



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y LA SUSCEPTIBILIDAD
INDIVIDUAL POR EXPOSICIÓN A PLOMO AMBIENTAL EN LA VEREDA LA
BONGA, ATLANTICO, COLOMBIA.**

ANGELA PATRICIA VERGARA GARCÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN TOXICOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2014

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y LA SUSCEPTIBILIDAD
INDIVIDUAL POR EXPOSICIÓN A PLOMO AMBIENTAL EN LA VEREDA LA
BONGA, ATLANTICO, COLOMBIA.**

ANGELA PATRICIA VERGARA GARCÍA

Código: 5599655

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de

MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA

Directora:

Bióloga MSc. MARTA LUCIA BUENO ANGULO

Línea de Investigación:

Genética Toxicológica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN TOXICOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2014

Cuando se cumple una meta en el tiempo propuesto, incluso contra todo pronóstico, oyes a tus padres hablar de colchicina y a tus amigos de micronúcleos, sin duda sabes a quien debes dedicar tu tesis.

A Dios.

A mis Padres, por ser mi motor, mi fortaleza y equilibrio. Por enseñarme el camino y dejarme elegir los senderos.

A mis amigas, por estar allí y seguir allí, por ser como mis hermanas, por sacarme sonrisas y regalarme la mejor energía del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Siempre resulta paradójico lo corto que es mencionar lo mucho que se debe a todas aquellas personas que permiten que un trabajo de grado sea hecho. Es de las primeras páginas que se lee, pero de las últimas que se escribe. Me gustaría dejar constancia de todos los grupos de personas que estuvieron de una u otra forma vinculados a este proyecto, bien de forma consiente, sin elección o espontánea. Por soportar mis exigencias, que nunca son pocas, por enseñarme, apoyarme y guiarme.

A mi directora, Marta Lucia Bueno Angulo, porque ser siempre mi mentora, por dejarme aprender desde lo cotidiano, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y hacerme sentir que siempre está para respaldarme. Por estar dispuesta a resolver todas mis dudas.

Al Departamento y la Maestría de Toxicología, en especial al doctor Jairo Téllez y la doctora Alba Rodríguez, por apoyar mis decisiones y estimularme a cumplir mis metas. Por todo lo enseñado.

Al Grupo de Salud Ambiental del Instituto Nacional de Salud, en especial a la doctora Elizabeth Silva, y a la Secretaria Departamental de Salud del Atlántico, por estar prestos a colaborar en toda la realización del estudio y facilitar los procesos de toma de muestras y permisos.

A los Grupos de trabajo del Laboratorio de Maestría en Genética Humana, Identificación Humana e Inmunología Evolutiva del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, y en especial a mi casa, el Laboratorio de Citogenética, por ayudarme en absolutamente todo, por prestarme la instalaciones, los equipos, los reactivos; por acompañarme en las horas de trabajo y llevar con paciencia mis espontáneas lluvias de inquietudes.

Finalmente a todas las personas del Laboratorio del Grup de Mutagènesi del departamento de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, por enseñarme abiertamente mucho de lo llevado a cabo en este trabajo de grado y hacerme sentir como en casa mientras lo aprendía. Moltes gràcies!

RESUMEN

El plomo es un metal pesado no esencial para la vida, bioacumulable y persistente en el medio ambiente. Este interactúa con el ADN generando dobles enlaces o aductos, rupturas de cadena simple, doble y mutagénesis. En este estudio se evaluaron niveles de plomo en sangre (biomarcador de exposición), daño en el ADN mediante el ensayo cometa y el test de micronúcleos (biomarcador de efecto) y polimorfismos del gen ALAD (biomarcador de susceptibilidad) en 59 individuos expuestos ambientalmente a plomo en La Bonga-Atlántico. Se encontraron niveles altos de plomo en sangre (NPS) en promedio de $25,58 \pm 7,62$ $\mu\text{g/dL}$ en niños y $17,15 \pm 8,45$ $\mu\text{g/dL}$ en adultos. La media de porcentaje de ADN en cola fue de $12,69 \pm 4,96$ y la media de células binucleadas con micronúcleos de $19,69 \pm 11,01$. La variante silvestre del gen ALAD presentó mayor frecuencia alélica, en esta se evidenció mayores NPS y menores daños en el ADN. Los niños son una población vulnerable ante la exposición a plomo y todos se encuentran por encima de los límites permisibles ($10\mu\text{g/dL}$). Los adultos en su mayoría no sobrepasan el límite permisible ($25 \mu\text{g/dL}$), sin embargo la población femenina en edad fértil, excede el límite permisible durante un posible estado de embarazo ($5\mu\text{g/dL}$). El daño en el ADN presente en la población es superior a otras poblaciones ambientalmente expuestas en Colombia y Latinoamérica. No se encontró correlación significativa entre los niveles de plomo en sangre y el daño genético. Se infiere la presencia de otros factores genotóxicos presentes en el ambiente. No se puede afirmar que la presencia del alelo silvestre o el mutado del gen ALAD constituya un factor protector. Se deben realizar estudios ambientales posteriores que identifiquen la fuente principal de exposición y aumentar los trabajos de monitoreo para prevenir afecciones de salud pública.

Palabras Claves: Exposición a plomo, Niveles de plomo en sangre, Ensayo Cometa, Test de Micronúcleos, gen ALAD.

ABSTRACT

Lead is a heavy metal non essential for life, bioaccumulative and persistent in the environment. Lead interacts with DNA and generates double bonds or adducts, single strand breaks, double strand breaks and mutagenesis. In this study blood lead levels (biomarker of exposure), DNA damage evaluated by the comet assay and micronucleus test (biomarker of effect) and ALAD gen polymorphisms (biomarker of susceptibility) of 59 individuals lead environmentally exposed in The Bonga - Atlantic were evaluated. High blood lead levels (BLL) were found on average 7.62 ± 25.58 $\mu\text{g/dL}$ in children and 17.15 ± 8.45 $\mu\text{g/dL}$ in adults. The mean percentage of tail DNA was 12.69 ± 4.96 and the mean of binucleated cells with micronuclei 19.69 ± 11.01 . The wild ALAD gene variant had higher allele frequency, in this major BLL and less DNA damage was evident. Children are a vulnerable population to lead exposure and all are above the permissible limits (10 $\mu\text{g/dL}$). The adults mostly do not exceed the permissible limit (25 $\mu\text{g/dL}$), however the female population of childbearing age, exceeds the allowable limit for a possible state of pregnancy (5 $\mu\text{g/dL}$). DNA Damage present in this population is higher than other populations environmentally exposed in Colombia and Latin America. No significant correlation between lead levels in blood and genetic damage was found. The presence of other genotoxic factors present in the environment is inferred. Can not say that the presence of the wild-type allele or the mutated allele of gene ALAD constitute a protective factor. In future, should make more environmental studies to identify the main source of exposure and increase the monitoring work to prevent diseases of public health.

Keywords: Lead exposure, Blood lead levels, Comet Assay, Micronucleus Test, ALAD gene.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2.1. Problema científico	14
2.2. Justificación	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. Distribución terrestre del plomo	19
4.1.1. Cinética Ambiental del plomo	19
4.2. Características físico - químicas del plomo	20
4.3. Usos del plomo	21
4.4. Fuentes de exposición	21
4.5. Toxicocinética del plomo	22
4.5.1. Vías de absorción	22
4.5.2. Distribución en el organismo	24
4.5.3. Metabolismo o Biotransformación	25
4.5.4. Eliminación	25
4.6. Mecanismos de daño y efectos en la salud	25
4.6.1. Efectos genotóxicos	26
4.7. Biomarcadores del plomo	27
4.7.1. Biomarcador de exposición: Niveles de plomo en sangre	27
4.7.2. Biomarcadores de efecto: indicadores de daño genético	27
4.7.2.1. Ensayo del cometa alcalino	27
4.7.2.2. Test de micronúcleos	28
4.7.3. Bioindicador de susceptibilidad al daño por plomo	28
4.7.3.1. Variantes enzimáticas y polimorfismos: ALAD	29
4.8. Estudios previos	29
5. OBJETIVOS	30
5.1. General	30
5.2. Específicos	30

6. METODOLOGÍA	31
6.1. Tipo de estudio y diseño	31
6.2. Caracterización de la muestra poblacional	31
6.2.1. Criterios de inclusión	31
6.2.2. Criterios de exclusión	31
6.3. Obtención de las muestras	32
6.4. Procedimiento de los ensayos aplicados	33
6.4.1. Biomarcador de Exposición - Cuantificación de Plomo en sangre	33
6.4.2. Biomarcador de Efecto	33
6.4.2.1. Ensayo del Cometa Alcalino	33
6.4.2.2. Test de Micronúcleos	35
6.4.3. Biomarcador de Susceptibilidad	37
6.4.3.1. Extracción de ADN	37
6.4.3.2. Amplificación del gen ALD y detección del polimorfismo	39
6.5. Tratamiento estadístico de los datos	40
7. RESULTADOS	42
7.1. Caracterización de la muestra poblacional	42
7.2. Biomarcador de Exposición: Niveles de Plomo en Sangre	43
7.3. Biomarcador de Efecto	44
7.3.1. Ensayo del Cometa Alcalino	48
7.3.2. Test de Micronúcleos	49
7.4. Biomarcador de Susceptibilidad	52
8. DISCUSIÓN	53
8.1. Caracterización de la muestra poblacional	53
8.2. Biomarcador de Exposición: Niveles de Plomo en Sangre	55
8.3. Biomarcador de Efecto	56
8.3.1. Asociación del daño en el ADN con los niveles de plomo en sangre	56
8.3.2. Asociación del daño en el ADN con la edad de los individuos	59
8.3.3. Significancia del daño en el ADN según el sexo de los individuos	60
8.3.4. Análisis de los factores de confusión	61
8.4. Biomarcador de Susceptibilidad	62

9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS CITADAS	66
10.1. Literatura Gris	71

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Características demográficas de la muestra poblacional. (Pág. 42)
- Tabla 2.** Niveles de plomo en sangre de acuerdo a la edad, el sexo y el consumo de agua filtrada de los individuos. (Pág. 44)
- Tabla 3.** Daño en el ADN de acuerdo a las categorías de niveles de plomo en sangre. (Pág. 45)
- Tabla 4.** Daño en el ADN según la edad y sexo de los individuos. (Pág. 45)
- Tabla 5.** Correlación entre los niveles de plomo en sangre, el daño en el ADN y la edad. (Pág. 46)
- Tabla 6.** Modelo estadístico para Porcentaje de ADN en Cola. (Pág. 49)
- Tabla 7.** Modelo estadístico para Células Binucleadas con Micronúcleos. (Pág. 52)
- Tabla 8.** Daño en el ADN y niveles de plomo en sangre según el biomarcador de susceptibilidad. (Pág. 52)
- Tabla 9.** Comparación con otros estudios sobre genotoxicidad del plomo. (Pág. 58)

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Cinética del plomo en el organismo humano. (Pág. 23)
- Figura 2.** Modelo multicompartimental de distribución del Plomo. (Pág. 24)
- Figura 3.** Pasos básicos del Ensayo Cometa. (Pág. 34)
- Figura 4.** Célula con y sin daño después de electroforesis alcalina. (Pág. 35)
- Figura 5.** Pasos básicos del Test de Micronúcleos. (Pág. 36)
- Figura 6.** Células con evidencia de daño en el test de micronúcleos. (Pág. 37)
- Figura 7.** Pasos básicos de la extracción de ADN. (Pág. 38)
- Figura 8.** Determinación del polimorfismo del gen ALAD. (Pág. 40)
- Figura 9.** Relación de los niveles de plomo en sangre con la edad y el sexo de los individuos. (Pág. 43)
- Figura 10.** Comportamiento del daño en el ADN según los niveles de plomo en sangre y la edad de los individuos. (Pág. 47)
- Figura 11.** Escala de daño cualitativo del ensayo cometa obtenida a partir del análisis de la muestra poblacional. (Pág. 48)
- Figura 12.** Células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas. (Pág. 50)
- Figura 13.** Células binucleadas con estructuras no micronucleadas: células con gemas y células con puentes nucleoplásmicos, apoptosis y necrosis. (Pág. 51)

1. INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal grisáceo, blando y maleable, no esencial para la vida. Su obtención se da mediante fundición, refinamiento de minas o de forma secundaria por el reciclaje de materiales que lo contengan previamente, como es el caso de las baterías de automóviles (Rubio *et al.*2004).

De los metales pesados, el plomo es uno de los más estudiados y evidencias de su conocimiento datan al año 4000 A.C., cuando egipcios y hebreos empezaron a hacer uso de sus aleaciones en las construcciones de la vida cotidiana; al igual que los fenicios cerca del 2000 A.C. por su obtención a través de las menas clásicas de la minería. Se considera a Hipócrates el primero en describir síntomas de la intoxicación con plomo en trabajadores, pero fue Nicanor el que relacionó el estreñimiento, los cólicos abdominales, la palidez, la parálisis y los problemas de visión con personas expuestas e intoxicadas (Ramírez 2005; Rubio *et al.*2004).

Históricamente la intoxicación con plomo recibió el nombre de plumbismo y posteriormente el de saturnismo, después de que los alquimistas consideraran al plomo el origen de los otros metales (Rubio *et al.*2004). En la época moderna Tanquerel des Planches (1839) publicó una descripción bastante completa de los síntomas y signos acarreados por la intoxicación con plomo, a la cual se le han ido realizando ajustes a medida que han sido encontrado nuevos aportes, entre los que se destacan, la anemia por plomo, el aumento de porfirinas en la orina y el punteado basófilo característico de los hematíes (Ramírez 2005).

En los años 60, como consecuencia de la industrialización y el elevado uso de plomo en diferentes modalidades de consumo como pinturas, juguetes e incluso cerámica de uso casero, la intoxicación con plomo pasa a ser un problema no sólo de salud ocupacional, sino también de salud pública, sobre todo en países desarrollados (Ramírez 2005).

Este metal pesado puede alterar la integridad del material genético originando efectos tóxicos, comúnmente denominados genotóxicos (Queirolo *et al.* 2010; Zhijian *et al.* 2006), como consecuencia de efectos celulares como: la inhibición de la ATPasa Na/K, el incremento de la permeabilidad celular, la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Nordberg 1998). A nivel sistémico

se le ha mencionado como causante de diferentes efectos adversos entre los que se destacan daños hematológicos (inhibición de la síntesis del grupo HEM, aumento de porfirinas, anemia e incremento de punteado basófilo) (Poreba *et al.* 2001, Queirolo *et al.* 2010), daños óseos, afecciones del sistema nervioso central y periférico (Mohd 2007), disfunción del sistema reproductor y renal (Rubio *et al.* 2004), molestias gastrointestinales (Valdivia 2005) y cáncer (Silbergeld 2003). Considerando como agravante que el plomo tiene la capacidad de atravesar barrera placentaria y hematoencefálica.

Aunque en nuestros días la reglamentación de los límites máximos permisibles de este metal han reducido las fuentes de exposición y el número de intoxicaciones, se continúan presentando casos de estudio por la naturaleza bioacumulable y asintomática en las fases iniciales del envenenamiento por plomo. Es por esto que los estudios de mutagénesis ambiental o genética toxicológica son una herramienta clave en la prevención y monitoreo del riesgo de intoxicación en poblaciones humanas.

2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

2.1. Problema científico

Con el nombre de La Bonga es conocida una vereda ubicada en el municipio de Malambo del departamento del Atlántico en Colombia; en donde habitan cerca de cuarenta familias. Según informes y estudios llevados a cabo entre noviembre de 2012 y enero de 2013 por la Secretaria de Salud y la Corporación Autónoma Regional del Atlántico (CRA), con apoyo del Instituto Nacional de Salud, aproximadamente 250 personas han estado ambientalmente expuestas a plomo (Gobernación del Atlántico – página web, 2013).

Estudios preliminares de niveles de plomo en sangre, realizados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia en 10 personas de la población expuesta al metal, mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito, detectaron que “el 70% de las personas evaluadas presentan niveles de plomo sanguíneo por debajo del máximo valor aceptado para la población no expuesta, un 10% presenta valores dentro del rango aceptado para población ocupacionalmente expuesta, mientras que un 20% muestra valores de absorción compatible con intoxicación”, con rangos variables entre 0-130 $\mu\text{g/dL}$ (Gobernación del Atlántico – página web, 2013).

Las autoridades ambientales regionales han indicado que la fuente de contaminación por plomo es un cuerpo de agua de origen natural, ubicado en la vereda y utilizado para abastecer las necesidades diarias debido a la ausencia de la ampliación de la red de acueducto municipal, que llevaría a los habitantes agua potable. El laboratorio departamental de salud pública del Atlántico confirmó el hecho por el estudio realizado a una muestra de agua del pozo en mención, en la que se encontró una concentración de plomo de 0,05 mg/L, la cual se encuentra por encima de lo establecido en la Resolución 2115 de 2007, que permite un valor máximo del 0,01 mg/L en el agua destinada para consumo humano (El Heraldo – página web, 2012; El Universal – página web, 2012).

Para esclarecer la presencia de plomo en el agua, que aunque puede deberse a condiciones naturales, no es común, la CRA expidió medidas preventivas a dos fundidoras de plomo (Metcaribe S.A y Reciclal) en el área metropolitana de Barranquilla, en el municipio del malambo, que aunque cuentan con permiso de emisiones atmosféricas y una licencia ambiental, pueden estar involucradas el vertimiento del metal a la fuente hídrica (Sitio oficial del municipio de Malambo, 2013; ZonaCero – periódico local, 2013).

