

# Correlación entre la concentración urinaria de malondialdehído y daño en el ADN de personas expuestas a mercurio

Paula Andrea Castaño Arias<sup>1</sup>, Claudia Lucía Arroyave Hoyos<sup>2</sup>, Paola Andrea Acevedo Toro<sup>3</sup>, Gonzalo Vásquez Palacio<sup>4</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** determinar si la magnitud del daño en el ADN se correlaciona con la concentración de malondialdehído (MDA) urinario en individuos expuestos ocupacionalmente a mercurio y en controles no expuestos.

**Metodología:** se evaluaron 64 historias clínicas (32 de expuestos y 32 de controles) en los que se determinó la concentración urinaria de MDA y se hizo el ensayo cometa para detectar el porcentaje de ADN en la cola. Se compararon las concentraciones de MDA y las alteraciones en el cometa entre los grupos y se hizo una correlación entre estas variables.

**Resultados:** hubo mayores concentraciones de MDA en los expuestos que en los controles (mediana 1,28 frente a 0,51  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente), así como mayores daños en el ensayo cometa (mediana del porcentaje de ADN en cola: 27,37 frente a 0,31, respectivamente). Hubo mala correlación entre el MDA en la orina y el daño genético ( $r < 0,11$ ).

**Conclusión:** no se pudo demostrar que a mayores concentraciones de MDA en la orina se presentara mayor daño genético, pero sí hubo mayor daño del ADN y concentraciones más altas de MDA en los expuestos que en los controles.

## PALABRAS CLAVE

*ADN; Ensayo Cometa; Genotoxicidad; Malondialdehído; Mercurio; Minería; Radicales Libres*

## SUMMARY

**Correlation between urinary concentration of malondialdehyde and DNA damage in people exposed to mercury**

**Objective:** To determine whether the extent of DNA damage correlates with the concentration of malondialdehyde (MDA) in urine of individuals occupationally exposed to mercury.

---

<sup>1</sup> Médica, Toxicóloga Clínica, IPS Univeristaria, Universidad de Antioquia, Clínica León XIII, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Docente, Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Docente, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Coordinador de la Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Paula Andrea Castaño Arias; paulaandrea216@gmail.com

Recibido: enero 29 de 2013

Aceptado: septiembre 26 de 2013

**Methods:** We evaluated 64 medical records (32 from exposed persons and 32 from unexposed controls). In both groups we analyzed the comet assay data (percentage of DNA in the tail), as well as the levels of MDA and mercury in the urine. We compared the MDA concentrations, and the changes in the comet assay between the groups and the correlation between these variables.

**Results:** MDA concentrations were higher in exposed persons than in controls (median 1.28 vs. 0.51  $\mu\text{mol/L}$ , respectively), and a corresponding damage was observed in the comet assay (median of DNA percentage in tail: 27.37 vs. 0.31, respectively). However, we found poor correlation between urinary MDA and genetic damage ( $r < 0.11$ ).

**Conclusion:** No evidence was obtained indicating that higher concentrations of MDA in urine were related to additional genetic damage, but there were more DNA damage and higher concentrations of MDA in individuals occupationally exposed to mercury compared with unexposed people.

## KEY WORDS

*Comet Assay; DNA; Free Radicals; Genotoxicity; Malondialdehyde; Mercury; Mining*

## INTRODUCCIÓN

Antioquia es el primer departamento productor de oro de Colombia con dos regiones claramente definidas: el Bajo Cauca y el Nordeste (1); uno de los problemas relacionados con la explotación minera de este metal precioso es su extracción con mercurio metálico, sustancia altamente tóxica para los humanos y con gran absorción por la vía respiratoria (más del 80%) (2), a la cual están expuestos ocupacionalmente por tiempo prolongado los trabajadores de la minería y de la compraventa de oro, estos últimos porque en los sitios de compraventa se quema el oro lo que hace que se emitan vapores de mercurio que entran por la vía respiratoria; por esa razón, tales trabajadores se convierten en una población susceptible de contaminarse o intoxicarse con este metal pesado. Amalfi es un municipio del Nordeste Antioqueño, donde la explotación artesanal del oro es una actividad económica importante, lo que explica la exposición ocupacional a mercurio a largo plazo en esta región (3).

