Guaranda, 17 de Sucre y 7 de Majagual, para una muestra total de 61 individuos. En cuanto al grupo de control, conformado por habitantes del municipio de Montería, el número de muestras fue de 51, similar al tamaño de la muestra del grupo de estudio.

Formula 1: $n = \frac{P \cdot Q \cdot Z^2}{(\xi)^2}$, donde Z^2 corresponde al nivel de confianza de 95 %, P a la proporción esperada de individuos con efectos genotóxicos asociados a metales pesados (0,5), ξ^2 al error máximo permitido de 8 %, siendo Q^* igual a 1 y P igual a 0,5.

Los participantes del estudio respondieron un cuestionario destinado a reunir información sobre sus datos generales, su estilo de vida (consumo de alcohol o tabaco), la fuente de consumo de agua, el resumen de su historia clínica, sus antecedentes laborales y sus hábitos alimenticios, así como la exposición a algún otro agente genotóxico.

El grupo expuesto se seleccionó de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión: tener 10 o más años de permanencia en la zona de estudio, participar de manera voluntaria en el estudio, y no encontrarse bajo tratamiento farmacológico ni haber padecido cáncer o enfermedades crónicas degenerativas de tipo infeccioso durante los tres meses anteriores a la toma de la muestra. Los criterios de inclusión del grupo de control fueron

similares a los del grupo expuesto, excepto que las personas no debían haber vivido en la región de La Mojana ni haber estado en los últimos 10 años en esas zonas o en franjas mineras.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado después de que se les explicaron los objetivos y los alcances del estudio, así como las posibles repercusiones sobre su salud. Se tuvieron en cuenta los lineamientos del Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Córdoba y lo pertinente de la Resolución 008430 del Consejo Nacional de Salud (ítem IV).

Recolección y tratamiento de las muestras

Se obtuvieron dos muestras de 4 ml de sangre por venopunción de cada participante del estudio, las cuales se depositaron en tubos Vacutainer, uno con el anticoagulante EDTA K₂ para el análisis de los metales, y otro con heparina para el ensayo cometa (27). Las muestras se protegieron de la luz y se transportaron a una temperatura entre los 4 y 16 °C al Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad de Córdoba para su posterior procesamiento y análisis.

Determinación de mercurio en sangre

Se transfirieron 2 ml de cada muestra de sangre a un vaso de teflón de 100 ml de capacidad, al que posteriormente se le agregaron 8 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de peróxido de hidrógeno (30 %) (28). Los vasos se cerraron y su digestión se hizo en un horno microondas de marca Ethos Touch a una temperatura de 280 °C, con una presión de 80 bares y una potencia de 1.400 W durante 30 minutos (29). Una vez enfriadas, las soluciones se transfirieron a un reactor marcado y el volumen final se ajustó hasta 70 ml agregando agua desionizada. El análisis de mercurio total en sangre se hizo mediante la espectrometría de absorción atómica con vapor frío (*Application of Cold Vapor-Atomic Absorption Spectrophotometry, CVAAS*), descrita por Magos y Clarkson (30), utilizando un equipo Thermo Scientific™, modelo iCE, serie 3000, con un sistema de generación de vapor frío a una longitud de onda de 253,7 nm (23).

Determinación de cadmio y plomo en sangre

Se transfirieron 2 ml de sangre a un vaso de teflón de 100 ml de capacidad al que posteriormente se le agregaron 8 ml de ácido nítrico concentrado y 2 ml de peróxido de hidrógeno (30 %) (28). Los vasos se cerraron y su digestión se hizo en un

horno microondas de marca Ethos Touch a una temperatura de 280 °C, con una presión de 80 bares y una potencia de 1.400 W durante 30 minutos (31,32). Una vez enfriada, la solución se transfirió a un recipiente limpio y seco. Una alícuota de 500 µl de la solución sometida a digestión se colocó en un contenedor de muestra y su volumen se ajustó hasta 1 ml con agua desionizada para la determinación de cadmio y plomo mediante espectrometría de absorción atómica en horno de grafito.

Ensayo cometa

Este se hizo de acuerdo con la metodología original (versión alcalina) descrita por Singh, *et al.* (27), con modificaciones (33,34). Para la preparación de las muestras, se tomaron 10 µl de linfocitos aislados (27) y se mezclaron con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión. Esta preparación se colocó en un portaobjeto cubierto previamente con la primera capa de agarosa de punto de fusión normal; estos portaobjetos se sumergieron en una solución de lisis; en este punto se produjo la lisis de las membranas celulares, y el ADN liberado se sometió a electroforesis bajo condiciones controladas.

Posteriormente, se llevaron los portaobjetos a una cámara de electroforesis que contenía una solución alcalina, durante 30 minutos. Se los sometió entonces a electroforesis durante 30 minutos a 25 voltios y 300 mA para evaluar la migración (cola del cometa). Los portaobjetos se lavaron con solución neutralizadora Tris 0,4 M.

Por último, las muestras se tiñeron con solución de bromuro de etidio (2 µg/ml) y se observaron en la oscuridad con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 505-560 nm y un objetivo de 40X.