Cabe resaltar que los habitantes de la Bonga reportaron con anterioridad la muerte recurrente de animales y árboles frutales, sin embargo los estudios quedaron inconclusos por falta de evidencias que indicaran signos de algún tipo de ecotoxicidad. Actualmente los habitantes de la zona presentan diferentes signos y síntomas relacionados con la intoxicación por plomo, y los profesores de la escuela rural han informado la deficiencia del aprendizaje de varios de sus alumnos, lo cual es un efecto característico del envenenamiento con plomo en población infantil (Gobernación del Atlántico – página web, 2013).

El plomo puede ingresar al organismo por vía digestiva, respiratoria y cutánea (Nordberg 1998), y sin importar su vía de acceso es de especial relevancia su carácter bioacumulable tanto en niños como en adultos (Sobin *et al.* 2009); además no presenta manifestaciones de intoxicación a bajas dosis de exposición y es por eso que los estudios de seguimiento son fundamentales, de lo contrario siempre se encontrará daño y no se establecerán medidas preventivas.

Es importante evaluar el efecto genotóxico asociado a los niveles de plomo en sangre y la susceptibilidad individual determinada a través de los polimorfismos de la enzima ALA dehidratasa (ALAD) como medida de vigilancia y monitoreo de las poblaciones expuestas, ya que la inestabilidad en células somáticas y sexuales puede dar lugar a otras enfermedades que no se evidencian de manera inmediata sino progresiva y a largo plazo por su naturaleza bioacumuladora. Adicionalmente, el estudio de la susceptibilidad individual desde el punto de vista genético, es importante para determinar si uno u otro polimorfismo genético confiere mayor o menor riesgo tóxico.

En esta área existe una carencia de estudios en los que se evalúen de forma conjunta las variables de exposición, efecto y susceptibilidad en una población ambientalmente expuesta, con la inclusión de niños.

2.2. Justificación

La evaluación del efecto genotóxico asociado a niveles de plomo en sangre y la evaluación de la susceptibilidad individual en niños y adultos juega un papel fundamental en el monitoreo de la integridad y bienestar del material genético de las poblaciones. Las alteraciones que se dan a nivel del ADN como consecuencia de la interacción con plomo pueden afectar directamente a los individuos expuestos o indirectamente a la descendencia de estos.

El aumento de la industrialización ha incrementado la exposición ambiental a agentes potencialmente genotóxicos, dentro de los que se encuentra el plomo (Nordberg 1998, Ramírez 2005). Este es un metal pesado que no debería encontrarse en los sistemas vivos, pues no cumple ninguna función biológica en estos e interfiere con otros elementos fundamentales para la vida y se acumula en los tejidos (Nordberg 1998). Por esto es de carácter prioritario valorar las consecuencias que incluso a dosis bajas pueden originar en el ADN o en las células.

Conociendo la presencia de este elemento en un cuerpo de agua natural y en los habitantes de La Bonga del municipio de Malambo, Atlántico, posiblemente originada por vertimientos de dos fábricas (Metcaribe S.A y Reciclal) fundidoras de plomo ubicadas en el área municipal, es pertinente abordar esta problemática dándole prioridad en temas de salud pública, además de su implicación ecológica.

Las evidencias arrojadas en los monitoreos ambientales realizados por entes departamentales y nacionales, en donde se encontró valores de plomo tanto en muestras de agua (pozo), como en muestras de sangre (personas), por encima de los valores límites permisibles, y dada la carencia de estudios en Colombia, tendientes a valorar el efecto que este metal puede inducir en el genoma de la población infantil y adulta, en este estudio se propone evaluar mediante técnicas

citogenéticas y la caracterización del gen ALAD, el efecto genotóxico de la presencia de niveles de plomo en sangre, en esta población y elaborar una correlación - asociación entre las tres variables propuestas.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe correlación entre los niveles de plomo en sangre y los efectos genotóxicos detectados mediante el test de Micronúcleos y el Ensayo Cometa en niños y adultos de la vereda La Bonga, Atlántico, Colombia?

¿Existe asociación entre el efecto genotóxico y los polimorfismos genéticos de ALAD (biomarcador de susceptibilidad) detectados en niños y adultos de la vereda La Bonga, Atlántico, Colombia?

¿Existe relación entre los polimorfismos genéticos del gen ALAD y los niveles de plomo en sangre hallados en niños y adultos de la vereda La Bonga, Atlántico, Colombia?

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Distribución terrestre del plomo

El plomo es un metal ampliamente distribuido que se puede encontrar en el ambiente debido a fuentes antropogénica o naturales. Es un elemento persistente en el medio ambiente y es considerado el primer contaminante del planeta entre los metales (Gillis *et al.* 2012).

A nivel natural el plomo hace parte de la corteza terrestre profunda, sin embargo tras procesos geológicos de elevación, se puede encontrar formando parte de las capas más superficiales del perfil del suelo. También se le encuentra relacionado con emisiones volcánicas y fuentes de agua asociadas a suelos en los que es evidente su presencia. En la corteza terrestre el plomo está asociado o adherido a la parte mineral, siendo la galena (sulfuro de plomo) el mineral más rico en este metal y del que se desprende la fuente principal de su producción comercial. Otros minerales de plomo son: la cerusita, la anglesita, la corcoita, la wulfenita, la piromorfita, la mutlockita y la vanadinita (Nordberg 1998).

De las fuentes antropogénicas proviene la mayor acumulación de plomo en el medio ambiente y en consecuencia en los humanos. Entre éstas se incluye la extracción y procesamiento de minerales de plomo en las fundiciones de hierro y acero, la fabricación de baterías, la producción de gasolina, las emisiones de vehículos, la producción tecnológica de cemento, la fabricación y revestimiento de cables, pinturas, barnices, esmaltes, vidrios y cristales (Poreba *et al.* 2011).

4.1.1. Cinética Ambiental del plomo

El plomo es un metal poco móvil a nivel medio ambiental, generalmente se dispersa por fuentes de aire en forma de partículas y es eliminado por acción de la lluvia o depósito gravitacional. En el suelo es poco móvil y generalmente se encuentra en las capas superiores, a excepción de los casos en los que se encuentra de manera natural en las capas profundas de la corteza terrestre. Su baja movilidad en suelo no permite el filtrado al subsuelo o capas subterráneas (ILA, 2013). La interacción del plomo con el suelo es mayor si hay presencia de materia orgánica y coloides

inorgánicos. Al aumentar el pH de los suelos y disminuir la interacción con este se hace más móvil.

En agua es muy poco encontrado, debido a que es un metal pesado se decanta y es encontrado más fácilmente en sedimentos. En aguas ácidas adquiere una movilidad un poco mayor, sin ser por más significativa (ILA, 2013).

4.2. Características físico - químicas del plomo

El plomo es un elemento que químicamente se considera un metal pesado y se ubica en la tabla periódica en el grupo IVA. Es de color gris plateado, maleable y ubicuo. No tiene capacidad elástica, pero si se funde con facilidad a elevadas temperaturas. Se encuentra de forma natural en estado sólido, su número atómico es 82, su símbolo es Pb y posee un peso molecular de 207,2 (Ramírez 2005).

El plomo generalmente se encuentra formando compuestos orgánicos o inorgánicos y en muy pocos casos es hallado de manera elemental, es así como hace parte de sales, óxidos y formaciones organometálicas, consecuencia de sus valencias normales, 2 y 4. Según el compuesto de plomo a tratar las características físico - químicas y la toxicidad generada a partir de éstos varían. Por ejemplo, en el campo de la genética toxicológica en el que se desarrolla este trabajo, los compuestos inorgánicos ejercen mayor daño sobre el ADN que los compuestos orgánicos (Rubio *et al.* 2004, Ramírez 2005).

Este elemento tiene la capacidad de bioacumularse por lo que su concentración en los organismos vivos, plantas y animales, se magnifica en la cadena alimentaria, aun cuando no es un elemento esencial para la vida y no debe encontrarse en ninguna concentración en las especies (Rubio *et al.* 2004).

4.3. Usos del plomo

El uso de este metal se da principalmente en procesos industriales como se mencionó en las fuentes de origen antropogénico, y bajo algunas excepciones se emplea de manera cacerera e inapropiada en trabajos informales de acumuladores eléctricos por extracción secundaria de plomo a partir de baterías recicladas. Aproximadamente un 40 % del plomo se utiliza en forma metálica, un 25 % en aleaciones y un 35 % en compuestos químicos (Nordberg 1998).

El plomo tiene un amplio uso en la industria automotriz en la fabricación de baterías y se empleaba también como aditivo de la gasolina durante la refinación del petróleo, medida que está siendo controlada hoy en día, sin su radicación total (Valdivia 2005).

Este metal es igualmente utilizado en el revestimiento de cables, tuberías (viviendas viejas), protección de materiales expuestos a la intemperie, fabricación de municiones, pigmentos para pinturas y barnices, fabricación de cristales, esmaltado de cerámica, la soldadura de latas, instrumentos de pesca y caza, protector de rayos X y radiación gama (Valdivia 2005).

4.4. Fuentes de exposición

Las fuentes de exposición al plomo son variadas y pueden ser categorizadas de diferentes maneras. Generalmente se denominan como exposición ocupacional, ambiental y doméstica. En otros casos se establecen fuentes de concentración duradera (mayor) como: la pintura, el polvo y el suelo, y fuentes de concentración baja entre las que destacan: el aire, la comida y el agua (Poreba *et al.* 2011, Silbergeld 1997).

Con exposición **ocupacional o laboral** se hace referencia a aquella que tiene lugar en los sitios de trabajo en los que se desarrollan procesos de producción o manejo con plomo como la metalurgia, la minería extractiva, la plomería, actividades de soldadura, construcción civil, industria cerámica, manufactura de caucho y vidrio, reparación de buques, procesos de cortado del metal, manufactura de plásticos y baterías (Ramírez 2005).

A nivel **ambiental** se puede encontrar plomo en el agua de ríos, lagos y océanos. En el agua de mar por ejemplo se han encontrado concentraciones de plomo entre 0,003 y 0,20 mg/L, por lo que los peces y otros organismos que habitan en ellas incorporan el metal disponible y lo introducen en la cadena trófica. Algunos estudios al respecto han encontrado una relación cercana entre las concentraciones de plomo en agua de río y las concentraciones de plomo en tejidos blandos de moluscos y peces (Rubio *et al.* 2004).

En el suelo como se ha mencionado con anterioridad es posible encontrar plomo de manera natural, por lo general, áreas cultivables y regiones cercanas a contaminación industrial tienen niveles del metal más elevados que terrenos baldíos. Los terrenos que se utilizan para pastoreo y cultivos deben tener especial cuidado con las concentraciones de plomo presentes, ya que éste podría ingresar en el organismo de plantas y animales de uso alimentario (Rubio *et al.* 2004, Mohd 2007).

En el aire el plomo está relacionado con las fuentes de emisión del metal, bien sean naturales o industriales. Por esta razón las áreas rurales tienden a presentar menores concentraciones del metal que las áreas urbanas, especialmente aquellas consideradas zonas industriales (Rubio *et al.* 2004, Hammond 1977, Needleman 1981). Las partículas de plomo suspendidas en el aire pueden reposar sobre los objetos y paredes presentes en las viviendas, lo es considerado polvo contaminado.

Finalmente por exposición **doméstica** también se pueden atribuir como fuentes de contaminación la pintura de paredes con compuestos de plomo, al igual que la pintura de juguetes y el uso de vasijas y utensilios de cocina de cerámica vidriada (González *et al.* 2008).

4.5. Toxicocinética del plomo

4.5.1. Vías de absorción

El plomo puede ingresar al organismo por tres vías: respiratoria, digestiva y dérmica o cutánea (Figura 1). El plomo inorgánico solo puede acceder por las dos primeras, mientras que el plomo

orgánico puede penetrar por cualquiera (Ramírez 2005). Por la piel el plomo pasa a través de los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas directamente al torrente sanguíneo (Gutiérrez *et al.* 2004).

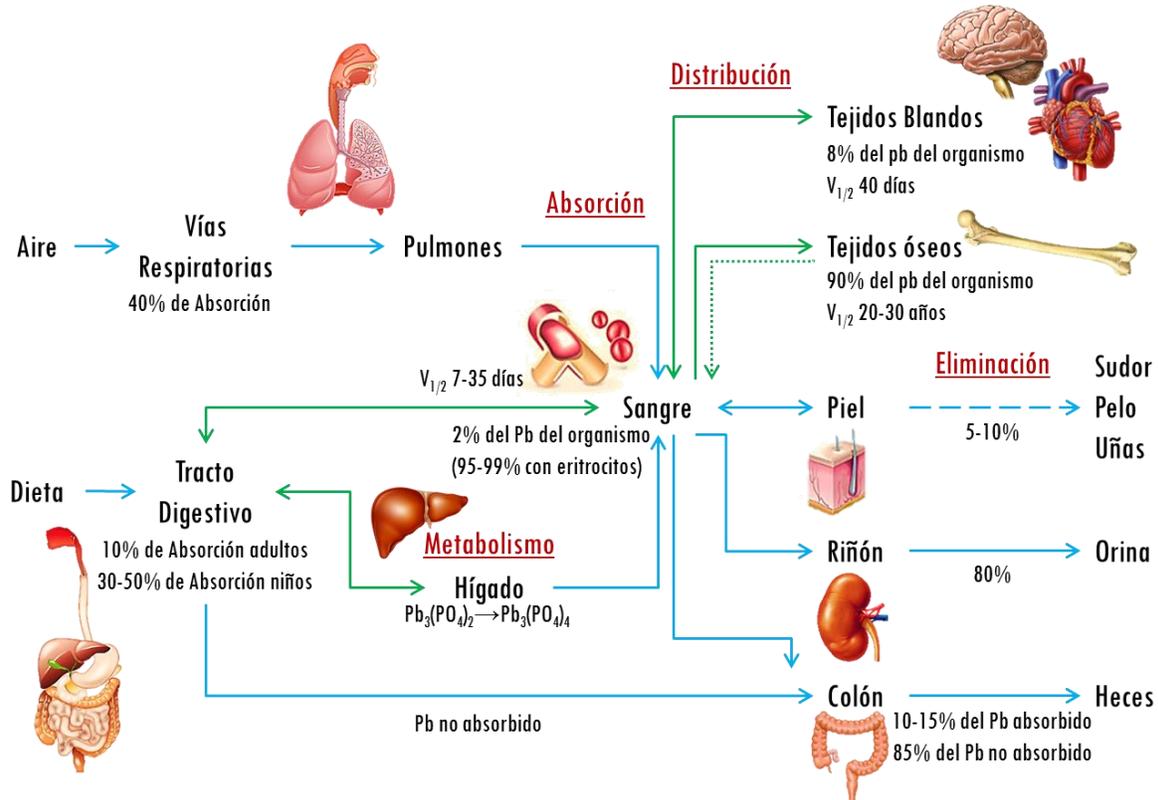


Figura 1. Cinética del plomo en el organismo humano. Modificado de Ramírez 2005.

El plomo que se absorbe por vía respiratoria es cercano al 40% (Figura 1), aunque cierta cantidad de absorción puede llevarse a cabo en las vías aéreas superiores la porción más relevante tiene lugar en las vías respiratorias inferiores, a nivel de alvéolo, a través de la circulación pulmonar (Ramírez 2005). El grado de absorción de esta vía depende de forma directa de la porción de polvo o tamaño de la partícula respirable, siendo ésta generalmente inferior a 5µm, y de la frecuencia y volumen respiratorio (Nordberg 1998).

En cuanto a vía digestiva se refiere, el plomo se fija en la saliva y se traga. Los adultos absorben el 10% del plomo ingerido, mientras en los niños la absorción puede ser significativamente más alta y absorben del 30% hasta el 50% de éste (Ramírez 2005) (Figura 1). En la vía digestiva la absorción se ve mediada por factores como el tránsito gastrointestinal, el estado nutricional, la

edad, tamaño de la partícula de metal, deficiencia de hierro y calcio, dieta rica en grasa, ingesta inadecuada de calorías, presencia de estómago vacío o ayuno prolongado (Valdivia 2005).

4.5.2. Distribución en el organismo

Tras ser absorbido y llegar a la sangre, el plomo se une entre un 95 - 99% con los eritrocitos, dejando entre un 1 - 5% libre en plasma (Ramírez 2005). Este se distribuye bajo el modelo tricompartmental, aunque algunos autores lo consideran como multicompartimental, en donde la sangre actúa como compartimento central de intercambio, los órganos blandos como compartimentos periféricos de rápido intercambio y el sistema óseo como compartimento de intercambio lento. (Valdivia 2005) (Figura 2).