Varios estudios *in vitro* y en humanos (4-21) evidencian que el mercurio metálico está asociado de forma directa o indirecta con alteraciones genotóxicas; se entiende como genotóxica la capacidad de una sustancia de producir daño sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN). De Flora y colaboradores, en 1994 (22), determinaron el potencial genotóxico de esta forma de mercurio en seres humanos usando una prueba conocida como el *ensayo cometa*, que detecta el daño en el ADN de células individuales. El principio básico de esta prueba es como sigue: cuando hay daño en el ADN (ya sea por ruptura de cadenas sencillas o dobles, la presencia de sitios lábiles al álcali o entrecruzamiento ADN-ADN o ADN-proteínas) este migra en un campo eléctrico dando la apariencia de un cometa, con cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección al ánodo), es decir, cuanto mayor sea la longitud de la cola y más alto el porcentaje de ADN en ella, mayor es el daño genético. En el trabajo de estos autores dicho método mostró que la fragmentación del ADN (longitud de la cola, porcentaje de ADN en la cola y momento de la cola) era dos veces más alta en los linfocitos de los mineros que en los de controles no expuestos a mercurio. Otros estudios han corroborado estos hallazgos (23,24).

Se cree que la genotoxicidad se deba a la capacidad que tiene el mercurio de aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres, reflejando un acrecentamiento del estrés oxidativo (25). Dicho estrés se refiere a un estado de las células en el que hay desequilibrio entre la oxidación y la reducción celulares, es decir, entre las sustancias oxidantes y antioxidantes que se generan por excesiva producción de ERO y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo que lleva a daño celular. Los radicales libres interactúan con macromoléculas produciendo una reacción conocida como peroxidación lipídica y de esta interacción macromolécula-radical se producen metabolitos como el malondialdehído (MDA), que se puede detectar en muestras biológicas; un aumento de este metabolito implica indirectamente un mayor estrés oxidativo (26). En investigaciones *in vitro* y en animales expuestos experimentalmente a dicho metal se ha encontrado mayor estrés oxidativo al compararlos con controles (27,28). En humanos se ha encontrado que las concentraciones de MDA están significativamente más elevadas en mineros

crónicamente expuestos al mercurio que en controles (29). Aunque se sabe que hay un aumento en la producción de radicales libres en individuos expuestos, se ignora si esta elevación tiene impacto en el daño genético *in vivo*, es decir, si a mayor estrés oxidativo hay mayor magnitud del daño genético en personas expuestas ocupacionalmente al mercurio. Por eso, el objetivo de este estudio fue buscar si existe correlación entre la peroxidación lipídica medida con los niveles urinarios de MDA y la presencia de daño en el ADN medido con el ensayo cometa, en individuos expuestos ocupacionalmente al mercurio frente a controles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio:** se hizo un estudio de corte transversal; se evaluaron individuos expuestos ocupacionalmente a mercurio y se compararon con controles (no expuestos al metal).

**Criterios de inclusión:** ser hombre mayor de 18 años y menor de 60 años. Para el caso de los expuestos se requería tener actividad minera o haber trabajado en la compraventa de oro en el municipio de Amalfi por más de un año. Los controles se incluían si habían vivido en Amalfi por más de un año sin actividad ocupacional relacionada con el mercurio.

**Criterios de exclusión:** individuos con incapacidad para decidir, creatinina por encima de 1,5 mg/dL, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) grave, individuos en quimioterapia para cáncer, viabilidad de las muestras biológicas para el estudio cometa menor del 80% o no tener informe del MDA urinario.

**Procedimiento:** como unidad de análisis se tomaron los registros de bases de datos de investigaciones previas efectuadas en el municipio de Amalfi (Antioquia) entre noviembre del 2008 y noviembre del 2009 por los grupos de investigación de Toxicología y de Genética Médica (GENMED), ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Para estas investigaciones previas, se parearon los grupos de individuos (expuestos y referentes) de acuerdo con la ingesta de alcohol, el consumo de tabaco y la edad ( $\pm 5$  años de diferencia) con el fin de que estas variables no fueran factores de confusión en el momento de los análisis; posteriormente se les hizo una historia clínica completa que se consignó en un formulario previamente diseñado, se tomaron muestras de orina

de 24 horas para determinar las concentraciones urinarias de mercurio y se guardó una alícuota de orina de cada participante a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriores estudios de MDA; también se tomaron muestras de sangre para el estudio cometa y se midieron las concentraciones séricas de creatinina.