Se cuantificaron 100 células por muestra de cada individuo, 50 en cada réplica. Se determinó la cantidad de células en cada nivel de daño, considerando los siguientes niveles: nivel 0, ausencia de daño (sin migración de fragmentos, sin cola); nivel 1, con daño leve (cola de longitud menor al diámetro del nucleoide); nivel 2, con daño moderado (longitud de la cola mayor al diámetro de un nucleoide, pero menor al diámetro de dos); nivel 3, con alto grado de daño (cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres), y nivel 4, con grado de daño extremadamente alto (cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides). Debe recordarse que, a medida que la longitud de la cola aumenta y, por ende, la cantidad de ADN en ella, el nucleoide ("cabeza del

cometa”) va perdiendo intensidad y tamaño (35). Esta clasificación se determinó de acuerdo con el sistema de clasificación visual (36,37) y se expresó como el índice de daño (ID), teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$ID = n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4,$$

donde n es la cantidad de células clasificadas en cada categoría de daño.

Los parámetros de longitud de la migración del ADN y su porcentaje en la cola (que, por lo general, se expresan en μm), se analizaron mediante un programa de análisis de imagen, el *Comet Score*. Actualmente, los criterios utilizados para identificar el final y el borde principal de la migración del ADN, dependen del investigador y del programa empleado.

Análisis estadístico

Después del análisis de normalidad de los datos originales y transformados (prueba de Shapiro-Wilk negativa en algunos casos, $p < 0,05$), se procedió al tratamiento de los datos mediante pruebas no paramétricas. Se hizo el análisis de varianza de Kruskal-Wallis y se aplicó la prueba de Dunn para comparar los resultados del ensayo cometa en los grupos de estudio. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las concentraciones de metales en el grupo expuesto y en el de control; además, se hizo un análisis de correlación (Spearman) para establecer el grado de asociación entre las concentraciones de metales pesados y el daño en el ADN. Para todos los análisis se estableció una significancia estadística de $p < 0,05$. Para efectos de los cálculos estadísticos, a las concentraciones menores a los límites de detección se les asignó un valor igual a la mitad del valor del límite de detección (38).

Las variables epidemiológicas tenidas en cuenta en humanos, como el sexo, la edad, la ocupación, etc., se analizaron mediante el test de ji al cuadrado, para establecer su dependencia con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas.

Resultados

Descripción general

En el estudio participaron 112 individuos (61 de la población expuesta y 51 de la población de control), de los cuales 41 eran mujeres y 20 hombres. El promedio y la desviación estándar de la edad fueron de $39,2 \pm 8,3$ años, con un mínimo de 21 y un máximo de 50 años en el grupo expuesto. El

grupo de control incluía a 30 mujeres y 21 hombres, y el promedio y desviación estándar de la edad fueron de $32,4 \pm 13,3$ años, con un mínimo de 18 y un máximo de 54 años.

En cuanto al grado de escolaridad, el 23 % de la población de la región de La Mojana era analfabeta, el 38 % no había terminado la primaria, el 18 % tenía la primaria completa, el 10 % no había terminado la secundaria y el 6 % la había completado; solo el 5 % de la población tenía un grado técnico. En el grupo de control, el 4 % era analfabeta, el 13 % no había completado la primaria, el 21 % no había terminado la secundaria y el 19 %, sí, en tanto que el 11 % tenía título de técnico y el 21 % tenía nivel universitario.

Con respecto a la ocupación, el 55,7 % de los participantes eran amas de casa, en su mayoría esposas de pescadores, el 22 % eran pescadores, el 18 % se dedicaba a trabajos varios y el 3,2 % a la agricultura.

Con respecto al hábito del tabaco, el 6 % de ellos eran fumadores, de los cuales dos eran hombres y dos mujeres; en el grupo de control ninguno era fumador. El 77 % de los individuos expuestos y el 90 % del grupo de control, refirieron no ingerir bebidas alcohólicas.

El 77 % de la población de la región de La Mojana manifestó no darle ninguna clase de tratamiento al agua de consumo humano. En esta región, la mayor parte del agua de consumo proviene de pozos artesanales y aguas superficiales (ciénagas, caños y ríos). Solo el 14 % de las personas estudiadas le aplicaba algún tipo de tratamiento al agua de consumo; en el grupo de control, el 47 % de las personas no trataba el agua de consumo.

Con respecto al consumo de alimentos, el pescado se señaló como la principal fuente de proteína, el 92 % de los participantes en el grupo expuesto lo consumía diariamente y, el 18 %, al menos una vez por semana. Asimismo, se registró un gran consumo de arroz en la zona.

Es importante resaltar que, según la Alta Consejería para la Reintegración (2008), la población en estudio tiene uno de los mayores índices de necesidades básicas insatisfechas y de miseria en el país, los cuales superan, en promedio, el 85 y el 57 %, respectivamente.