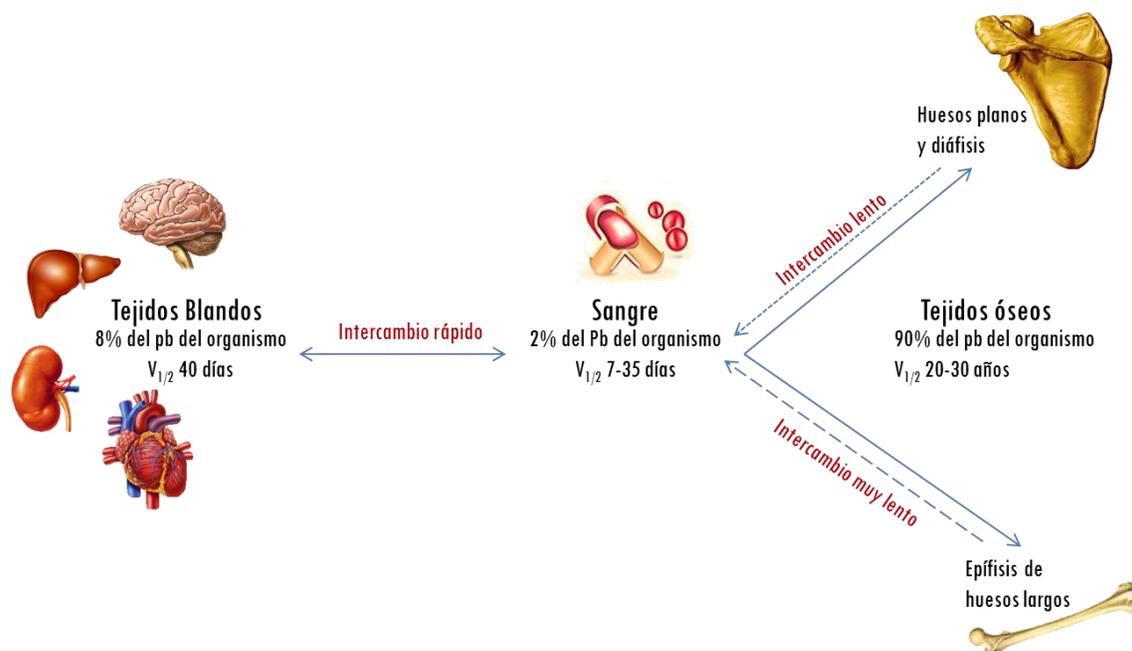


Figura 2. Modelo multicompartimental de distribución del Plomo. Modificado de Valdivia 2005.

De la dosis absorbida la sangre representa alrededor del 2%, los órganos blandos: riñón, hígado y cerebro el 8% y el tejido mineralizado u óseo el 90% (Gutiérrez *et al.* 2004) (Figura 1). En el hueso el plomo se acumula por subcompartimentos que difieren en velocidad de reabsorción e intercambio con la sangre. La parte lábil de los huesos presenta un intercambio lento de plomo (Huesos planos y diáfisis de huesos largos) y la fracción no lábil (epífisis) un intercambio muy

lento con la sangre (Nordberg 1998). El plomo puede cruzar la placenta y la barrera hematoencefálica (Valdivia 2005).

4.5.3. Metabolismo o Biotransformación

El plomo tiene muy baja biotransformación. El plomo inorgánico no se metaboliza, sino que se absorbe, se distribuye, se acumula y excreta de forma directa (Nordberg 1998). El plomo orgánico sufre un proceso de transformación escasa donde pasa a fosfato plumboso y posteriormente a fosfato plúmbico (Figura 1), el cual es menos soluble y por tanto se excreta en menor proporción, lo que aumenta la concentración y acumulación (Nordberg 1998).

4.5.4. Eliminación

El plomo puede ser excretado por diferentes vías, siendo las principales y las de mayor importancia toxicológica la fecal y la renal. Por vía fecal se elimina cerca del 85% del plomo no absorbido y por vía renal se desecha aproximadamente el 80% del plomo absorbido. Otras vías de excreción son el cabello, el sudor, la leche materna, la descamación de la piel y los dientes (Ramírez 2005) (Figura 1).

Este metal posee una vida media en sangre de aproximadamente 7 - 35 días, en tejidos blandos cerca de superior a 40 días y en tejido óseo entre 20 – 30 años (Gutiérrez *et al.* 2004, Valdivia 2005) (Figura 1).

4.6. Mecanismos de daño y efectos en la salud

Todos los mecanismos de daño y efectos adversos en la salud que tienen lugar por la presencia de plomo en el organismo están fundamentados en que este elemento no tiene ninguna función biológica en los organismos vivos; sin embargo, su utilización en diversas actividades humanas constituye una fuente de exposición para todos los grupos de edad de la población en general (González *et al.* 2008).

Dentro de los mecanismos de acción más relevantes, es de destacar que el plomo posee una gran afinidad por los grupos sulfidrilo en especial por las enzimas dependientes de zinc, puede remplazar al calcio comportándose como segundo mensajero intracelular e inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, incrementando la permeabilidad celular (Valdivia 2005). En el organismo humano generalmente interacciona con metales esenciales como el calcio, el hierro y el zinc. El plomo también puede verse relacionado con la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Gutiérrez *et al.* 2004).

Entre los efectos en la salud se pueden mencionar alteraciones neurológicas (Nordberg 1998), hematológicas (Queirolo *et al.* 2010), endocrinas, renales, en la reproducción y desarrollo, riesgos cardiovasculares (Poreba 2011) y procesos de carcinogénesis (Silbergeld 2003).

4.6.1. Efectos genotóxicos

Al interior celular, el plomo es afín por los compuestos nitrogenados y por tanto puede interactuar con el ADN produciendo ciertas alteraciones, afectando genes de expresión enzimática y de actividad proteica (Gillis 2012). Se cree de igual manera que el plomo puede originar estrés oxidativo que incrementa el daño con el material genético (Gillis 2012).

Este metal adicionalmente ocasiona aumento y disminución del número cromosómico celular, genera fragmentos acéntricos, aberraciones cromosómicas, incremento en el intercambio de cromátides hermanas, rupturas de cadena simple y doble de la hélice de ADN, entre otros marcadores a destacar, lo cual deja en estado de vulnerabilidad el material genético de células tanto somáticas, como sexuales. La relación entre el incremento de estas alteraciones y la exposición a plomo se ha verificado en población laboral y general (ambiental) (Duydu 2001, García *et al.* 2010).

El plomo es considerado por la IARC en las categorías 2A (probable carcinógeno humano) y 2B (posible carcinógeno humano), para plomo inorgánico y orgánico respectivamente, debido a que hay estudios que afirman la aparición de carcinogénesis en roedores expuestos a ambas formas del metal (García *et al.* 2012, Silbergeld 2003).

4.7. Biomarcadores del plomo

Los biomarcadores son parámetros biológicos que se pueden medir en los organismos vivos. Estos se clasifican en: biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto y biomarcadores de susceptibilidad (Ramírez 2006).

4.7.1. Biomarcador de exposición: Niveles de plomo en sangre

El nivel de plomo en sangre es el ensayo o prueba más reconocida como biomarcador de exposición en humanos. Aunque en sangre la vida media del plomo gira en torno a los 7 - 35 días, es la sangre la que funciona como compartimento central en la distribución y es en ella donde tiene lugar el intercambio de la acumulación presente en cualquier otro órgano o sistema del individuo. Además no se debe pasar por alto que las células sanguíneas provienen en buena medida de la médula ósea y es el hueso la diana de acumulación de este metal (García *et al.* 2010, Wozniak y Blasiak 2003, Pasha y Jamila 2009).

Se ha establecido que en adultos el valor permisible de plomo en sangre corresponde a 25 µg/dl y en niños, al ser una población más vulnerables este parámetro disminuye hasta 10 µg/dl (García *et al.* 2010).

4.7.2. Biomarcadores de efecto: indicadores de daño genético

Un biomarcador de efecto es el parámetro biológico que refleja la interacción de un químico con los receptores biológicos (Ramírez 2006).

4.7.2.1. Ensayo del Cometa alcalino

Es una prueba sencilla, altamente sensible y de bajo costo, que desde el punto de vista toxicológico se clasifica como biomarcador de efecto. En el Ensayo Cometa las células con mayor frecuencia de rupturas de cadena doble, cadena simple y sitios álcali lábiles muestran una migración significativa del ADN hacia el ánodo (Fairbairn *et al.* 1995, Zúñiga 2009). El

fundamento básico de la técnica es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, con las cuales se tiene como resultado al observar los geles en el microscopio, que las células dañadas presentan la apariencia de un cometa, en donde la cabeza constituye la región nuclear con material genético intacto y la cola la conforman la migración de fragmentos ADN originados por roturas y puntos sensibles al álcali (Cossio *et al.* 2004, Liao *et al.* 2009). El largo o extensión de los cometas, es directamente proporcional al daño inducido sobre la doble hélice del ADN por el agente evaluado y es indicador de la sensibilidad de la prueba.

4.7.2.2. Test de Micronúcleos

Es un biomarcador de efecto que permite identificar el daño genético por la presencia en la célula de pequeños cuerpos citoplasmáticos de origen nuclear adicionales al núcleo. Son expresados en células en división que contienen rupturas cromosómicas con fragmentos acéntricos y/o pérdida de cromosomas completos, los cuales son incapaces de dirigirse con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos en la anafase de la mitosis. En la telofase estas estructuras cromosómicas rezagadas son envueltas por membrana nuclear, obteniendo así, la forma propia de un núcleo con menor tamaño (Arencibia y Rosario 2009; Fenech 2000). Los puentes nucleoplásmicos que son evidenciados ocasionalmente en este ensayo, tienen origen en cromosomas dicéntricos (Fenech 2000). Los micronúcleos son muy buenos indicadores del daño genético pues es bien conocido que son generados por inductores de rupturas cromosómicas o agentes que afectan la formación del aparato mitótico (Martino *et al.* 2003).

4.7.3. Biomarcador de susceptibilidad al daño por plomo

Este tipo biomarcadores indicar la variación de la respuesta al daño por la presencia de un componente genético característico de cada individuo (Ramírez 2006).

4.7.3.1. Variantes enzimáticas y polimorfismos: ALAD

Es la segunda enzima en la vía de biosíntesis del grupo heme, su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 en la región 3 subregión 4. Esta enzima tiene importancia en la susceptibilidad individual del efecto tóxico del plomo puesto que los diferentes polimorfismos genéticos que la caracterizan median una mayor o menor afinidad por la unión al metal. Las dos variantes genéticas clásicas de la enzima ALAD son la ALAD₁ y la ALAD₂ (Sobin *et al* 2009). Varios estudios proponen que la ALAD₂ tiene mayor afinidad al plomo, elevando la vida media del metal en la sangre e incrementando el daño, por lo que se ha observado una asociación positiva entre la presencia de este gen en homocigotos y heterocigotos con niveles elevados de plomo en sangre (Sobin *et al.* 2009).

4.8. Estudios previos

A nivel mundial los estudios con plomo están bien documentados, aunque no todos son en el ámbito de la genética toxicológica. Se han registrado estudios de carácter epidemiológico y experimental de manera *in vivo* e *in vitro*. Gran parte de ellos corresponde a estudios con exposición laboral sin embargo también se encuentran estudios ambientales en niños y adultos (Lanphear *et al.* 2003, Nichani *et al.* 2006).

A nivel Latinoamericano, los países más documentados en cuanto a la problemática del plomo se refiere son: México, Brasil, Argentina, Chile, Uruguay y Paraguay (Flores *et al.* 2012, González *et al.* 2008, Maleronka *et al.* 2012, Menezes *et al.* 2012, Queirolo *et al.* 2010, Recio 2012). En Colombia no existen muchos artículos originales que consignen información referente a estudios con plomo, pero hay un buen número de trabajos de tesis relacionados con la temática (Olivero *et al.* 2007).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto genotóxico y la susceptibilidad individual por exposición ambiental a plomo en niños y adultos de la vereda La Bonga, Atlántico, Colombia.

5.2. Específicos

- Determinar el grado de daño del ADN y las alteraciones presentes en el material genético según los parámetros del test de micronúcleos y el ensayo cometa.
- Evaluar la correlación entre los niveles de plomo en sangre y el efecto genotóxico observado.
- Identificar los polimorfismos genéticos de la enzima ALA deshidratasa presentes en los niños y adultos.
- Evaluar las asociaciones existentes entre; concentración de plomo en sangre, efecto genotóxico observado y los polimorfismos genéticos de la enzima ALAD.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tipo de estudio y diseño

El presente es un estudio analítico de corte transversal en el que se correlacionan los niveles de plomo en sangre con los efectos genotóxicos valorados mediante la técnica de Micronúcleos y el Ensayo Cometa y se asocian estos resultados a la susceptibilidad individual por los polimorfismos genéticos de la enzima ALA-D.

6.2. Caracterización de la muestra poblacional

La población analizada en este estudio fueron 59 personas entre niños y adultos (Muestreo por conglomerado en el que se tiene como unidad de estudio la familia y como unidad de análisis los individuos) establecidos en el área rural de la vereda La Bonga, en el municipio de Malambo, Atlántico. Cabe aclarar que en un principio se vincularon al estudio 70 personas, sin embargo problemas en la muestras de sangre de 11 de ellas, impidieron realizar ciertos protocolos importantes para evaluar el daño en el ADN y por tanto se excluyen del análisis estadístico de los datos.

Toda la población participante conoció previamente los objetivos por los cuales se realizó el estudio, los riesgos que de él se podían derivar y el carácter voluntario de su intervención. Se firmó el consentimiento y/o asentimiento informado, sin excepción, dependiendo de si era un niño o un adulto, el que autorizaba el uso de su muestra biológica para fines científicos.

6.2.1. Criterios de inclusión: se incluyeron en el estudio niños y adultos establecidos en el área rural de la vereda La Bonga por al menos un año, teniendo en cuenta la fecha de diciembre de 2012 en que se da la alerta de intoxicación por plomo.

6.2.2. Criterios de exclusión: se excluyeron los niños y adultos que no diligenciaron el consentimiento informado y/o asentimiento informado respectivo para la realización del estudio, así como los individuos de los cuales se obtuvieron muestras de sangre con calidad no óptima

para al menos unos de los ensayos a realizar. Al ser este un estudio de biomonitorio no se tomaron como criterios de exclusión factores como: deficiencias nutricionales, hábitos periódicos de fumar y consumir alcohol, trabajo con agentes químicos o físicos que podrían alterar el ADN por cuenta propia, consumo de medicamentos en posología diaria por tiempo prolongado o enfermedades de tipo crónico, especialmente aquellas relacionadas con las células sanguíneas. Estas variables son tenidas en cuenta como factores de confusión en el análisis estadístico de los datos.

6.3. Obtención de las muestras

La totalidad de las muestras de sangre fueron obtenidas entre el 29 de agosto y el 29 de septiembre de 2013. Estas se tomaron con apoyo de un grupo especializado de la Secretaria de Salud Departamental del Atlántico, conformado por: dos enfermeras, cuatro epidemiólogos, dos especialistas en salud ambiental y un encargado del proyecto. Las muestras fueron recolectadas en tres jornadas (convocatoria verbal) realizadas a cada 15 días en el instituto educativo de la vereda La Bonga, que presto una de sus aulas para tal fin.

Tanto en niños como en adultos fueron tomados 6 ml de sangre por venopunción, en condiciones de total esterilidad, en dos vacutainers uno con heparina sódica (3 ml) para la realización de los ensayos de genotoxicidad, Ensayo Cometa y test de Micronúcleos, y un segundo (3 ml) con EDTA como anticoagulante para el análisis de polimorfismos y la valoración de niveles de plomo en sangre.

A cada muestra le fue asignado un código de trabajo que consistía en las letras PB seguidas de tres dígitos numéricos, con lo cual fueron claramente identificadas en el estudio, pudiendo verificar su trazabilidad en los diferentes ensayos. Las muestras se transportaron por avión hasta Bogotá, al laboratorio de Citogenética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional el mismo día de su obtención. Para el transporte las muestras fueron empacadas de acuerdo a la reglamentación de triple embalaje estipulado por la aeronáutica civil en el apartado de “transporte de muestras biológicas” y se conservaron refrigeradas. En los aeropuertos el recipiente que

contenía las muestras fue examinado de forma física pero no fue expuesto en ningún momento a rayos X.

Junto con la Toma de muestra se llevó a cabo el diligenciamiento de una encuesta que permitió obtener información individual y general de los participantes del estudio, para hacer posible el análisis posterior de variables de confusión. Con frecuencia, este tipo de encuestas es utilizado en estudios de biomonitorio para averiguar los hábitos y estilos de vida, áreas de desempeño laboral, posible exposición a otros agentes de daño genotóxico diferentes al evaluado, antecedentes familiares, entre otros.

6.4. Procedimiento de los ensayos aplicados

6.4.1. Biomarcador de Exposición - Cuantificación de Plomo en sangre: la determinación de plomo en sangre la realizó el laboratorio de Salud Ambiental del Instituto Nacional de Salud mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito a partir de muestras de sangre periférica recolectada en tubos vacutainers con anticoagulante EDTA y mantenidos a 4°C. Las unidades de medición en las que se analizaron los resultados son µg/dL.

6.4.2. Biomarcador de Efecto

6.4.2.1. Ensayo del Cometa Alcalino

El Ensayo Cometa fue realizado bajo condiciones alcalinas según lo especifica Tice *et al.* (2000) y con muestras de sangre periférica de máximo un día de vejez, obtenida en tubos vacutainer con heparina sódica conservados a 4°C. Los preparados se llevaron a cabo con dos capas de agarosa, una primera con 150 µl de agarosa de punto de fusión normal al 1% y una segunda en la que se mezcló 5 µl de sangre periférica con 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Se realizaron dos preparados en portaobjetos independientes y de manera simultánea por cada individuo (Figura 3).