A estas unidades de análisis se les aplicaron los criterios de inclusión y exclusión. Se tomaron los datos correspondientes a la edad, el tiempo de exposición, la concentración de mercurio en la orina de 24 horas, el consumo de alcohol y de cigarrillo, los antecedentes personales de enfermedades tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia y artritis, los tratamientos en curso en el momento de la toma de las muestras, la viabilidad celular de las muestras de sangre y los resultados del ensayo cometa (mediana del porcentaje de ADN en la cola). También se tomó el dato de la concentración urinaria de MDA.

Se hicieron los análisis de mercurio en orina de 24 horas mediante la técnica de absorción atómica de vapor frío, y el MDA en orina de 24 horas, por cromatografía líquida (HPLC) con la técnica de adición de estándares. El ensayo cometa alcalino se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Tice y colaboradores (30) con las siguientes modificaciones: se embebieron células mononucleares en 80  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión puestos en placas portaobjetos previamente tratadas con agarosa de punto de fusión normal; posteriormente se adicionó otra capa de 80  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión a las placas que contenían los mononucleares embebidos. Las placas se llevaron a solución de lisis por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% de lauril-sarcosinato de sodio, 10 mM Tris) con 10% de DMSO y 1% de Triton X-100. Después del período de lisis, las placas se transfirieron a la cámara de electroforesis (*Comet assay tank<sup>®</sup>*) y se sumergieron en buffer frío y fresco a un pH por encima de 13 por 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN (1 mM EDTA, 300 mM NaOH). La electroforesis se llevó a cabo por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (25 V, 300 mA and 0,5 V/cm). Para cada una de las tandas de electroforesis se utilizaron como control negativo las células de un individuo sano no expuesto a mercurio; y como control positivo, células tratadas con 50 mM de peróxido de hidrógeno. Después de la electroforesis, las placas se lavaron con 0,4 M de buffer Tris a pH 7,5 (3 veces por 5 minutos).

Todos los pasos, desde la lisis hasta la neutralización, se hicieron en la oscuridad o con luz tenue indirecta para evitar cualquier daño adicional inducido por la luz. Después de la neutralización, se colorearon las placas con 40  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en agua destilada) y se pusieron en cajas de colección protegidas de la luz. Los cometas se visualizaron en microscopio de fluorescencia AxioScop2 Zeiss® con un aumento de 400x utilizando el filtro simple Zeiss Texas red con una longitud de excitación de 510 nm y una emisión de 595 nm. El microscopio se acopló a la cámara AxioCam MRc Zeiss® y se fotografió un total de 100 cometas por caso. Para el análisis de los cometas se utilizó el *software* CASP (*Comet Assay Software Project*) (<http://www.casp.sourceforge.net>) de acceso público y, con el fin de evitar el sesgo por el observador, se hizo un análisis "ciego" de todos los casos. Para cada individuo se prepararon dos placas y se analizaron 50 células por placa, para un total de 100 cometas analizados por caso. Para cuantificar el daño en el ADN, se midió el porcentaje de ADN en la cola (% TADN), el cual se calculó con el *software* con base en la siguiente fórmula:

- % TADN:  $100 \times \frac{\text{suma de intensidades de todos los puntos de la cola (ADNT)}}{\text{suma de intensidades de todos los puntos de la cabeza (ADNH) + de la cola}}$

Estos datos posteriormente se ingresaron a Excel y se hizo el cruce de variables en SPSS versión 18. Este estudio fue aprobado previamente por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

**Tamaño de la muestra:** se contó con una muestra de 104 historias a las cuales se les aplicaron los criterios de inclusión y exclusión mencionados y se verificó que los datos estuviesen completos; considerando un poder del 80% y un error  $\alpha$  de 0,05 de una cola, se calculó que la mínima diferencia de medias del MDA que se puede detectar entre los expuestos y los no expuestos es de 0,15  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , de acuerdo con el estudio de Kobal y colaboradores (29). Para este cálculo se utilizó el programa Epidat 3.0.

No se dispone de trabajos previos que permitan calcular el tamaño de la muestra para este estudio, específicamente en lo que tiene que ver con la correlación.