Pruebas de laboratorio

En el cuadro 1 se presentan el promedio y las concentraciones de los metales analizados en las muestras de sangre de los grupos de estudio y del

Cuadro 1. Concentraciones de mercurio, plomo y cadmio en sangre ($\mu\text{g/l}$) en las zonas expuestas y la de control

Grupos de estudio	Metal ($\mu\text{g/l}$)		
	Mercurio	Plomo	Cadmio
	Promedio \pm DE (Min-max)	Promedio \pm DE (Min-max)	Promedio \pm DE (Min-max)
San Marcos *n=29	15,32 \pm 7,40 (6,30-36,6)	12,54 \pm 8,01 (2,30-36,01)	3,61 \pm 4,64 (0,50-14,43)
Sucre n=17	11,77 \pm 2,73 (8,56-18,30)	20,02 \pm 1,87 (8,67-52,46)	12,47 \pm 9,52 (0,5-28,79)
Majagual n=7	13,21 \pm 3,32 (8,54-17,53)	4,79 \pm 3,23 (0,25-7,76)	15,70 \pm 7,34 (0,5-22,96)
Guaranda n=8	14,30 \pm 12,06 (8,34-16,43)	8,67 \pm 11,97 (5,5-20,20)	16,42 \pm 4,46 (4,93-19,99)
Control n=51	0,31 \pm 0,55 (0,04-2,259)	0,15 \pm 0,14 (0,01-0,59)	0,02 \pm 0,01 (0,01-0,04)
*LP	15	10-30	3

* n: número de muestras

** LP: límite permisible ($\mu\text{g/l}$), según la OMS, 2004 (35) y la ATSDR, 2000 (14)

grupo de control, así como los límites de mercurio, cadmio y plomo permisibles según la OMS (39), y por la (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2000*) (16).

Con respecto al promedio de las concentraciones de metales en las muestras analizadas por municipios, se encontró que el de plomo sobrepasaba los límites permisibles en todos los municipios, el de mercurio solo sobrepasó los límites en San Marcos y el de cadmio no sobrepasó los límites en ninguno de los municipios.

Sin embargo, según las concentraciones de metales en las muestras individuales, se encontró que el 79,3, el 70,6, el 71,4 y el 75,0 % de las muestras de San Marcos, Sucre, Majagual y Guaranda, respectivamente, sobrepasaban los límites permitidos de mercurio establecidos por la OMS (39). Asimismo, el 37,9, el 70,6, el 85,7 y el 87,5 % de las muestras de San Marcos, Sucre, Majagual y Guaranda, respectivamente, sobrepasaron los límites permitidos de las concentraciones de cadmio según la ATSDR (16).

Los niveles de plomo sobrepasaron los límites establecidos por la OMS en el 3,44 y el 11,76 % de las muestras obtenidas en San Marcos y Sucre, en tanto que en la población de Majagual y de Guaranda no los sobrepasaron (39). En el grupo de control, los niveles estaban por debajo de los límites permitidos para cada uno de los metales analizados. Las concentraciones de mercurio, plomo y cadmio y sus medias, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre la población de estudio y el grupo de control.

En el cuadro 2 se presentan los promedios de los parámetros evaluados en el ensayo cometa: el índice de daño, la longitud de la cola (μm), y el porcentaje de ADN en la cabeza y en la cola. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los parámetros evaluados entre los individuos expuestos y el grupo de control, excepto en el índice de daño.

En el municipio de Majagual, el daño en el ADN fue mayor que el índice de daño, la longitud de la cola y el porcentaje de ADN en la cola. Los promedios del índice de daño fueron menores en Guaranda, al igual que los promedios de longitud de la cola y el porcentaje de ADN en la cola hallados en San Marcos. Se encontró que el porcentaje de ADN en la cabeza entre las personas del grupo expuesto, fue menor que el del grupo de control, lo cual evidenció el daño del ADN (cuadro 2).

En el cuadro 3 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman de las concentraciones de mercurio, cadmio y plomo en las muestras de sangre ($\mu\text{g/l}$) y los parámetros del ensayo cometa en personas expuestas en la región de estudio. Se encontraron correlaciones positivas estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los parámetros de índice de daño y el porcentaje de ADN en la cola, y las concentraciones de cadmio en sangre.

Discusión

Los pobladores de la región de La Mojana dominan una cultura anfibia sometida tanto a los vaivenes de las crecientes de los ríos como a sus sequías, por lo cual han combinado las labores agrícolas,

Cuadro 2. Parámetros del ensayo cometa en el grupo expuesto y en el grupo de control (promedio \pm desviación estándar)

Parámetros	Grupo de control (*n=51)	Grupo expuesto			
		Sucre-Sucre (n=17)	Guaranda (n=8)	Majagual (n= 7)	San Marcos (n= 29)
**ID	3,92 \pm 6,5 ^b	17 \pm 23 ^a	11 \pm 16 ^{ab}	28 \pm 21 ^{ab}	11 \pm 17 ^{ab}
Porcentaje de ADN en la cabeza	94,5 \pm 5,0 ^a	81,9 \pm 14,4 ^b	79,8 \pm 14,0 ^b	73,1 \pm 14,98 ^b	82,1 \pm 11,5 ^b
Longitud de la cola (μ m)	19,6 \pm 12,6 ^b	60,8 \pm 22,6 ^a	71,7 \pm 28,7 ^a	81,4 \pm 33,2 ^a	60,5 \pm 11,5 ^a
Porcentaje de ADN en la cola	13,2 \pm 7,7 ^b	26,0 \pm 10,7 ^a	27,1 \pm 11,1 ^a	33,2 \pm 8,3 ^a	26,0 \pm 8,3 ^a