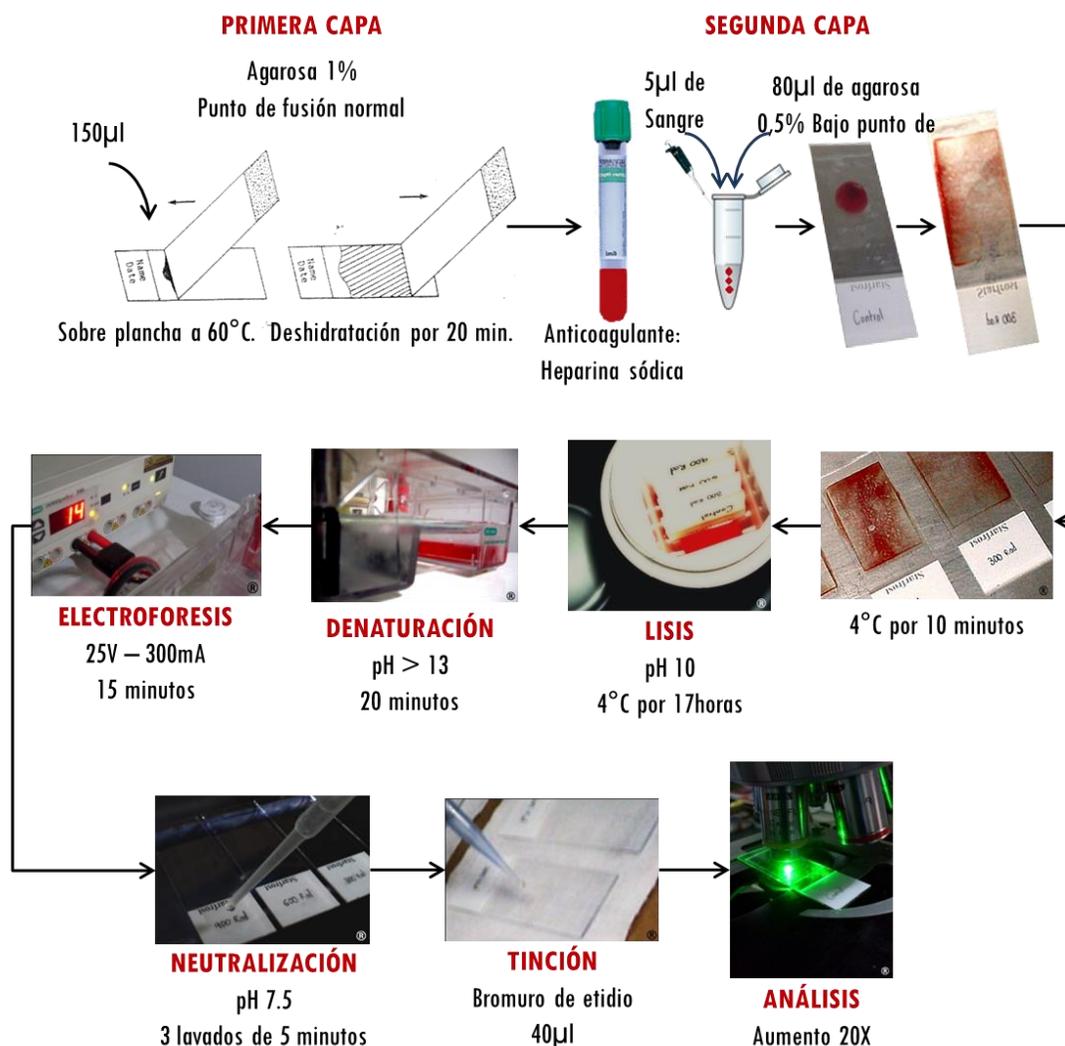


Figura 3. Pasos básicos del Ensayo Cometa.

Las láminas con los preparados fueron sumergidas en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% Triton X-100 y 10% DMSO) pH 10 a 4°C por 17 horas para retirar las membranas celular y nuclear, junto con los restos citoplasmáticos. Posterior a esto, las láminas ingresaron a un buffer de denaturación (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM) pH 13 durante 20 min a 4°C y un proceso de electroforesis por 15 min a 25 V y 300 mA, así la doble hebra de ADN ya separada, migró al polo positivo dejando en evidencia las rupturas de cadena simple y doble, en caso de encontrarse presentes (Figura 4).

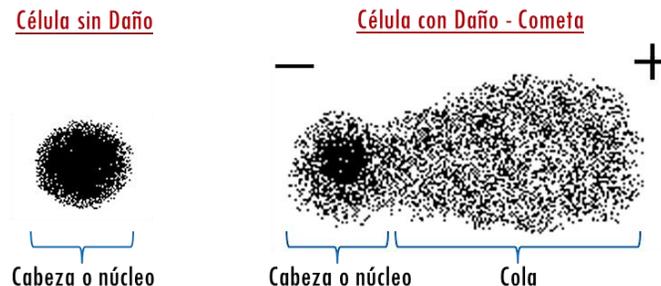


Figura 4. Célula con y sin daño después de electroforesis alcalina.

Al finalizar la electroforesis los preparados fueron lavados tres veces en un buffer de neutralización (0,4 M Tris) a pH 7,5 a 4°C lo que permitió la renaturación de las hebras sanas del ADN y eliminó el ruido de fondo o background de los geles. Los portaobjetos se colocaron sobre una plancha a 37°C para deshidratar los geles. La tinción se realizó con 40µl de bromuro de etidio momentos previos a la lectura de cada portaobjeto al microscopio (Figura 3).

La visualización de los geles se realizó en un microscopio ZEISS con lámpara de fluorescencia HBO de 100 W y un filtro de BP 546 FT 580 LP 590, conectado a una cámara digital Nikon. La magnificación empleada para el análisis fue de 20X. Las imágenes fueron capturadas con uso del software Lucia y procesadas por medio del software de Comet ScoreTM. En este último, se llevó a cabo la medición de longitud de cola, porcentaje de ADN en cola y momento de cola en un total de 100 células (cometas) por individuo, ya que según Faust *et al.* (2004) son los parámetros más empleados y de mejor referencia en este tipo de ensayo.

6.4.2.2. Test de Micronúcleos

Para llevar a cabo el test de micronúcleos (Fenech 1993) se realizó en primer lugar la siembra de linfocitos de sangre periférica de máximo un día de vejez, recolectada en tubos vacutainer con heparina sódica conservados a 4°C; añadiendo 500 µl de sangre a aproximadamente 5 ml de medio. El medio completo estuvo constituido por 4,5 ml de medio RPMI 1640, 500 µl de suero fetal bovino, 100 µl de penicilina – estreptomycin y 75 µl de Fitohemaglutinina para estimular el crecimiento celular. Los cultivos se manejaron en tubos Falcón de 15 ml inclinados y se

mantuvieron en una incubadora a 37°C, protegidos de la luz. Trascurridas 44 horas se agregó 12 µl de Citocalasina B (3 mg/ml) en esterilidad a cada frasco con el fin de inhibir la citocinesis y se volvió ingresar a incubadora hasta completar el término de 72 horas (Figura 5). Se realizaron de forma simultánea dos cultivos por cada individuo a evaluar.

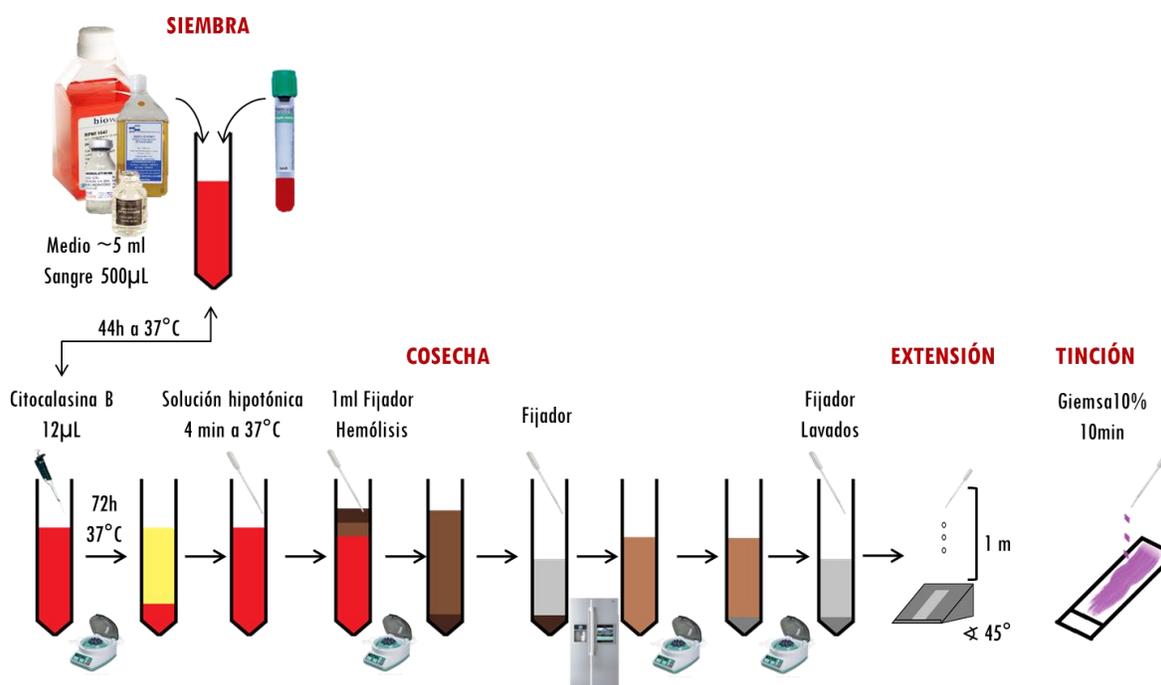


Figura 5. Pasos básicos del Test de Micronúcleos.

Al finalizar las 72 horas de incubación se inició la fase de cosecha centrifugando los cultivos a 2000 rpm durante 10 minutos, seguidos de un choque hipotónico con solución de KCl (0,075 M) a 37°C por 4 minutos, una prefijación con 1ml de fijador Carnoy (metanol – ácido acético en proporción 3:1), una fijación y tres lavados. El botón celular que se obtuvo se resuspendió en una pequeña cantidad de fijador Carnoy y se extendió en láminas limpias a una inclinación de 45° y con un 1 m de altura aproximadamente. Por cada cultivo se extendió al menos una lámina. La tinción de los portaobjetos se realizó con giemsa al 10% en Buffer fosfato (pH 6,8) por 10 minutos (Figura 5).

Para el análisis, las láminas se observaron a 20X y 100X aumentos en un microscopio Zeiss Axiophot. Las imágenes fueron capturadas por medio de una cámara digital Nikon acoplada al

microscopio y se visualizaron mediante el software Lucia 5.30. Se realizó el conteo de 1000 células binucleadas, para las cuales se tuvo en cuenta el número de micronúcleos por célula, la presencia de estructuras no micronucleadas como puentes nucleoplásmicos o gemas y la evidencia de fenómenos de apoptosis o necrosis (Figura 6). De igual forma se contaron 500 células en general para hallar el índice de la proliferación celular con bloqueo de la citocinesis, el cual es considerado una medida de citotoxicidad, empleando la fórmula a continuación (Surrallés *et al.* 1995):

$$\frac{M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)}{N}$$

En donde M_1 son las células mononucleadas, M_2 las binucleadas, M_3 las trinucleadas, M_4 las tetranucleadas y N el número total de células contadas.

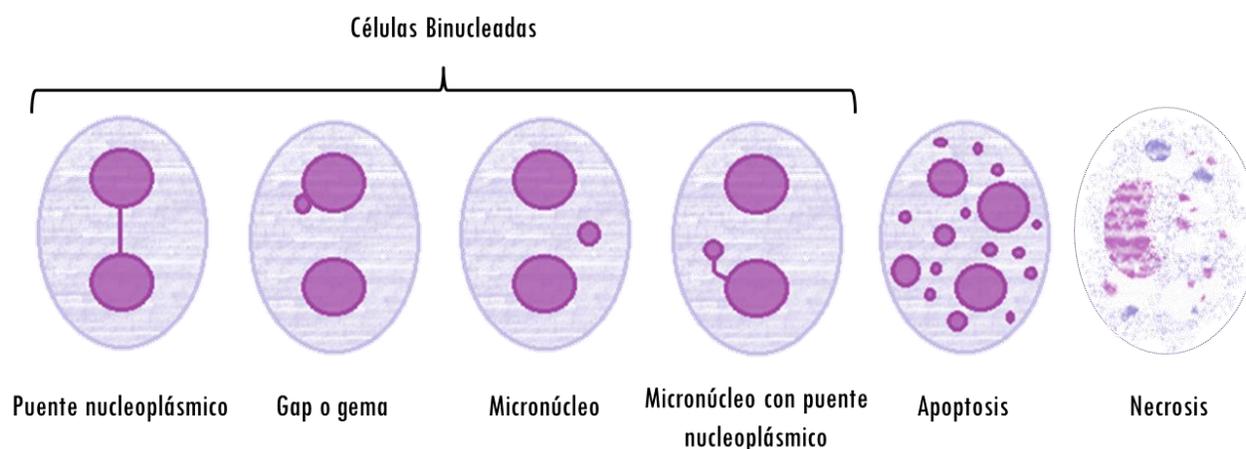


Figura 6. Células con evidencia de daño en el test de micronúcleos.

6.4.3. Biomarcador de Susceptibilidad

6.4.3.1. Extracción de ADN

Este procedimiento se realizó según el protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre del Laboratorio del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona. En todos los casos se trabajó con muestras de 1ml de

sangre periférica congelada a -20°C obtenida por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA y conservada en eppendorf de 1,5 ml.

El Protocolo consistió principalmente en tres etapas, la primera de ellas fue la **Lisis de eritrocitos** en la que se lavó las muestras de sangre descongeladas con suero fisiológico y buffer TLE (Tris 2 M pH 7,5 y Mg $\text{Cl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 M) hasta dejar el botón de células blancas lo más limpio posible. Posteriormente, se llevó a cabo la **Lisis de leucocitos** y digestión de proteínas resuspendiendo el pellet de linfocitos aislados en 3 ml de buffer TLL (NaCl 5 M, EDTA 0,25 M pH 8,0 y Tris 2 M pH 7,5) a pH 8,2, 200 μl de solución SDS 10% y 500 μl de proteinasa K. A la mezcla resultante se le realizó vortex hasta obtener un aspecto homogéneo y se mantuvo a 37°C durante 6 horas (Figura 7).

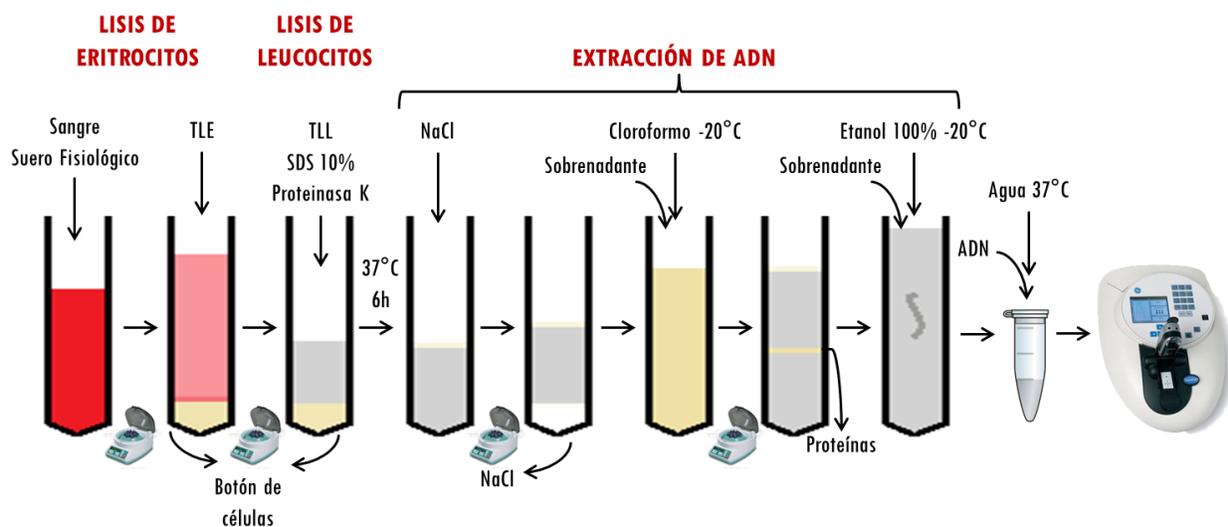


Figura 7. Pasos básicos de la extracción de ADN.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la **Extracción de ADN** propiamente dicha, en la cual se adicionó inicialmente 1 ml de NaCl (5 M) que se mezcló por vortex 20 segundos y se retiró el exceso de sales con centrifugado a 3500 rpm en dos ocasiones. Se agregó 4ml de cloroformo frío a la solución resultante y se mezcló manualmente por inversión hasta obtener una emulsión homogénea de color blanco, que se centrifugo una vez más a 3500 rpm para obtener tres fases. La superior que es la de interés, se transfirió a otro tubo, se le adiciono 8 ml de Etanol

100% frío, se agito suavemente y se mantuvo 20 minutos a -20°C para precipitar del ADN (Figura 7).