* n: número de muestra; **ID: índice de daño

Las letras ^a y ^b en el grupo expuesto con respecto al grupo de control, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).**Cuadro 3.** Coeficiente de correlación de Spearman entre las concentraciones de mercurio, plomo y cadmio en sangre (μ g/l), y los parámetros del ensayo cometa en la población expuesta

Parámetros	Metal					
	Mercurio (μ g/l)		Plomo (μ g/l)		Cadmio (μ g/l)	
	r	p	r	p	r	p
*ID	-0,1575	0,2246	0,0149	0,9089	0,3648	0,0040
Porcentaje de ADN en la cabeza	0,2435	0,050	0,0459	0,724	-0,2503	0,519
Longitud de la cola (μ m)	-0,0833	0,522	-0,1310	0,313	0,1170	0,368
Porcentaje de ADN en la cola	-0,1961	0,129	-0,1071	0,41	0,2989	0,019

p: valor de significancia estadística; *ID: índice de daño

Los valores en negrilla indican una correlación significativa ($p < 0,05$).

pecuarias y selváticas con las actividades fluviales y pesqueras en el mismo hábitat (40). Las comunidades que habitan la zona rural de La Mojana, presentan altos índices de pobreza y de miseria que se expresan, por ejemplo, en la inexistencia o la deficiencia de los sistemas de potabilización de agua, con los cuales se removerían los contaminantes; de igual manera, los servicios de educación presentan problemas de cobertura y calidad (41), lo cual se reflejó en este estudio al constatar que solo el 5 % de la población de estudio había cursado uno o dos grados de educación.

En este estudio, las concentraciones de mercurio, cadmio y plomo en la mayoría de las muestras de sangre del grupo expuesto, sobrepasaron los límites permisibles (cuadro 1).

La mayoría de los habitantes de la región de La Mojana consumen alimentos producidos en la zona y el pescado es su principal fuente proteica. En muchos casos, los alimentos se consumen sin observar las normas de higiene y seguridad alimentaria. Es probable que las altas concentraciones de mercurio encontradas en este estudio, estén relacionadas con la ingestión frecuente de pescado contaminado por el metal, dado que las personas de la región lo consumen diariamente o, al menos, una vez en la semana. Además, en un estudio previo de

Marrugo, *et al.* (14), se encontró que 237 muestras de pescado de un área cercana a la región de La Mojana presentaban niveles de mercurio por encima del límite máximo permisible para consumo humano establecido por la OMS (1990). Por otra parte, Gracia, *et al.* (21), reportaron una relación directa entre la concentración de mercurio total en cabello y la frecuencia de ingestión semanal y diaria de pescado contaminado. Lo anterior implica que existe un riesgo importante de ingestión de mercurio, en particular, para aquellas familias cuya única fuente de proteínas es el pescado.

En lo referente a las concentraciones de plomo, se encontró que el valor más alto fue de 52,46 μ g/l y el menor fue de 36,1 μ g/l (cuadro 1), valores similares a los del estudio de Leal-Escalante (42) en una población de 792 niños de 7 a 14 años de edad que asistieron a consulta externa en cinco hospitales pediátricos de la ciudad de México, D.F., y en quienes se evaluaron los niveles de plomo en sangre con resultados que sobrepasaron los límites permitidos.

En los países desarrollados, la contaminación con plomo se considera un problema de salud pública, lo que no ocurre en países en desarrollo, donde son pocas las investigaciones llevadas a cabo, a pesar de ser este un problema que afecta a la población

más vulnerable, es decir, los niños, los trabajadores y las personas de bajo nivel socioeconómico. Para el *National Center for Environmental Health (NCEH)* de los *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, dicha contaminación constituye una de las cinco prioridades de intervención en las estrategias de salud (43).

Aunque no hay publicaciones sobre la presencia de plomo y cadmio en agua, alimentos y peces en la región de La Mojana, las concentraciones de estos metales encontradas en la sangre de sus habitantes pueden estar relacionadas con la ingestión de aguas y alimentos contaminados (44,45). Probablemente, esto es consecuencia de dos procesos: en primer lugar, las constantes inundaciones provenientes del río Cauca, el cual recoge desechos tóxicos con presencia de estos metales generados por la actividad minera e industrial a lo largo de su recorrido (46) que son drenados a la zona, contaminando las aguas, los suelos y los alimentos.

En segundo lugar, dado que la zona estudiada es una región de gran actividad agrícola en la que ha predominado históricamente el cultivo de arroz que, como bien se sabe, requiere de una gran cantidad de fertilizantes, en especial de fosfatos (47), los cuales aportan metales pesados como el cadmio y el plomo que se acumulan en el arroz y se dispersan hacia otras áreas productoras de alimentos a través de la cadena trófica. Además, en este cultivo se utilizó durante décadas el arseniato de plomo para el control de plagas, lo que puede haber dejado grandes cantidades de ese metal en el ambiente. En algunos estudios se ha reportado que el cadmio llega al suelo de los terrenos agrícolas por deposición aérea (41 %), con los fertilizantes fosfatados (54 %) y por aplicación de abono de estiércol (5 %) (48,49) (Ramírez AV, Seminario OM, Silva JG. Impacto toxicológico producido por la Fundación La Oroya en los habitantes de la ciudad aledaña. Comunicación a la gerencia central de la EM del CP. Documento de trabajo, Perú, 1993).

Las concentraciones más altas de cadmio en el grupo expuesto, posiblemente, se relacionan con el consumo de agua y alimentos (pescado y arroz, entre otros) contaminados con este metal, dado a que el porcentaje de personas que consumen frecuentemente estos alimentos fue alto; no obstante, en este estudio no se evaluó este metal en el pescado. El cadmio es uno de los elementos más tóxicos a los que está expuesto el hombre; su acumulación en el organismo es gradual y se

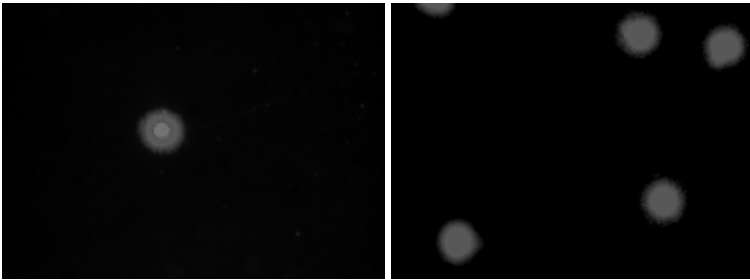
incrementa con la edad debido a su larga vida media, mayor de 20 años (50). Se ha señalado que en individuos no expuestos ocupacionalmente, la alimentación y el tabaco constituyen las dos fuentes principales de exposición (49).

Los resultados de genotoxicidad de los diferentes parámetros analizados, mostraron ser estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en las poblaciones expuestas, en comparación con el grupo de control (cuadro 2), lo cual indica que estas poblaciones presentan alteraciones en su ADN (figura 2). El índice de daño registró una mayor diferencia entre los dos grupos de estudio, sin dejar de lado los datos que se reportaron en los demás parámetros, los cuales también reflejaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos; los parámetros correspondientes al porcentaje de ADN en la cola y la longitud de la cola, son de gran utilidad para demostrar el daño en el ADN.

Es posible que el daño en el ADN se relacione con la exposición a los metales pesados evaluados, los cuales son contaminantes ambientales generalizados y causan efectos perjudiciales en la salud (51,52). Entre los factores que podrían tener relación con el daño en el ADN en la población expuesta, están las aguas y los alimentos contaminados con los metales, así como la exposición a los plaguicidas utilizados en la agricultura. En la zona estudiada se requieren estudios que midan estos parámetros. En el estado de Rio Grande do Sul (Brasil) Benedetti, *et al.*, (53) reportaron daños en el ADN de los trabajadores agrícolas en los cultivos de soya expuestos a plaguicidas, y observaron un aumento significativo del daño en el ADN en comparación con los controles no expuestos. En dicho estudio se demostró que los trabajadores agrícolas están expuestos a una mezcla de sustancias con potencial efecto genotóxico.

El efecto genotóxico encontrado en este estudio se puede comparar con lo reportado por León, *et al.* (37), quienes demostraron los efectos genotóxicos en una población expuesta a los residuos de carbón de la mina a cielo abierto de El Cerrejón, donde se emiten mezclas complejas que contienen metales pesados, cenizas y hierro, entre otras. Las muestras de sangre se tomaron para determinar los biomarcadores de genotoxicidad, específicamente la lesión primaria del ADN como índice de daño, la longitud de la cola y el porcentaje de ADN de la cola mediante el ensayo cometa (versión alcalina), y los daños en los cromosomas medidos como

A. Grupo Control



B. Grupo expuesto

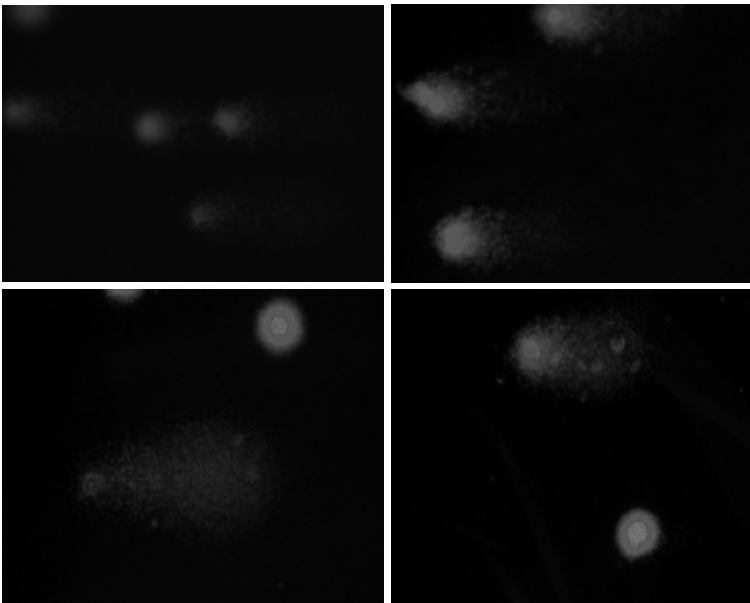


Figura 2. Las microfotografías muestran las células sin daño en el ADN del grupo de control (A) y los diferentes daños en el ADN del grupo expuesto (B). Las microfotografías se tomaron con microscopio de fluorescencia en el Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad de Córdoba. 40x

frecuencia de micronúcleos en los linfocitos. Ambos biomarcadores fueron estadísticamente significativos, con valores más altos en el grupo expuesto que en el grupo de control.