La medusa de ADN se pasó a tubos eppendorf de 1,5 ml dejando evaporara el exceso de etanol. El ADN se diluyó entre 50 µl – 200 µl de agua grado molecular a 37°C y se cuantificó en un NanoVeu espectrofotómetro de GE Healthcare Life Sciences (Figura 7). En todos los casos se registró la determinación de ADN en ng/µl y se cuidó que las purezas se encontraran entre 1,8 y 2 para una absorbancia 260/280. Las extracciones se guardaron a -20°C.

6.4.3.2. Amplificación del gen ALAD y detección del polimorfismo

El polimorfismo se detectó usando la metodología PCR-RFLP (Shaik y Jamil 2008). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica ampliamente utilizada en la biología molecular para amplificar fragmentos de ADN mediante replicación enzimática *in vitro* y los Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) son usados para determinar mediante el uso de enzimas de restricción la presencia o ausencia de un polimorfismo específico.

La PCR se realizó amplificando 2 µl de ADN en un volumen de reacción final de 25 µl que contuvo, 0,4 µM de cada primer (F: 5'-GACCGTTGCCTGGGAC-3' R: 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3') (Shaik y Jamil 2008, Sobin *et al.* 2009), 200 µM de cada dNTP, 1X Buffer de PCR, 3 mM MgCl₂ y 1,25U de Taq DNA Polimerasa. El protocolo de PCRs consistió en una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación de 95°C por 30 segundos, 30 segundos de hibridación a 69°C y una extensión a 72°C por 45 segundos; y un paso de extensión final de 72°C por 10 minutos. Los amplificados (4 µl) se corrieron en geles de agarosa de 1,5% para verificar el tamaño del fragmento deseado (579 pb) tal como se muestra en la figura 8 y se conservaron a -20°C hasta el momento de la restricción.

El producto amplificado fue digerido a 37°C durante 2 horas con 6U de la enzima de restricción MspI (New England Biolabs) en 15 µl de reacción final que contuvo 1X de Buffer CutSmart. El producto digerido se evidenció en geles de poliacrilamida al 38-2%. El polimorfismo del gen

ALAD está atribuido a la presencia (CCGG) o ausencia (GCGG) del sitio MspI en el nucleótido 177 (nucleótido 66 del amplificado trabajado), que predice la sustitución de una asparagina por una lisina en el residuo 59 (K59N) de la subunidad enzimática. El genotipo ALAD₁₋₁ es la variante de tipo salvaje y se caracterizó por un fragmento de 579 bp. Otra variante homocigota, ALAD₂₋₂, tiene una sustitución C por G, con un sitio MspI que se caracterizó por un fragmento de 66 bp fragmentos (Figura 8). La variante heterocigota incluye tanto 579 como 66 pb (Shaik y Jamil 2008).

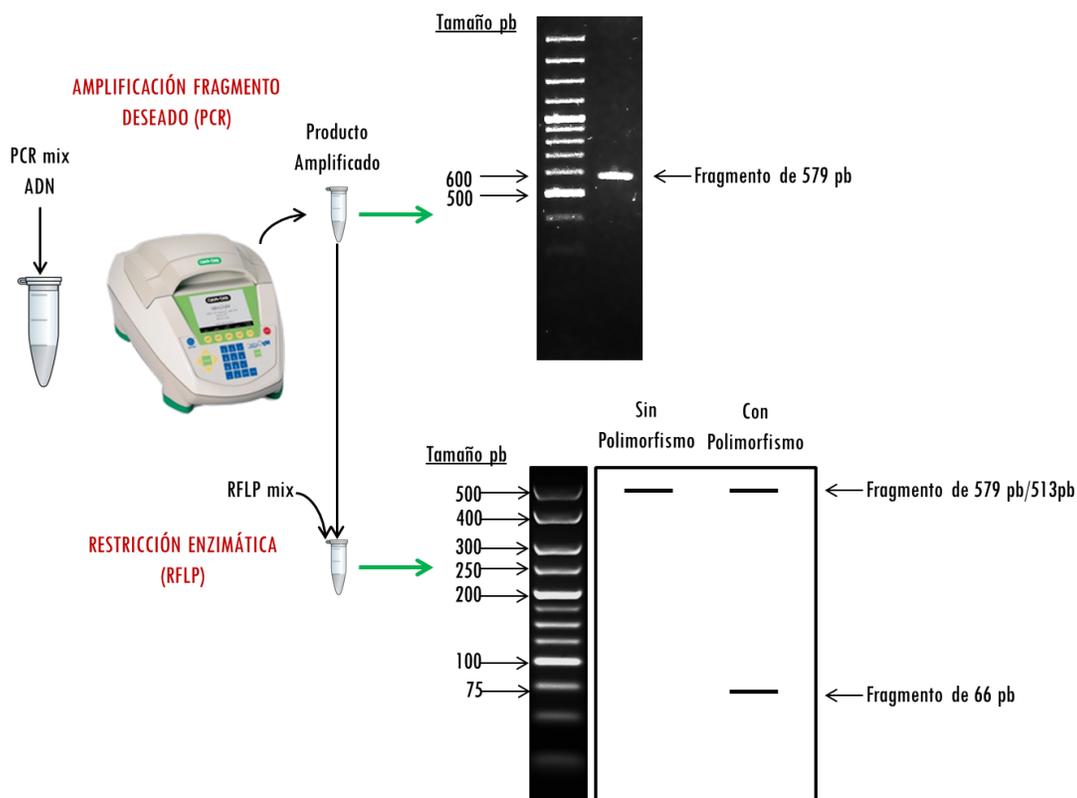


Figura 8. Determinación del polimorfismo del gen ALAD.

6.5. Tratamiento estadístico de los datos

Se comprobaron criterios de normalidad por el de test Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianzas por el test de Levene para escoger el análisis paramétrico o no paramétrico de los datos. El análisis de las diferencias significativas entre grupos se realizó por las pruebas de ANOVA o Kruskal-Wallis. Se llevó a cabo una correlación de Pearson entre los niveles de sangre detectados y el daño en el material genético. La asociación entre el evento genotóxico detectado y

el polimorfismo presente se hizo por medio del cálculo de diferencias significativas entre grupos. Los test se realizaron con el paquete estadístico SPSS 17, Statistix 10 y el programa Excel 2010. La diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de la muestra poblacional

Los 59 individuos vinculados al estudio se obtuvieron de una población ambientalmente expuesta a plomo en el área rural de la vereda La Bonga, zona en la que han habitado por lo menos durante un año. En la tabla 1 se resumen las principales características demográficas de la población de estudio, obtenidas mediante el análisis de las encuestas efectuadas simultáneamente con el procedimiento de toma de muestras.

Tabla 1. Características demográficas de la muestra poblacional.

Grupos de Variables	Variable o Factor de confusión	Niveles de la variable	n
Datos Personales	Edad (años)	<15	19
		>15	40
	Sexo	F	34
		M	25
Ambiente laboral o escolar	Contacto actual con posibles genotóxicos*	Ninguno	49
		Al menos 1	10
	Contacto anterior con posibles genotóxicos*	Ninguno	49
		Al menos 1	10
Dieta	Alimentación Balanceada	Si	54
		No	5
	Consumo de agua Filtrada	Si	34
		No	25
Hábitos	Tabaco	Si	3
		No	56
	Alcohol	Si	15
		No	44
	Café	Si	45
		No	14
Historia Médica	Presencia de cáncer familiar	Si	10
		No	49
	Problemas de salud	Si	9
		No	50

*Los posibles genotóxicos tenidos en cuenta para la encuesta fueron: reactivos químicos, otros metales distintos a plomo e inclusive, pinturas o tintes, radiaciones y pesticidas entre otros.

Las variables incluidas hacen referencia al total de la muestra evaluada (n=59) y se organizaron teniendo en cuenta los factores de confusión que pueden incidir en el comportamiento de las variables respuesta, es decir, aquéllas que reflejen daño en el ADN. Con el fin de trabajar una muestra lo más representativa posible no se hicieron limitaciones de edad, sexo, condiciones de exposición laboral o escolar a posibles genotóxicos (diferentes al de interés), dieta, hábitos e historia médica; así se obtuvo una muestra entre hombres y mujeres, desde los 2 hasta los 73 años de edad.

7.2. Biomarcador de Exposición: Niveles de Plomo en Sangre

Los niveles de plomo en sangre encontrados en la muestra evaluada oscilan entre 6,40 $\mu\text{g/dL}$ y 46,20 $\mu\text{g/dL}$ (Figura 9). En la figura 9 se puede observar la línea de tendencia de este biomarcador de exposición cuando se enfrenta a la variable edad y se categoriza dependiendo de la variable sexo. Es de tener en cuenta que el R^2 de ambos sexos no indican un buen ajuste al modelo lineal pero si permite evidenciar que en hombres y mujeres hay un comportamiento decreciente de los niveles de plomo en sangre a medida que aumenta la edad y que en general los hombres presentan una mayor concentración de plomo en sangre cuando se les compara con el sexo femenino.

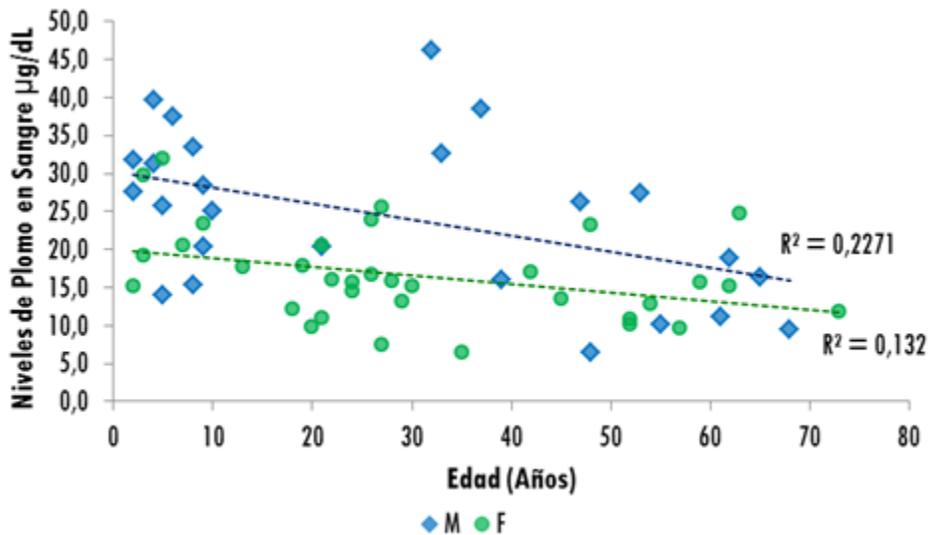


Figura 9. Relación de los niveles de plomo en sangre con la edad y el sexo de los individuos.

Teniendo en cuenta lo anterior, la tabla 2 presenta las diferencias significativas encontradas al comparar los niveles de plomo en sangre entre las categorías de una misma variable, es decir, entre menores y mayores de 15 años para el caso de la edad, así como individuos de sexo femenino y masculino.

Tabla 2. Niveles de plomo en sangre de acuerdo a la edad, el sexo y el consumo de agua filtrada de los individuos.

	Nivele de Pb en sangre ($\mu\text{g/dL}$)	
Edad (años)	<15 ^(a)	25,58 \pm 7,62** ^(b)
	>15 ^(b)	17,15 \pm 8,45** ^(a)
Sexo	F ^(a)	16,59 \pm 6,08** ^(b)
	M ^(b)	24,40 \pm 10,55** ^(a)
Consumo de Agua Filtrada	Si	21,79 \pm 9,90
	No	17,31 \pm 7,19

* P < 0,05 **P < 0,01 Se aplicó ANOVA para: Edad y agua filtrada. Kruskal-Wallis: Sexo.

En este apartado, se tomaron como medidas de comparación las variables de sexo, edad, y consumo de agua filtrada, puesto que independientemente a la influencia sobre el daño en el ADN, también pueden incidir sobre los niveles de plomo y por tanto era de interés analizarlas.

7.3. Biomarcador de Efecto

El Ensayo del Cometa alcalino y el test de Micronúcleos fueron los biomarcadores de efecto empleados para evidenciar el daño en el material genético de la personas ambientalmente expuestas a plomo. Como es una de las inquietudes principales de este estudio conocer cómo se comportan las distintas variables de daño del ADN en respuesta al biomarcador de exposición, en primer lugar se realizó un análisis de varianza para hallar posibles diferencias significativas entre seis grupos distintos de niveles de plomo en sangre. La variable de niveles de plomo en sangre es de carácter cuantitativa continua y se categorizó únicamente en esta ocasión.

En la Tabla 3 se muestran las diferencias significativas y la estadística descriptiva que resulta al comparar el daño en el ADN con las categorías de los niveles de plomo en sangre. Las variables

de daño evaluadas para el Ensayo del Cometa alcalino fueron: la longitud de cola, el porcentaje de ADN en cola y el momento de cola, pues son las más empleadas en estudios de biomonitoreo y permiten realizar comparaciones con lo obtenido por otros autores (Faust *et al.* 2004). En el caso del test de micronúcleos solo se consideró como variable el número de células binucleadas con micronúcleos, pues otras medidas como el número total de micronúcleos por individuo, enmascararían el daño sin considerar en realidad cuantas son las células afectadas.

Tabla 3. Daño en el ADN de acuerdo a las categorías de niveles de plomo en sangre.

		Longitud de Cola (px)		Porcentaje de ADN en Cola	Momento de Cola	CB con Micronúcleos
		n	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Niveles de Plomo en Sangre ($\mu\text{g/dL}$)	$6 \leq x < 13^{(a)}$	14	55,82 \pm 39,07	13,34 \pm 5,79	16,76 \pm 12,92	28,21 \pm 13,77
	$13 \leq x < 20^{(b)}$	20	49,41 \pm 33,57	12,29 \pm 3,75	13,54 \pm 10,38	19,95 \pm 8,76
	$20 \leq x < 27^{(c)}$	12	35,75 \pm 12,36	12,63 \pm 5,26	9,88 \pm 5,05	15,25 \pm 9,59 ^{*(a)}
	$27 \leq x < 34^{(d)}$	9	43,25 \pm 22,50	12,90 \pm 7,02	12,18 \pm 8,18	14,88 \pm 6,43
	$34 \leq x < 41^{(f)}$	3	60,26 \pm 47,34	12,10 \pm 2,45	15,76 \pm 13,34	13,33 \pm 6,80
	$41 \leq x < 48^{(g)}$	1	54,09 \pm 0,00	12,08 \pm 0,00	12,26 \pm 0,00	11,00 \pm 0,00

* $P < 0,05$ ANOVA: Porcentaje de ADN en cola y Momento de cola. Kruskal-Wallis: Longitud de cola y Células binucleadas con micronúcleos.

También se consideró relevante evaluar las diferencias presentes en el daño del material genético debido a las variables edad y sexo (Tabla 4), que como se mencionó en el apartado anterior (Biomarcador de exposición), presentan diferencias significativas en la respuesta de los niveles de plomo en sangre, los cuales constituyen la variable independiente de mayor interés del estudio.

Tabla 4. Daño en el ADN según la edad y sexo de los individuos.

		Longitud de Cola (px)	% ADN en Cola	Momento de Cola	CB con Micronúcleos
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Edad (años)	$< 15^{(a)}$ (n=19)	40,72 \pm 28,94	12,22 \pm 5,65	11,57 \pm 9,83	13,68 \pm 5,44 ^{** (b)}
	$> 15^{(b)}$ (n=40)	51,23 \pm 31,36	12,91 \pm 4,64	14,34 \pm 9,99	22,55 \pm 11,85 ^{** (a)}
Sexo	F ^(a) (n=34)	51,89 \pm 34,13	12,89 \pm 5,18	14,73 \pm 11,28	22,53 \pm 12,02 ^{* (b)}
	M ^(b) (n=25)	42,33 \pm 25,07	12,42 \pm 4,72	11,70 \pm 7,63	15,84 \pm 8,19 ^{* (a)}

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ Edad: (ANOVA) Longitud de cola, Porcentaje de ADN en cola y Momento de cola. (Kruskal-Wallis) Células binucleadas con micronúcleos. Sexo: (ANOVA) Todas.

Finalmente para dar respuesta a uno de los objetivos específicos de este estudio, se realizó un análisis de correlación entre la variable de exposición (niveles de plomo en sangre), cada una de las variables de daño genético y la edad, con el fin de conocer el grado o magnitud de la relación presente entre ellas, la dirección de esta asociación y su respectiva significancia (Tabla 5).

Tabla 5. Correlación entre los niveles de plomo en sangre, el daño en el ADN y la edad.