En un estudio llevado a cabo en una población de trabajadores expuesta ocupacionalmente en India, se analizó la genotoxicidad del plomo utilizando el ensayo cometa, la prueba de micronúcleos y las aberraciones cromosómicas. Los resultados indicaron que la media de la longitud de la cola del cometa en los trabajadores expuestos, era significativamente mayor que la de los controles ($p < 0,05$). Los resultados del análisis proporcionaron evidencia de la asociación entre la exposición al plomo y la genotoxicidad, permitiendo predecir el aumento del riesgo de cáncer en los trabajadores expuestos. Los autores concluyeron que los trabajadores sabían que eran parte del grupo de riesgo, y que la seguridad adecuada y las medidas cautelares y preventivas sólo podían minimizar la exposición y los riesgos para la salud (54).

En el presente estudio, cabe resaltar que las concentraciones de mercurio, cadmio y plomo en sangre y los efectos genotóxicos en las personas estudiadas, no obedecieron a una exposición ocupacional sino a la exposición por la presencia de estos metales en matrices ambientales y en alimentos, dado que en esta zona no hay actividades mineras e industriales que originen una exposición directa de las personas.

Las correlaciones entre el mercurio y el cadmio, y el daño en el ADN en la población expuesta evidenciaron que existe una asociación estadísticamente significativa. En casos específicos, como el de estos metales, una de sus vías de entrada al organismo es el agua de consumo. Además, estos resultados sugieren que existen otros factores que pueden incrementar las concentraciones de metales pesados en sangre, como el consumo de alimentos contaminados, en los que en algunos de los municipios estudiados se encontró una gran concentración de mercurio (14,21,23).

En algunos estudios se ha evidenciado la relación entre el daño en el ADN y los niveles de metales en sangre, siendo el mercurio uno de los metales que mostró una correlación positiva. De forma similar, Silva, *et al.* (55), reportaron la genotoxicidad del metilmercurio y el mercurio inorgánico en cultivos de linfocitos expuestos *in vitro*. Asimismo, Crespo, *et al.* (56), demostraron la capacidad del metilmercurio de provocar genotoxicidad en células de origen cerebral con niveles relativamente bajos de exposición. Madrid, *et al.* (31), llevaron a cabo un estudio en pobladores de la cuenca del río San Jorge del departamento de Córdoba, Colombia, y encontraron daños en el ADN en sangre en las personas estudiadas asociados al hallazgo de metales pesados, con concentraciones de mercurio en sangre que excedían el límite permisible establecido por la EPA.

Las principales consecuencias de la exposición a contaminantes como el mercurio, se relacionan con la posibilidad de intoxicación durante el desarrollo del cerebro en el feto, dado que el metilmercurio puede atravesar fácilmente la placenta y la barrera sanguínea cerebral. Además, la exposición prenatal al mercurio interfiere con el crecimiento y la migración de neuronas, y puede causar daños irreversibles en el sistema nervioso central en desarrollo (57).

Por otra parte, en este estudio también se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el cadmio y el daño en el ADN. En algunos estudios se ha sugerido que el cadmio induce daño en el ADN como resultado de la generación de radicales libres (58). En otro estudio se señaló la relación entre el cáncer de mama, las frecuencias de micronúcleos y los niveles elevados de cadmio en las muestras de sangre periférica de los pacientes afectados (59). La exposición crónica al cadmio en los seres humanos, causa una amplia variedad de efectos adversos relacionados con su toxicidad, incluido el cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, la insuficiencia y la disfunción renal (52). Una manifestación clínica grave de estos efectos es la llamada enfermedad itai-itai, diagnosticada en la década de los sesenta en Japón (59).

En conclusión, las concentraciones de los metales pesados en sangre y su relación con el daño en el ADN en la población de este estudio, evidenciaron un problema de salud pública que requiere atención urgente. Las características sociodemográficas de la población, con un alto grado de pobreza y necesidades básicas insatisfechas, son factores

que pueden potenciar esta situación. Es necesario, igualmente, emprender acciones para disminuir la exposición a contaminantes ambientales que inciden sobre la salud de la población de La Mojana y hacer un seguimiento estricto tanto de las actividades mineras que se desarrollan fuera de la zona, como de las actividades agrícolas que se llevan a cabo en ella, así como adelantar programas de salud y seguridad alimentaria para disminuir el riesgo para la salud de los pobladores.

Los resultados de este estudio permiten corroborar que los biomarcadores genotóxicos son apropiados para evaluar los riesgos ambientales y los daños en el ADN, especialmente, mediante el ensayo cometa. Este es el primer reporte de daño genotóxico en la región de La Mojana, lo que lo convierte en un punto de partida para futuras investigaciones y en un llamado de alerta para las instituciones encargadas de la salud humana y ambiental en dicha región.

Agradecimientos

Agradecemos al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia, "Francisco José de Caldas", Colciencias, por la financiación del proyecto; a la Universidad de Córdoba y a su Grupo de Investigación en Aguas, Química Aplicada y Ambiental en la Facultad de Química, y a todas las personas que participaron en la ejecución del proyecto.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses de los autores o las instituciones involucradas en el desarrollo del trabajo.

Financiación

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto "Efectos genotóxicos y citotóxicos en personas expuestas a metales presentes en el agua de bebida en la región de La Mojana y la cuenca del río San Jorge en los departamentos de Córdoba y Sucre", financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia, "Francisco José de Caldas", Colciencias, código 1112-519-29083, contrato número 223-2010, y la Universidad de Córdoba.

Referencias

1. **National Research Council.** Complex mixtures: Method for *in vivo* toxicity testing. Washington, D.C.: National Academy Press; 1988.
2. **Carpenter D, Arcaro K, Spink D.** Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect.* 2002;110(Suppl.1):25-37.

3. **Camargo J.** Contribution of Spanish-American silver mines (1570-1820) to the present high mercury concentrations in the global environment: A review. *Chemosphere*. 2002;48:51-7.
4. **International Agency for Research on Cancer.** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 2012. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2014. Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&cdcol=72&codcch=100>.
5. **Galaris D, Evangelou A.** The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;42:93-103. [http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00212-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00212-8)
6. **Jadhav SH, Sarkar SN, Kataria M, Tripathi HC.** Subchronic exposure to a mixture of groundwater-contaminating metals through drinking water induces oxidative stress in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;23:205-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2006.09.004>
7. **Thomann R.** Physico-chemical and ecological modeling of the fate of toxic substances in natural water systems. *Ecological Modelling*. 1984;22:145-70. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3800\(84\)90013-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3800(84)90013-9)
8. **Mancera NJ, Álvarez R.** Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuicolas de Colombia. *Acta Biol Colomb*. 2006;11:3-23.
9. **Friberg PM, Nordberg G.** Cadmium in the environment. Cleveland, OH: CRC Press; 1971.
10. **Berglund F.** Methyl mercury in fish: A toxicologic-epidemiologic evaluation of risks: Report from an expert group. *Nord Hyg Tidskr Suppl*. 1971;4(Suppl.4):1-364.
11. **Berkowitz B, Dror I, Yaron B.** Contaminant geochemistry: Interactions and transport in the subsurface environment. First edition. Berlin: Springer-Verlag; 2008. p. 412.
12. **Žižek S, Horvat M, Gibičar D, Fajon V, Toman MJ.** Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. *Sci Total Environ*. 2007;377:407-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.010>
13. **Olivero J, Johnson B, Mendoza C, Paz R, Olivero R.** Mercury in the aquatic environment of the village of Caimito at the Mojana Region, north of Colombia. *Water Air Soil Pollut*. 2004;159:409-20. <http://dx.doi.org/10.1023/B:WATE.0000049162.54404.76>
14. **Marrugo J, Verbel JO, Ceballos EL, Benítez LN.** Total mercury and methylmercury concentrations in fish from the Mojana region of Colombia. *Environ Geochem Health*. 2008;30:21-30. <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-007-9104-2>
15. **Corporación para el Desarrollo Sostenible de La Mojana y el San Jorge "Corpomojana".** Informe técnico. Determinación de los niveles de mercurio en agua, sedimentos y tejido vivo (humanos, peces y buchón) en los humedales de La Mojana sucreña. Montería: Corpomojana-Universidad de Córdoba; 2010.
16. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Medical management guidelines for acute chemical exposure. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services; 2000. p. 22.
17. **Park SY, Choi J.** Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ Int*. 2007;33:817-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>
18. **Ortiz IC, Peláez CA, Orozco LY, Zuleta M.** Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. *Biomédica*. 2012;32:437-48. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.739>
19. **Klobucar PM, Erben R, Papes D.** Application of the micronucleus and Comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytetes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat Toxicol*. 2003;64:15-23. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00009-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00009-2)
20. **Marrugo J, Lans E, Benítez L.** Hallazgo de mercurio en peces de la Ciénaga de Ayapel, Córdoba, Colombia. *MVZ Córdoba*. 2007;12:878-86.
21. **Gracia L, Marrugo JL, Álviz EM.** Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia, 2009. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2010;28:118-24.
22. **Rojas JR.** Caracterización socio-demográfica del área de desarrollo rural de La Mojana. Bogotá: Incode; 2012.
23. **Marrugo J, Benítez LN, Olivero J.** Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in Northern Colombia. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2008;55:305-16. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-007-9129-7>
24. **Olivero J, Johnson B, Argüello E.** Human exposure to mercury in San Jorge river basin, Colombia (South America). *Sci Total Environ*. 2002;289:41-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01018-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01018-X)
25. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Censo general 2005. Bogotá: DANE. Fecha de consulta: 1º de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-registros-vitales/censos/censo-2005>.
26. **Fernández P.** Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria*. 1996;3:138-14.
27. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-91. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
28. **Barregard L, Horvat M, Mazzolai B, Sällsten G, Gibicar D, Fajon V, et al.** Urinary mercury in people living near point sources of mercury emissions. *Sci Total Environ*. 2006;368:326-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.08.048>
29. **Kim NS, Lee BK.** Blood total mercury and fish consumption in the Korean general population in KNHANES III, 2005. *Sci Total Environ*. 2010;408:4841-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.06.026>
30. **Magos L, Clarkson TW.** The assessment of the contribution of hair to methyl mercury excretion. *Toxicol Lett*. 2008;182:48-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.08.010>
31. **Madrid G, Gracia L, Marrugo J, Urango I.** 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. Rev Asoc Col Cienc (Col). 2011;23:103-11.
32. **Olmedo P, Pla A, Hernández A, López O, Rodrigo L, Gil F.** Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010;659:60-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.056>
 33. **Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, et al.** Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis.* 2008;23:415-22. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen031>
 34. **Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al.** Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35:206-21. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
 35. **Adriana S, Paczkowski MG, Gadano AB, Carballo MA.** Biomarcadores de genotoxicidad en individuos expuestos al arsénico. *Latin American Journal of Pharmacy.* 2007;26:691-9.
 36. **Collins AR, Oszcoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al.** The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis.* 2008;23:143-51.
 37. **León G, Espitia L, Hoyos LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA, et al.** Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci Total Environ.* 2011;409:686-91. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen051>
 38. **Gilliom RJ, Helsel DR.** Estimation of distributional parameters for censored trace level water quality data: 1. Estimation techniques. *Water Resour Res.* 1986;22:135-46. <http://dx.doi.org/10.1029/WR022i002p00135>
 39. **Organización Mundial de la Salud.** Guías para la calidad del agua potable. Ginebra: OMS; 2004.
 40. **Aguilera M.** La Mojana, riqueza natural y potencial económica. Documentos de Trabajo sobre Economía Regional No. 48. Bogotá: Banco de la República; 2004.
 41. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Estadísticas Sociales, Indicadora de NBI, VXXVI Censo Nacional de Población y Vivienda, octubre, 1993. Bogotá: DANE; 2009.
 42. **Leal-Escalante CR, Baltazar-Reyes MC, Lino-González M, Palazuelos-Rendón E, Meneses F.** Concentraciones de plomo en sangre y reprobación de escolares en la ciudad de México. *Gac Méd Méx.* 2007;143:377-81.
 43. **Ascione AI.** Intoxicación por plomo en pediatría. *Archi Pediatr Urug.* 2001;72:133-8.
 44. **Montoya M.** Toxicología clínica. Tercera edición. México: Méndez Editores; 2002. p.131-7.
 45. **Ferron MM, Lima AK, Saldiva PH, Gouveia N.** Environmental lead poisoning among children in Porto Alegre state, Southern Brazil. *Rev. Saúde Pública.* 2012;46:226-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102012000200004>
 46. **Pinedo-Hernández J, Marrugo-Negrete J, Díez S.** Speciation and bioavailability of mercury in sediments impacted by gold mining in Colombia. *Chemosphere.* 2015;119:1289-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.044>
 47. **Porras O.** Plan integral de ordenamiento ambiental y desarrollo territorial de la region de La Mojana. Bogotá: Departamento Nacional de Planeación; 2012.
 48. **Alarcón A.** Contaminación minero metalúrgica del Lago Chinchaycocha y del Río Mantaro. La Oroya: Instituto para el Desarrollo de la Pesca y la Minería IPEMIN; 1994.
 49. **Ramírez A.** Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2002;63:51-64.
 50. **Tucker P.** Case studies in environmental medicine. Cadmium toxicity 2008. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2008.
 51. **Kim HL, Seo YR.** Identification of potential molecular biomarkers in response to thioredoxin reductase 1 deficiency under nickel exposure. *Biochip J.* 2012;6:157-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s13206-012-6208-2>
 52. **Park JY, Lee YJ, Koedrith P, Seo YR.** Protective role of thioredoxin reductase 1 in cadmium-induced DNA damage. *Mol Cell Toxicol.* 2012;8:289-95. <http://dx.doi.org/10.1007/s13273-012-0035-3>
 53. **Benedetti D, Nunes E, Sarmento M, Porto C, Santos CE, Dias JF, et al.** Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res.* 2013;752:28-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.01.001>
 54. **Grover P, Rekhadevi P, Danadevi K, Vuyyuri S, Mahboob M, Rahman M.** Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health.* 2010;213:99-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.01.005>
 55. **Silva LC, Cardoso PC, Leite DS, Bahia MO, Bastos WR, Smith MA, et al.** Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes *in vitro*. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:901-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2005000600012>
 56. **Crespo ME, Lima de SA, Herculano AM, Rodríguez R, Martins-do Nascimento JL.** Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int.* 2007;33:141-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.08.005>
 57. **Liu G, Cai Y, O'Driscoll N.** Environmental chemistry and toxicology of mercury. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118146644>
 58. **Wu P, Li C, Chen J, Zheng C, Hou X.** Determination of cadmium in biological samples: An update from 2006 to 2011. *App Spectrosc Rev.* 2012;47:327-70. <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2012.665401>
 59. **Saleh F, Behbehani A, Asfar S, Khan I, Ibrahim G.** Abnormal blood levels of trace elements and metals, DNA damage, and breast cancer in the state of Kuwait. *Biol Trace Elem Res.* 2011;141:96-109. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-010-8724-z>