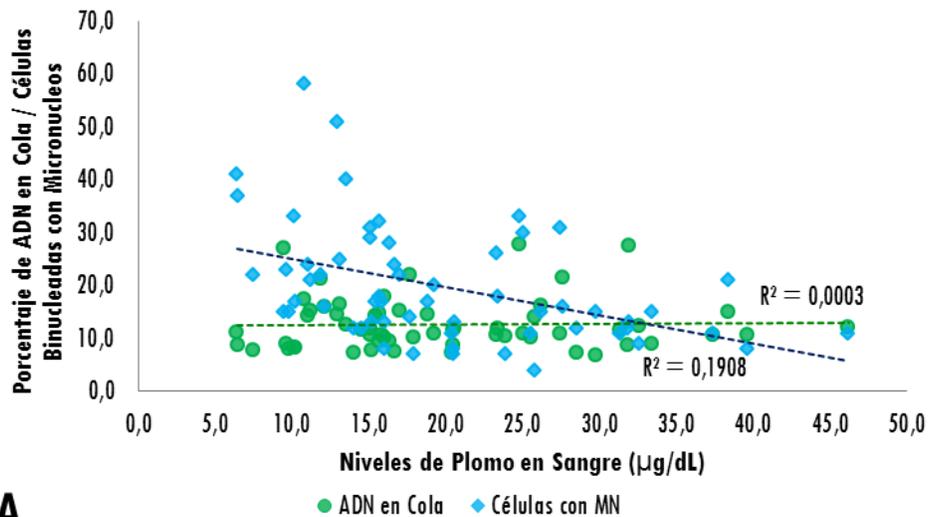
	NPbS	Longitud de Cola	% ADN en Cola	Momento de Cola	CB con MN	Edad
NPbS	1					
Longitud de Cola	-0,027	1				
% ADN en Cola	0,017	0,631**	1			
Momento de Cola	-0,063	0,976**	0,683**	1		
CB con MN	-0,437**	0,207	0,112	0,213	1	
Edad	-0,414**	0,285*	0,277*	0,291*	0,546**	1

*Correlación significativa a 0,05 ($P < 0,05$) **Correlación significativa a 0,01 ($P < 0,01$)
 NPbS: Niveles de Plomo en Sangre, CB con MN: Células Binucleadas con Micronúcleos

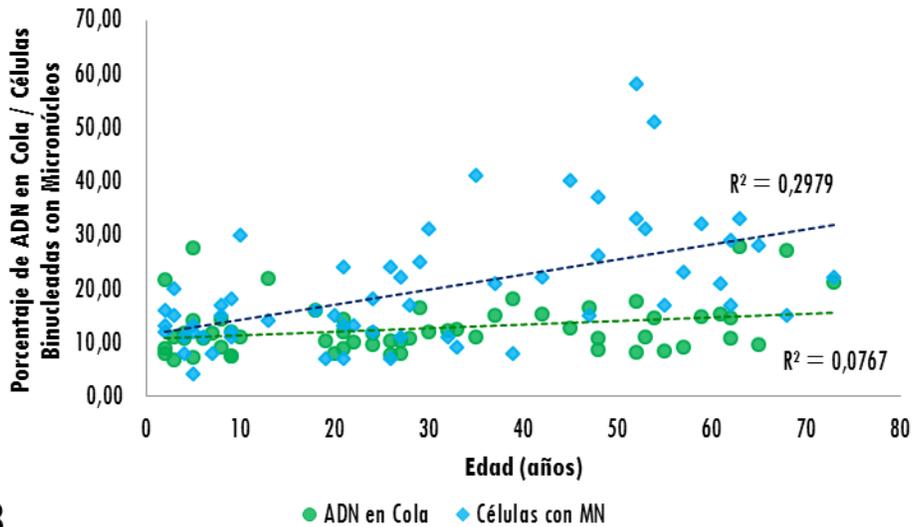
A partir de la tabla anterior es posible afirmar que los niveles de plomo en sangre aun cuando no presentan una asociación fuerte con ninguna variable de daño genético, muestran significancia en el grado de asociación al número de células binucleadas con micronúcleos y con la edad. Ambas asociaciones son cercanas a 0,4 y manifiestan un comportamiento inversamente proporcional al del biomarcador de exposición.

El estudio de las correlaciones entre las variables de daño del material genético, es decir, las halladas por el Ensayo Cometa y la obtenida por el test de Micronúcleos, no presentan relaciones importantes. Sin embargo como es lógico al tratarse de un mismo ensayo, las tres variables tomadas a partir de la prueba del cometa alcalino están fuerte y significativamente relacionadas, siendo estas asociaciones en todos los casos directamente proporcionales. Por esta razón en adelante al hacer referencia al ensayo cometa solo se hará relevancia en la variable del porcentaje de ADN en cola, pues no solo es una medida más rigurosa en cuanto al daño total intercelular e intracelular, sino que además es un parámetro sencillo de comparar sin importar las diferencias entre las unidades de medida que los software de análisis arrojan como μm ó px (píxeles), las cuales afectan a los valores que toman las variables de longitud de cola y momento de cola.

En la Figura 10 se puede observar el comportamiento de la dispersión de datos para las variables de porcentaje de ADN en cola y número de células binucleadas con micronúcleos frente a los niveles de plomo en sangre (A) y la edad (B). En todos los casos las R^2 no manifiestan un buen ajuste al modelo lineal, pero dejan en claro que las variables de daño genético aumentan en proporción a la edad, si bien no evidencian la relación esperada con los niveles de plomo en sangre (a mayores niveles de metal mayor el daño en el ADN).



A



B

Figura 10. Comportamiento del daño en el ADN según los niveles de plomo en sangre (A) y la edad de los individuos (B).

7.3.1. Ensayo del Cometa Alcalino

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las variables analizadas para el ensayo cometa fueron la longitud de cola, el momento de cola y el porcentaje de ADN en cola, con especial relevancia en esta última. Aunque todas las medidas para este biomarcador se hallaron de forma cuantitativa, a nivel cualitativo se puede establecer que las muestras presentaron distintos grados de daño (Figura 11). Esto se puede evidenciar con las diferentes conformaciones del cometa (ADN de una sola célula), teniendo en cuenta que el menor daño es aquél en el que se refleja la totalidad del ADN en la cabeza del cometa (Figura 11A) y el mayor daño, aquél en el que el ADN de la cabeza es prácticamente inexistente y se encuentra casi en su totalidad distribuido en la cola (Figura 11B).

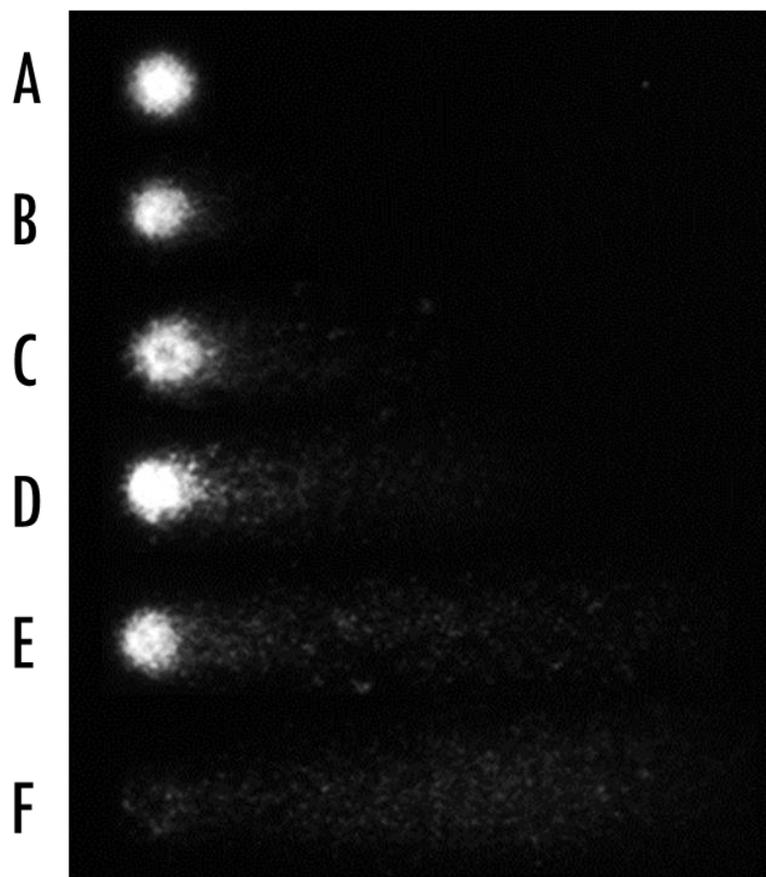


Figura 11. Escala de daño cualitativo del ensayo cometa obtenida a partir del análisis de la muestra poblacional. El grado de daño va de menor a mayor desde la (A) a la (F).

Con el fin de evaluar el efecto que los posibles factores de confusión juegan sobre el daño en el material genético medido por el porcentaje de ADN en cola, se realizó una prueba de efectos entre sujetos. Sólo aquellos factores o covariables que presentaron significancia para la prueba de efectos entre sujetos fueron incluidos en el modelo final, a excepción de la variable independiente de niveles de plomo en sangre, que aun cuando no presento relevancia se incluyó al ser una de las variables principales del estudio. El modelo final que pretende explicar el peso que cada una de las covariables o factores ejercen sobre la variable dependiente, se llevó a cabo mediante un análisis de varianza univariante (Tabla 6).

Tabla 6. Modelo estadístico para Porcentaje de ADN en Cola.

<u>Variable dependiente</u>		β	p
Porcentaje de ADN en Cola	Modelo	---	0,008**
	Intercepto	---	0,001**
	Niveles de Pb en sangre	0,134	0,320
	Edad	0,301	0,029*
	Cáncer Familiar	0,311	0,014*

R² corregida 0,149
β: Coeficiente estandarizado
p: Nivel de significancia * P < 0,05 **P < 0,01

7.3.2. Test de Micronúcleos

Para el test de Micronúcleos se trabajó especialmente con la variable del número de células binucleadas con micronúcleos, siendo Ésta un muy buen indicador de la cantidad de células que presentan daños fijos en el material genético. Sin embargo otras variables cuantitativas como el índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis y cualitativas como la frecuencia de estructuras no micronucleadas, la apoptosis y la necrosis, fueron registradas aun cuando no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico de los datos.

El índice de proliferación celular con inhibición de la citocinesis está considerado como un indicador de daño celular más que una medida de daño genético, es decir, da mayor información de citotoxicidad que de genotoxicidad. Este índice osciló en todos los individuos estudiados entre

1,6 - 1,7 y no mostró diferencias estadísticamente significativas al ser comparado con las categorías propuestas para la variable independiente de niveles de plomo en sangre. En él se refleja el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas encontradas en un recuento de 500 células por individuo (Figura 12).

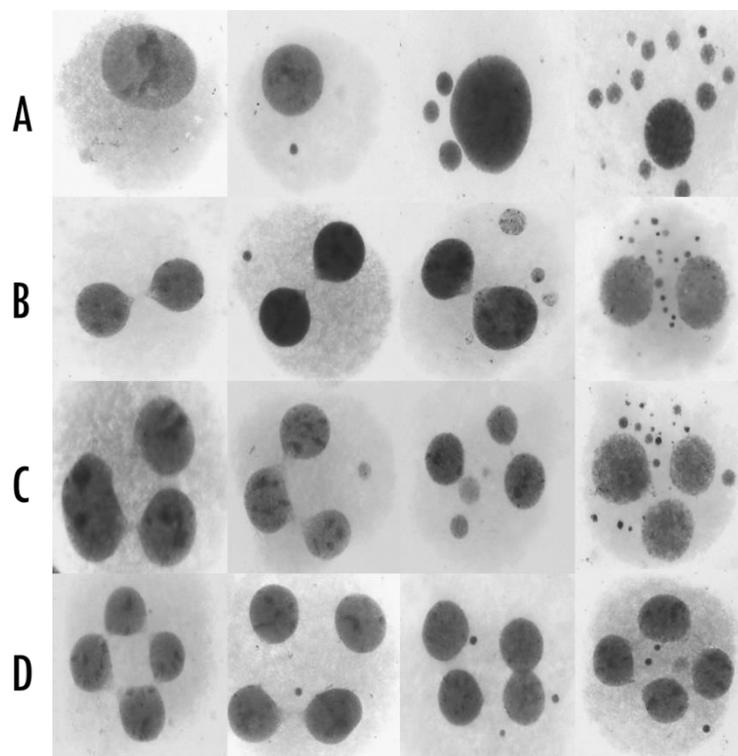


Figura 12. Células mononucleadas (A), binucleadas (B), trinucleadas (C) y tetranucleadas (D). De izquierda a derecha aumenta el grado de daño fijado en el ADN a través del incremento de micronúcleos. La primera columna son células sin daño.

En cuanto a las variables cualitativas como la frecuencia de estructuras no micronucleadas, la apoptosis y la necrosis, cabe destacar que no son indicadores generalmente mencionados en los estudios de biomonitordeo. En el caso de las estructuras no micronucleadas como gemas y puentes nucleoplásmicos, aunque se evidencia un retraso en la organización final de los núcleos principales o errores en la disyunción celular, respectivamente, estos no son considerados daños fijos del ADN, pues no hay separación del material vulnerable y el núcleo como tal (Figura 13).

El grado de apoptosis y necrosis, al igual que el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis, son mejores indicadores de citotoxicidad que de genotoxicidad y en muchos casos pueden reflejar falsos positivos, es decir, daños de la muestra biológica más no de los individuos (Figura 13). Por ejemplo una muestra de sangre lisada evidencia gran número de apoptosis y necrosis, sin este ser un resultado fiel a la condición del individuo del que provenga.

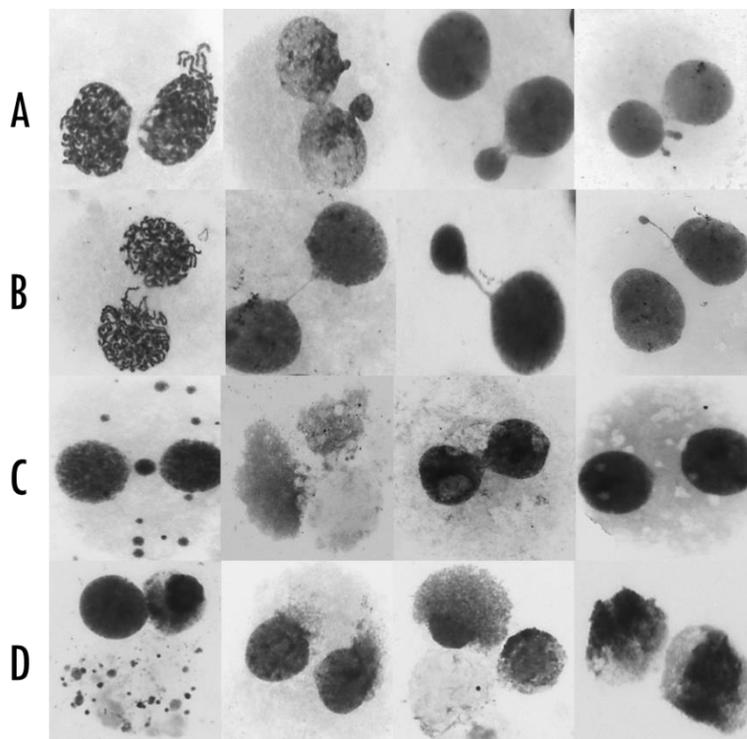


Figura 13. Células binucleadas con estructuras no micronucleadas: células con gemas (A) y células con puentes nucleoplásmicos (B), apoptosis (C) y necrosis (D).

Al igual que para la variable de porcentaje de ADN en cola (Ensayo Cometa), para analizar el efecto de los posibles factores de confusión sobre la variable dependiente, número de células binucleadas con micronúcleos, se llevó a cabo la prueba de efectos entre sujetos, con lo cual se discriminó de acuerdo al nivel de significancia los factores o covariables incluidos en el modelo final. El modelo final se realizó mediante un análisis de varianza univariante, en éste se incluyó la variable independiente de niveles de plomo en sangre, incluso sin haber pasado el criterio de significancia por su relevancia en el estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Modelo estadístico para Células Binucleadas con Micronúcleos.

<u>Variable dependiente</u>		β	p
Número de Células Binucleadas con Micronúcleos	Modelo	---	0,000**
	Intercepto	---	0,002**
	Niveles de Pb en sangre	-0,173	0,153
	Edad	0,509	0,000**
	Alcohol	0,253	0,025*

R² corregida 0,377
 β : Coeficiente estandarizado
p: Nivel de significancia * P < 0,05 **P < 0,01

7.4. Biomarcador de Susceptibilidad

Del total de individuos analizados, 47 no poseen el polimorfismo (ALAD₁₋₁) y 12 de ellos poseen el polimorfismo (ALAD_{1-2/2-2}). Se realizó un análisis de varianza entre grupos de susceptibilidad con y sin el polimorfismo, teniendo en cuenta el biomarcador de exposición, niveles de plomo en sangre y el biomarcador de daño expresado en porcentaje de ADN en cola y células binucleadas con micronúcleos. Se encontraron diferencias significativas para los niveles de plomo en sangre y la frecuencia de células micronucleadas (Tabla 8).

Tabla 8. Daño en el ADN y niveles de plomo en sangre según el biomarcador de susceptibilidad.

	ALAD ₁₋₁ ^(a) (n=47)	ALAD _{1-2/2-2} ^(b) (n=12)
Niveles de Plomo en Sangre ($\mu\text{g/dL}$)	21,47 \pm 13,73** ^(b)	13,73 \pm 7,52** ^(a)
Porcentaje de ADN en Cola	12,94 \pm 5,35	11,73 \pm 2,93
Células Binucleadas con Micronúcleos	17,91 \pm 9,88* ^(b)	26,67 \pm 12,77* ^(a)

* P < 0,05 **P < 0,01 Kruskal-Wallis: Niveles de Plomo en Sangre, Porcentaje de ADN en Cola y Células Binucleadas con Micronúcleos.

8. DISCUSIÓN

8.1. Caracterización de la muestra poblacional

La muestra poblacional está en su totalidad expuesta ambientalmente a plomo, lo que constituye una diferencia importante al contrastar los resultados aquí obtenidos con los de otros trabajos en los que se evalúan casos (expuestos) y controles (no expuestos). Este estudio se centró en hacer una evaluación transversal de la muestra poblacional, analizando los grados de asociación entre variables sin pretender establecer relaciones de causalidad.

Como se mencionó en el apartado de resultados, con el fin de trabajar con una muestra lo más representativa posible, no se realizaron limitaciones de edad, sexo, contacto con posibles genotóxicos en el ambiente escolar u ocupacional, características de la dieta, hábitos o historia médica. Sin embargo se recogió información de estas variables como posibles factores de confusión sobre la variable dependiente de daño en el material genético, debido a que pueden estar asociadas con esta.

Edad: Es uno de los principales factores de confusión de los estudios en los que se evalúa daño en el ADN. A mayor edad la efectividad del mecanismo de división y reparación del daño en el ADN disminuye, por lo que generalmente las personas adultas presentan incremento en los indicadores de daño (Moller 2006, Hwang y Bowen 2007).

Sexo: El género como tal es un factor contradictorio a la hora de hacer inferencias sobre el daño en el ADN, aunque se creería que ser hombre o mujer no influye en la respuesta del material genético a un xenobiótico, existen estudios que aceptan o rechazan esta teoría. Es por esto que se sigue considerando importante verificar si para un agente específico hay diferencias entre el comportamiento de la variable dependiente para ambos sexos (Moller 2006, Hwang y Bowen 2007).

Contacto actual o previo con posibles agentes genotóxicos: ambiental y ocupacionalmente el ser humano se encuentra rodeado de agentes xenobióticos, con el crecer de la industria son más y

más los compuestos no deseados o secundarios que surgen del procesamiento u obtención de un compuesto principal. En los estudios de biomonitorio es de especial importancia registrar esta variable pues agentes diferentes al de interés pueden alterar la variable dependiente, ya que ejercen daño sobre el material genético de forma independiente o conjunta con el agente estudiado (Valverde y Rojas 2009). El contacto con reactivos químicos, pesticidas, radiaciones e incluso la toma de medicamentos puede afectar la integridad del ADN, ya que son considerados posibles agentes genotóxicos o mutagénicos (Valverde y Rojas 2009).

Dieta: el consumo de agua filtrada y la alimentación balanceada son variables de especial importancia en estudios de exposición a genotóxicos ambientales, ya que muchos de los agentes xenobióticos pueden encontrarse en el agua de consumo diario o en los alimentos. Independientemente de esto, la calidad de la alimentación, es decir, la frecuencia y la cantidad de consumo de grasas, proteínas, carbohidratos, antioxidantes (vitaminas y minerales) y carotenos entre otros, influyen en el daño del ADN. Mientras que los antioxidantes se relacionan con un menor daño, el consumo de enlatados y alimentos con conservantes aumentan el daño en el ADN (Rubio 2004, Hwang y Bowen 2007).

Hábitos: el tabaco, el alcohol y el café son sustancias que a nivel mundial son consumidas con regularidad. Estas tres sustancias han sido evaluadas repetidas veces en distintas poblaciones y son consideradas agentes genotóxicos pues inducen el aumento de estructuras micronucleadas, las rupturas, fragilidades cromosómicas, el intercambio de cromátides hermanas y la migración del ADN de la cabeza hacia la cola de los cometas (Moller 2006, Ayarde 2008, Hwang y Bowen 2007).

Cáncer familiar y problemas de salud: estas variables pueden alterar la susceptibilidad con la que el material genético responde a la interacción con xenobióticos, sobretodo, en cuanto al cáncer familiar se refiere. Es claro que fallas en los mecanismos de reparación del material genético y por tanto susceptibilidad a daños en el mismo, están fuertemente relacionados con la aparición de cáncer, independientemente de sí los individuos están o no expuestos a agentes genotóxicos (Hwang y Bowen 2007).

Aunque ninguno de los factores de confusión, con excepción de la edad y el sexo, presentó diferencias estadísticamente significativas con las variables de daño en el ADN en este estudio, más adelante se discute su presencia o no en los modelos que explican la influencia de estas sobre el porcentaje de ADN en cola y el número de células binucleadas con micronúcleos.

8.2. Biomarcador de Exposición: Niveles de Plomo en Sangre

Los niveles de plomo en sangre constituyen la variable independiente de principal interés del estudio, en el apartado siguiente se hace referencia a ella para evaluar el comportamiento de la variable dependiente de daño en el ADN, de acuerdo a los biomarcadores de efecto analizados.

En esta sección el análisis se enfoca en evaluar como algunos de los factores de confusión tenidos en cuenta para el daño del material genético, también pueden afectar los niveles de plomo en sangre. Como ya se especificó en el marco teórico la edad de los individuos puede influir en la absorción del plomo en el organismo y el agua de consumo puede ser una fuente de exposición ambiental importante.

Al hacer la comparación de los niveles de plomo entre mayores y menores de 15 años se obtuvieron diferencias altamente significativas con una media de 25,58 $\mu\text{g/dL}$ en niños y 17,15 $\mu\text{g/dL}$ en adultos (correlación inversa), lo cual refuerza la afirmación que indica que los menores absorben en mayor proporción el plomo que los adultos, compartiendo las mismas condiciones ambientales. Ahora bien, es de resaltar que en los 19 menores de 15 años evaluados, los niveles de plomo en sangre oscilan entre 14,00 $\mu\text{g/dL}$ y 30,60 $\mu\text{g/dL}$, valores en su totalidad por encima del límite permisible (10 $\mu\text{g/dL}$). En adultos los niveles de plomo se encuentran entre 6,40 $\mu\text{g/dL}$ y 46,20 $\mu\text{g/dL}$, excediendo el valor permisible para población general (25 $\mu\text{g/dL}$) sólo 6 de ellos.

Por lo anterior se confirma el hecho de que los niños son una población vulnerable a la exposición a plomo y es preocupante sobre todo en ellos, los resultados obtenidos para esta variable, pues se encuentra ampliamente reportado que el plomo, incluso a bajos niveles, da lugar a afecciones en el sistema nervioso, el cual es su principal blanco en el organismo, después del sistema óseo (Canfield *et al.* 2003, Chiodo *et al.* 2004).

En este estudio se encontraron niveles de plomo en sangre en la población infantil muy superiores a lo reportado en otras ciudades de nuestro país y Latinoamérica como Cartagena (Colombia) con una media de 5,49 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Olivero *et al.* 2007), Valencia (Venezuela) con 11,6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Rojas *et al.* 2003), Montevideo (Uruguay) con 9,0 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Queirolo *et al.* 2010) o Lima (Perú) 7,1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Naeher *et al.* 2003).

En cuanto al género o sexo de los individuos se encontró diferencias significativas en los niveles de plomo en sangre, siendo estos mayores en los hombre que en las mujeres. No hay un estudio específico que indique que el sexo influye en la absorción o eliminación del plomo como tal, sin embargo esto podría tener relación con el ciclo menstrual femenino, al igual que en algunos trastornos genéticos del metabolismo del hierro como la hemocromatosis (Nussbaum *et al.* 2008). Cabe aclarar que ésta es una inferencia que se hace a partir de los resultados obtenidos y que en todo caso debe ser estudiada o evaluada con mayor rigor.

Finalmente los resultados al comparar las medias de grupos con distintos consumos de agua, filtrada o no, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Esto lleva a pensar que la fuente de exposición al plomo no la constituye con especial importancia el agua de consumo, como se pensó en un principio cuando las autoridades de salud ambiental del departamento del Atlántico, examinaron los niveles de plomo presentes en el cuerpo de agua que lo habitantes usaban para suplir las necesidades básicas. Ahora bien, es de resaltar que el plomo, por ser un metal pesado, no se encuentra normalmente disuelto en agua sino precipitado a manera de sedimento y sólo en pH ácidos aumenta su facultad de disolución (ILA, 2013).

8.3. Biomarcador de Efecto

8.3.1. Asociación del daño en el ADN con los niveles de plomo en sangre

En general en cuanto a daño en el ADN, Vaglenov *et al.* (2001) menciona que valores de plomo en sangre por debajo de 1,20 $\mu\text{M}/\text{L}$ (24,86 $\mu\text{g}/\text{dL}$) ocasionan alteraciones en el ADN, pero valores por encima de éste constituyen un riesgo para el material genético. Del total de individuos evaluados el 28,81% presentaron niveles por encima de los 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$, sin embargo los resultados

obtenidos en este estudio al enfrentar el daño en el ADN con los niveles de plomos en sangre, son deferentes a lo esperado.

En la población estudiada el daño en el ADN (variable dependiente) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las distintas categorías de los niveles de plomo en sangre (variable independiente), opuesto a lo reportado en la literatura por distintos trabajos en los que a mayores niveles de plomo son evidenciados mayores porcentaje de ADN en cola y aumento en la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos; así como aumento en el recuento de intercambio de cromátides hermanas y aberraciones cromosómica, pues la afinidad del plomo hacia los compuestos nitrogenados, pone al ADN como blanco de acción en la formación de aductos (García *et al.* 2010, García *et al.* 2012, Grover *et al.* 2010, Kasuba *et al.* 2001, Palus *et al.* 2003, Shaik y Jamil 2009, Zhijian *et al.* 2006).

De igual forma los índices de correlación obtenidos entre el biomarcador de exposición y los biomarcadores de daño en el ADN no se ajustan a lo esperado. Cuando se evaluó el grado de asociación entre las tres variables de daño en el material genético, evidenciado a través del Ensayo Cometa, se obtuvo una relación prácticamente nula entre las variables. En el caso del daño observado por el test de micronúcleos, los resultados fueron incluso más confusos, pues sugieren una asociación aunque leve, inversamente proporcional, ya que, a menores niveles de plomo en sangre se observa un incremento en la frecuencia de células micronucleadas.

En la revisión realizada por García *et al.* (2010) sobre un compendio de artículos científicos que estudian *in vitro* e *in vivo*, tanto en animales como en humanos, los efectos genotóxicos del plomo, sólo se reporta un estudio de carácter epidemiológico en el que no se encontraron diferencias significativas entre el daño genético en contraste con los niveles de plomo en sangre para el test de Micronúcleos y ningún reporte en el caso de estudios de exposición humana evaluados por el Ensayo Cometa.

La media de porcentaje de ADN en cola obtenido en el grupo de estudio de este trabajo fue de $12,69 \pm 4,96$ y la media de células binucleadas con micronúcleos de $19,69 \pm 11,01$. Al comparar estos resultados con los reportados por otros autores (Tabla 9), se encuentra que los valores aquí

obtenidos son superiores a los de poblaciones controles y ocupacionalmente expuestas a plomo. No se realiza esta comparación con estudios de poblaciones ambientalmente expuestas debido a que en su mayoría son estudios abordados exclusivamente en niños para los que se evalúan niveles de plomo en sangre, más no el posible efecto genotóxico derivado de estos.

Tabla 9. Comparación con otros estudios sobre genotoxicidad del plomo.

	Autores	Controles	Expuestos
Porcentaje de ADN en cola (Ensayo Cometa)	Kasuba <i>et al.</i> (2011)	1,54 ± 0,14	3,21 ± 0,73
	García <i>et al.</i> (2012)	3,75 ± 0,19	5,72 ± 1,85
	Zhijian <i>et al.</i> (2006)	1,92 ± 0,31	7,76 ± 1,23
Células binucleadas con micronúcleos (Test de Micronúcleos)	Palus <i>et al.</i> (2003)	6,29 ± 3,54	16,43 ± 4,07
	Grover <i>et al.</i> (2010)	3,17 ± 0,71	6,46 ± 0,94
	Shaik y Jamil 2009	1,08 ± 0,15	2,90 ± 0,192

Ante este panorama y teniendo en cuenta que sí hay evidencia de daño en el material genético, no es posible explicar las alteraciones observadas en este, por la presencia de los niveles de plomo en sangre; lo cual lleva a inferir que existen otros factores o variables que afectan la integridad del ADN presentes en el ambiente de la muestra poblacional evaluada que no han sido considerados o incluso descubiertos.

Aunque el plomo tiene un metabolismo escaso, otros parámetros de su toxicocinética como su distribución, haciendo especial énfasis en la vida media en sangre, y los perfiles de excreción, podrían sugerir y sustentar algunas de las incongruencias obtenidas al comparar el daño genético con los niveles de exposición analizados de este trabajo.

En primer lugar es importante destacar en este punto que el plomo es un elemento que se mantiene en sangre entre 7 - 35 días (Rubio *et al.* 2004, Valdivia 2005) y este estudio fue posible realizarlo aproximadamente 8 meses después de la primera alerta de plomo en la población. No se tiene conocimiento desde cuando los habitantes de la vereda La Bonga han estado expuestos al metal ni existe un registro histórico que constate que la exposición se mantuvo constante hasta el momento de la toma de muestra. Por lo cual, no necesariamente el daño evidenciado es el

resultado de la asociación con los niveles de plomo en sangre actuales, sino que pueden reflejar el daño fijado por exposiciones anteriores más el daño reciente ocasionado por exposiciones nuevas.

Teniendo en cuenta que el Ensayo Cometa permite evaluar el daño inmediato o reciente efectuado sobre el ADN de una célula sin importar los fenómenos de pérdida o ganancia del material y el test de Micronúcleos permite examinar el daño fijado en las células por la suma de exposiciones antiguas y recientes (Cossio *et al.* 2004, Fenech 2000, Liao *et al.* 2009, Martino *et al.* 2003), el hecho de que no se detecte correlación entre los biomarcadores de efecto analizados a través del ensayo cometa y el test de micronúcleos refuerza la posibilidad de inferir que la muestra poblacional evaluada no ha estado expuesta constantemente al metal, bien sea por que la exposición ha sido fluctuante o porque disminuyó después de las medidas preventivas tomadas por los entes reguladores del caso en el departamento del Atlántico.

En segundo lugar, es relevante mencionar que en este trabajo no se recogió ni análisis ningún tipo de información referente a los perfiles de excreción de plomo en la población, ni en orina ni en heces fecales, siendo éstas las principales vías de eliminación del plomo. Si esta información se hubiese obtenido se podría evaluar si bajo grados de daño en el ADN similares existe asociación con menores o mayores perfiles de excreción. Esto teniendo en cuenta que a menores perfiles de excreción hay mayor bioacumulación del metal en el organismo (Rubio *et al.* 2004, Valdivia 2005).

Adicional a lo anterior, también es importante mencionar que los niveles de plomo en sangre no son una medida absoluta de la presencia del metal en el organismo, datos referentes a sus niveles en el sistema óseo, especialmente en la epífisis de los huesos largos, son desconocidos para la población de estudio y pueden influir en el daño del material genético de las células sanguíneas, más teniendo en cuenta que estas provienen de la médula ósea (Rubio *et al.* 2004, Valdivia 2005).

8.3.2. Asociación del daño en el ADN con la edad de los individuos

Al hacer la comparación entre grupos de menores y mayores de 15 años, todas las variables de daño evaluadas, con excepción del porcentaje de ADN en cola, presentaron mayor alteración en

el material genético de los individuos mayores de 15 años. Sin embargo cabe destacar que las diferencias solo fueron significativas para el número de células binucleadas con micronúcleos.

Cuando se realizó la correlación entre la variable edad y cada uno de los biomarcadores de efecto: longitud de cola, porcentaje de ADN en cola, momento de cola y células binucleadas con micronúcleos; se obtuvo asociaciones leves en las variables obtenidas por el ensayo cometa y una asociación más fuerte para la variables estudiada del test de micronúcleos. Las asociaciones en todos los casos fueron positivas, lo cual indica un comportamiento directamente proporcional, es decir, a mayor edad mayor es el daño del material genético. De cualquier forma es relevante mencionar que el grado de relación existente entre las variables no es tan fuerte como para considerar que el daño evidenciado en el ADN este principalmente asociado a la edad (como se presentó en la Tabla 5).

Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, pues es de amplio conocimiento que a mayor edad biológica de los individuos, disminuye la eficacia de los mecanismos de reparación del ADN de forma conjunto con la efectividad de los mecanismos de disyunción en la división celular, por tanto a mayor edad el material hereditario es más vulnerable y susceptible a proceso de mutagénesis, incluso sin tener en cuenta exposiciones a agentes genotóxicos (Mudry y Carballo 2006, Moller 2006, Hwang y Bowen 2007).

8.3.3. Significancia del daño en el ADN según el sexo de los individuos

Aunque no se presentaron diferencias significativas en la longitud cola, el porcentaje de ADN en cola ni el momento de cola según el sexo de los individuos, si existen diferencia significativas en el número de células binucleadas micronucleadas entre hombre y mujeres, habiendo más células afectadas en la población femenina.

Estos resultados en contraste con los obtenidos al comparar la variable sexo con los niveles de plomo en sangre, sugieren que las mujeres incluso teniendo menores niveles de plomo sanguíneos tienen mayores daños en el material genético. No hay estudios que indiquen que el plomo afecte más a un género que a otro y partiendo del hecho de que no existen diferencias

entre la constitución del material genético entre hombres y mujeres, además de no haber ningún tipo de asociación entre el daño evidenciado y los niveles de plomo en sangre encontrados en este trabajo, este planteamiento no tiene mayor importancia.

8.3.4. Análisis de los factores de confusión

Como se planteó inicialmente, nuestros ambientes actuales están llenos de potenciales agentes genotóxicos, por lo cual los estudios de biomonitorización adquieren cada día mayor relevancia. En estos es indispensable enfrentar un biomarcador de exposición y un biomarcador de efecto, al mismo tiempo que tener en cuenta los posibles factores de confusión que puedan alterar la relación entre ellos.

Como ya se detalló en el apartado del análisis de la caracterización de la muestra poblacional, cada uno de los factores evaluados en la encuesta tienen una razón de ser y permiten establecer el modelo que explica los resultados de la variable dependiente de daño en el ADN y por tanto los factores o covariables que mayor peso ejercen en la relación.

Se llevó a cabo dos modelos de forma independiente, uno para el porcentaje de daño de ADN en cola y otro para el número de células binucleadas con micronúcleos. Aunque ambos modelos fueron estadísticamente significativos explican solo el 14,9% y el 37,7% del comportamiento de la variable de daño respectivamente. En ambos fue incluida la variable independiente de niveles de plomo en sangre, incluso sin haber mostrado significancia, debido a la importancia de esta en el estudio.

La edad es una de las variables que fue significativa en ambos modelos y que como se ha discutido con anterioridad concuerda con lo reportado por otros autores. Factores como el cáncer familiar y el consumo de alcohol resultaron significantes para el porcentaje de ADN en cola y las células binucleadas con micronúcleos, respectivamente.

Finalmente, después de haber analizado los factores de confusión, es claro que el daño observado en el material genético de la muestra poblacional de la vereda La Bonga no puede asociarse

principalmente o con mayor peso ni a la variable independiente niveles de plomo en sangre, ni a las covariables o factores de confusión tenidos en cuenta. Por tanto una vez más los datos sugieren el hecho de que otro u otros agentes genotóxicos pueden estar afectando la integridad del material genético.

8.4. Biomarcador de Susceptibilidad

Se ha sugerido que la presencia del polimorfismo del gen ALAD está relacionada con mayores niveles de plomo en sangre, puesto que la variante con la transversión tiene mayor afinidad por el plomo que la variante salvaje (Mijares *et al.* 2006). Indirectamente se infiere que a menor afinidad por el plomo las células estarían menos expuestas al metal y el daño en el ADN sería menor (Duydu y Süzen 2003).

Por otra parte, algunos autores han mencionado que los diferentes genotipos de ALAD no muestran asociación con los niveles de plomo en sangre en exposiciones ambientales (estudios en niños) u ocupacionales (estudios en trabajadores expuestos) y que los niveles de plomo en sangre pueden ser bajos o elevados sin importar el genotipo (Chen *et al.* 2008, Shaik y Jamil 2009, Sobin *et al.* 2009).

Duydu y Süzen (2003) han sido los únicos autores que en un estudio anterior evaluaron al igual que en el presente trabajo biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad en una misma población. A diferencia de este trabajo, Duydu y Süzen (2003) analizaron un grupo de trabajadores ocupacionalmente expuestos y escogieron como biomarcador de daño en el ADN el incremento en el intercambio de cromátides hermanas, obteniendo mayores niveles de plomo en individuos con genotipo polimórfico y mayores alteraciones en el ADN en individuos sin el polimorfismo.

Contrario a lo anterior, en este trabajo los niveles de plomo en sangre para los individuos sin el polimorfismo son mayores que los presentes en la población que tiene el polimorfismo, sin embargo el daño se comporta a la inversa, es decir, es menor en la variante salvaje ($ALAD_{1-1}$) incluso teniendo mayores niveles de plomo y mayor en la variante mutada ($ALAD_{1-2/2-2}$) con

menores niveles de plomo. Estos resultados deben ser analizados con cuidado, pues aunque en principio sugieran que no tener el polimorfismo constituye un factor protector, la inferencia pierde relevancia, una vez más, al reiterar que los niveles de plomo encontrados no se asocian al daño genético.

Cabe aclarar que el gen ALAD es codificante y el resultado de su transcrito es una enzima con el mismo nombre (Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa), la cual está vinculada en la biosíntesis del grupo heme y las porfirinas. La presencia o no del polimorfismo en nada afecta el desarrollo normal de su actividad biológica, a menos que el plomo este presente inhibiendo su función (Pérez *et al.* 2004).

El presente trabajo concuerda con los estudios realizados a nivel mundial en que el genotipo más frecuente para el gen ALAD es la variante sin el polimorfismo (ALAD₁₋₁) y la menos frecuente la variante con el polimorfismo (ALAD_{1-2/2-2}). La variante mutada o polimórfica en su forma homocigota (ALAD₂₋₂) es escasamente encontrada e incluso se ha reportado nula para algunas muestras poblacionales (Mijares *et al.* 2006, Moreira 2012).

9. CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo se pueden establecer siete ítems con claridad:

La muestra poblacional de la vereda La Bonga, Atlántico Colombia, está expuesta a plomo de forma ambiental y los niños constituyen una población altamente vulnerable, pues en su totalidad presentan niveles de plomo en sangre por encima del límite permitido de 10 μ g/dL.

Hay evidencia de daño en el material genético del grupo poblacional estudiado. Las alteraciones son soportadas cuantitativa y cualitativamente por la migración del ADN de la cabeza del cometa a la cola y la pérdida del material hereditario del núcleo principal con la conformación de micronúcleos.

No se encontró relación entre los niveles de plomo en sangre y el daño en el ADN evidenciado en la población evaluada. Los niveles de daño del material genético detectados por medio del ensayo cometa versión alcalina y el test de micronúcleos no están correlacionados con los niveles de plomo en sangre encontrados. Se infiere la presencia de otro u otros agentes genotóxicos en la población.

Para próximos estudios en esta población se considera importante involucrar, en lo posible, un grupo control que permita dilucidar si hay mayor presencia de alteraciones en el material hereditario al pertenecer a una población ambientalmente expuesta en contraste con una no expuesta.

El polimorfismo ALAD se distribuye de forma sesgada entre mayores y menores niveles de plomo en sangre, así como entre menor y mayor daño en el ADN. El hecho de que a mayores niveles de plomo para la variante sin polimorfismo existan menores evidencias de alteración genética, sugiere un factor protector que debe ser verificado en estudios posteriores.

La edad fue la única covariable que mostró relevancia en el estudio y reveló el patrón esperado según la literatura consultada, tanto cuando se le comparo con los niveles de plomo en sangre, como cuando se asoció con el grado de daño del ADN.

Se resalta el hallazgo de mayor presencia de niveles de plomo sanguíneos en hombres en contraste con el hallado en mujeres, aun cuando estos presentan menores daños en el ADN que la muestra poblacional femenina.

10. REFERENCIAS CITADAS

- Arencibia D.; Rosario L. 2009. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. Revista de toxicología en línea, N° 20, Sep., 24-41.
- Ayarde B, Cuti M, Ascarrunz M, Tirado N. 2008. Efecto genotóxico del consumo de tabaco en estudiantes de la Facultad de Medicina de la UMSA que habitan en la altura. Biofarbo 16.
- Canfield R, Henderson C, Slechta D, Cox C, Jusko T, Lanphear B. 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 μg per deciliter. The New England Journal of Medicine 348(16): 1517– 26.
- Chen Y, Zhao J, Liu J, Cui J, Li L, Tian W. 2008. Lack of association of δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with blood lead levels in environmentally exposed children of Uyghur and Han populations. Acta Pediátrica 97: 1717–1720.
- Chiodo L, Jacobson S, Jacobson J. 2004. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. Neurotoxicology and Teratology 26(3):359–71.
- Cossio, M.; Gonzalez, Y.; García, J.; Prieto E. 2004. Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. Acta Farmacéutica Bonaerense 23 (3): 277-84.
- Duydu Y, Sinan H. 2003. Influence of alpha-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) and the number of high-frequency cells (HFCs) in lymphocytes from lead-exposed workers. Mutation Research 540: 79-88.
- Duydu Y, Süzen H, Aydın A, Cander O, Uysal H, Isimer A, Vural N. 2001. Correlation Between Lead Exposure Indicators and Sister Chromatid Exchange (SCE) Frequencies in Lymphocytes from Inorganic Lead Exposed Workers. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 41: 241–246.
- Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339: 37-59.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker R, Mann M, Mersch V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. Mutation Research 566: 209–229.

- Fenech M. 1993. The cytokinesis - block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives* 101: 101–107.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455:81-95.
- Flores R, Rico E, Núñez J, García E, Carrizales L, Ilizaliturri C, Díaz F. 2012. Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud pública de México* vol. 54, no. 4, julio-agosto.
- García J, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International* 36:623–636.
- García J, Roma J, Vilares M, Pinto R, Prista J, Teixeira J, Mayan O, Conde J, Pingarilho M, Gaspar J, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. 2012. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environment International* 43: 29–36.
- Gillis B, Arbieva Z, Gavin I. 2012. Analysis of lead toxicity in human cells. *BMC Genomics* 13:344.
- González E, González E, Bedolla C, Arrollo E, Manzanares E. 2008. Niveles de plomo en sangre y factores de riesgo por envenenamiento de plomo en niños mexicanos. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia* N.º 43. pp. 114-119. Marzo.
- Grover P, Rekhadevi P, Danadevi K, Vuyyuri S, Mahboob M, Rahman M. 2010. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213: 99–106.
- Hammond P. 1977. Exposure of humans to lead. *Alln. The Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 17: 197-214.
- Hwang E, Bowen P. 2007. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 27–50.
- ILA. International Lead Association. 2013. Disponible en: <<http://www.ila-lead.org/>> Consultado: 14 de Abril de 2013.
- Kasuba V, Rozgaj R, MiliT M, LeljeqiT D, Kopjar N, Pizent A, KljakoviT Z, Jazbec A. 2011. Evaluation of genotoxic effects of lead in pottery-glaze workers using micronucleus assay, alkaline comet assay and DNA diffusion assay. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 85(7): 807-18.

- Lanphear B, Dietrich K, Berger O. 2003. Prevention of Lead Toxicity in US Children. *Ambulatory Pediatrics* Volume 3, Number 1: 27 – 36.
- Liao W, McNutt M, Zhu W. 2009. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48: 46–53.
- Maleronka M, Klafke A, Nascimento P, Gouveia N. 2012. Environmental lead poisoning among children in Porto Alegre state, Southern Brazil. *Revista de Saúde Pública* 46(2):226-33.
- Martino M, Viégas J, Roth D. 2003. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genetics and Molecular Research* 2(4): 410-417.
- Menezes J, Freitas G, Rodrigues C. 2012. Determinants of lead exposure in children on the outskirts of Salvador, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 184:2593–2603.
- Mijares A, López P, Rosado J, Cebrián A, Vera E, Alatorre J, Quintanilla M, Rojas A, Stoltzfus R, Cebrián M, García G. 2006. Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Its Relationship with Blood Lead and Zinc Protoporphyrin Levels in Lead-Exposed Children Living in a Smelter Community in Northern Mexico. *Toxicology Mechanisms and Methods* 16: 41–47.
- Mohd A. 2007. Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical Nutrition* 26, 400–408.
- Moller P. 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research* 612: 84–104.
- Moreira A, Almeida A, Costa S, Laffon B, García J, Pásaro E, Méndez J, Teixeira J. 2012. Genotyping an ALAD Polymorphism with Real-Time PCR in Two Populations from the Iberian Peninsula. *Biochemical Genetics* 50: 560–564.
- Mudry M, Carballo M. 2006. *Genética Toxicológica*. Editorial. De los Cuatro Vientos Primera Edición. Buenos Aires.
- Naeher L, Rubin C, Hernandez M, Noonan G, Paschal D, Narciso J. 2003. Use of isotope ratios to identify sources contributing to pediatric lead poisoning in Peru. *Archives of Environmental Health* 58: 579–89.
- Needleman H. 1981. The health effects of low level exposure to lead. *Annual Review of Public Health* 2:277-98
- Needleman H. 2004. Lead poisoning. *Annual Review of Medicine* 55:209–22

- Nichani V, Li W, Smith M, Noonan G, Kulkarni M, Kodavor M, Naeher L. 2006. Blood lead levels in children after phase-out of leaded gasoline in Bombay, India. *Science of the Total Environment* 363: 95– 106.
- Nordberg G. Metales: propiedades químicas y toxicidad. 1998. En Stellman J. Cuarta Edición. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo. Madrid, España: Editorial del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales; p. 63.1-63.75. (Vol 2).
- Nussbaum, R.; McLnnes, R.; Willard, H. 2008. *Genética en Medicina*. Elsevier Masson. Séptima edición. España. 584 pp.
- Olivero J, Duarte D, Echenique M, Guette J, Johnson B, Parsons P. 2007. Blood lead levels in children aged 5–9 years living in Cartagena, Colombia. *Science of the Total Environment* 372: 707–716.
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan A, Nilsson R. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research* 540: 19–28.
- Pasha A, Jamila K. 2009. Individual susceptibility and genotoxicity in workers exposed to hazardous materials like lead. *Journal of Hazardous Materials* 168:918–924.
- Pérez F, Ruz M, Morán M, Olivares M, Rebolledo A, Codoceo J, Sepuúlveda V, Jenkin A, Santos J, Fontanellas A. 2004. Association Between Aminolevulinate Dehydrase Genotypes and Blood Lead Levels in Children from a Lead-Contaminated Area in Antofagasta, Chile. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 276-280.
- Poreba R, Gac P, Poreba M, Andrzejaka R. 2011. Environmental and occupational exposure to lead as a potential risk factor for cardiovascular disease. *Environmental toxicology and pharmacology* 31: 267–277.
- Queirolo E, Ettinger A, Stoltzfus R, Kordas K. 2010. Association of Anemia, Child and Family Characteristics With Elevated Blood Lead Concentrations in Preschool Children From Montevideo, Uruguay. *Archives of Environmental & Occupational Health*, Vol. 65, No. 2.
- Ramírez A. 2005. El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *Anales de la Facultad de Medicina* 66: 57-70.
- Ramírez A. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina* 67: 49-58.

- Recio R., Valdez C, Adame B, Gurrola A. 2012. Surveillance of elevated blood lead levels in children in Torreon, Coahuila, Mexico, 1998–2010. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215: 507– 513.
- Rojas M, Espinosa C, Seijas D. 2003. Association between blood lead and sociodemographic parameters among children. *Revista de Saúde Pública* 37: 503–509.
- Rubio C, Gutierrez A, Martín R, Revert C, Lozano G, Hardisson A. 2004. El plomo como contaminante alimentario. *Revista de Toxicología*. 21: 72- 80.
- Shaik A, Jamil K. 2009. Individual susceptibility and genotoxicity in workers exposed to hazardous materials like lead. *Journal of Hazardous Materials* 168: 918–924.
- Shaik A, Jamil K. 2008. A study on the ALAD gene polymorphisms associated with lead exposure. *Toxicology and Industrial Health* 24: 501–506.
- Silbergeld E. 1997. Preventing lead poisoning in children. *Annu. Rev. Public Health* 18:187–210.
- Silbergeld E. 2003. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research* 533: 121–133.
- Sobin C, Gutierrez M, Alterio H. 2009. Polymorphisms of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) and peptidetransporter 2 (PEPT2) genes in children with low-level lead exposure. *NeuroToxicology* 30: 881–887.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole – blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 341: 169 – 184.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. 2000. Single cell gel/comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206–221.
- Vaglenov A, Creus A, Laltchev S, Petkova V, Pavlova S, Marcos R. 2001. Occupational Exposure to Lead and Induction of Genetic Damage. *Environmental Health Perspectives* Vol.109 No. 3.
- Valdivia M. 2005. Intoxicación por plomo. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna* 18(1): 22-27.
- Valverde M, Rojas E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 681: 93–109.

- Wozniak K, Blasiak J. 2003. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA–protein cross-links. *Mutation Research* 535:127–139.
- Zhijian C, Jianlin L, Shijie C, Wei Z, Weib W, Lifen L, Hongping D, Jiliang H. 2006. Evaluating the genotoxic effects of workers exposed to lead using micronucleus assay, comet assay and TCR gene mutation test. *Toxicology* 223: 219–226.
- Zúñiga L. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis. 243 pp.

10.1. Literatura Gris

- Gobernación del Atlántico – página web. 2013. Gobernación confirma contaminación por plomo en vereda la Bonga de Malambo. Publicado el 30 de Enero en: <http://www.atlantico.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=2206:contaminacion-por-plomo-en-la-vereda-la-bonga-de-malambo&catid=265:eventos-de-salud&Itemid=846>.
- El Heraldo – página web. 2012. Hallan plomo en pozo que alimenta a La Bonga, en Malambo. Publicado el 1 de Noviembre en: <<http://www.elheraldo.co/local/hallan-plomo-en-pozo-que-alimenta-a-la-bonga-en-malambo-87725>>.
- El Universal – página web. 2012. Detectan plomo en agua de Malambo. Publicado el 1 de Noviembre en: <<http://www.eluniversal.com.co/cartagena/nacional/detectan-plomo-en-agua-de-malambo-96847>>.
- Sitio oficial del municipio de Malambo. 2013. Mañana reunión en la Vereda la Bonga para tratar tema de las Fundidoras de plomo. Publicado el 31 de Enero en: <<http://www.malambo-atlantico.gov.co/noticias.shtml?apc=Cnxx-1-&x=2825592>>.
- ZonaCero – periódico local. 2013. CRA suspendió actividades de dos fundidoras de plomo en Malambo. Publicado el 31 de Enero en: <<http://zonacero.info/index.php/noticia-principal/33476-cra-suspendio-actividades-de-dos-fundidoras-de-plomo-en-malambo>>.