**Análisis estadístico:** para cada una de las variables cualitativas se hizo la distribución de las frecuencias absolutas y relativas; para las variables continuas se aplicaron el test de normalidad de Shapiro Wilks y gráficos Q-Q de normalidad. Como las variables no mostraron distribución normal (Shapiro Wilks:  $p < 0,05$ ), los resultados se presentan con la mediana y su respectivo rango intercuartil, y para efectos comparativos con otros estudios se presentan las medias con su desviación estándar (SE). Para la comparación de las características basales categóricas de los expuestos frente a los controles se aplicó el Chi<sup>2</sup> y para las variables continuas se utilizó la prueba de Wilcoxon. El análisis de correlación entre los biomarcadores de genotoxicidad (% ADN cola) y las concentraciones de mercurio y MDA en la orina se hizo mediante la prueba no paramétrica de correlación de Spearman. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Del total de 104 historias clínicas disponibles para el estudio (52 individuos expuestos ocupacionalmente a mercurio y 52 controles), solo 64 cumplieron con los criterios de elegibilidad (32 en cada brazo). Las razones para la exclusión fueron las siguientes: edad por fuera del rango (más de 60 años: un caso) y falta de información sobre las mediciones de mercurio o MDA en la orina (19 casos). Como el estudio fue pareado, se hizo necesario también dejar por fuera del análisis a la respectiva pareja de quien no cumplía con los criterios de elegibilidad (20 en total).

La edad de los individuos estuvo comprendida entre 21 y 59 años con una mediana de 42,5 años. Aunque el consumo de cigarrillo varió entre 0 y más de 30 diarios, el 84,4% de la población estudiada negó tener este hábito. De otro lado, se encontró que el consumo de alcohol estuvo entre 0 y más de 1.000 gramos semanales, pero la mayoría (76,6%) tenían una ingesta mayor de 50 gramos semanales. La mayoría de los individuos (82,5%) negó tener antecedentes personales patológicos; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los expuestos y los controles con relación a la presencia de hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemia o artritis, pero sí se halló una ligera tendencia a encontrar más frecuentemente estas enfermedades en el grupo de expuestos así como a un mayor consumo de antihipertensivos (tabla 1).

**Tabla 1. Características de la población estudiada**

		<b>Total n = 64 (100%)</b>	<b>Controles n = 32 (50%)</b>	<b>Expuestos n = 32 (50%)</b>	<b>P</b>
<b>Edad en años</b>	Media ( $\pm$ SD)	41,75 ( $\pm$ 10,87)	42,25 ( $\pm$ 10,98)	41,25 ( $\pm$ 10,91)	0,722
	Mediana (25-75)	42,5	44 (33,25-50,75)	41,5 (32,50-50,75)	
	Rango (min-máx)	21-59	21-58	22-59	
<b>Años de exposición</b>	Media ( $\pm$ SD)	-	0	16,56 ( $\pm$ 11,70)	0,001
	Mediana (25-75)	-	0 (0-0)	15 (6,25-23,75)	
	Rango (min-máx)	-	-	2-45	
<b>Número de cigarrillos/día n (%)</b>	Ninguno	54 (84,4)	28 (93,8)	26 (90,6)	0,843
	1-10	1 (1,5)	0 (0)	1 (1,5)	
	11-20	2 (3,2)	1 (1,5)	1 (1,5)	
	21-30	3 (4,7)	1 (1,5)	2 (3,2)	
	>30	4 (6,2)	2 (3,2)	2 (3,2)	
<b>Gramos de alcohol/semana n (%)</b>	<49	15 (23,4)	6 (18,6)	9 (28,2)	0,39
	50-249	28 (43,7)	18 (56,6)	10 (31,2)	
	250-499	8 (12,5)	3 (9,4)	5 (15,6)	
	500-1.000	11 (17,2)	4 (12,4)	7 (22)	
	>1.000	2 (3,2)	1 (3,0)	1 (3,0)	
<b>Hipertensión arterial n (%)</b>	Sí	7 (11,0)	2 (6,2)	5 (15,6)	0,426
	No	57 (89,0)	30 (93,8)	27 (84,4)	
<b>Diabetes mellitus n (%)</b>	Sí	1 (1,5)	0 (0)	1 (3,0)	0,99
	No	63 (98,5)	32 (100)	31 (97,0)	
<b>Dislipidemia n (%)</b>	Sí	3 (4,7)	1 (3,0)	2 (6,2)	0,99
	No	61 (95,3)	31 (97,0)	30 (93,8)	
<b>Artritis</b>	Sí	3 (4,7)	1 (3,0)	2 (6,2)	0,99
	No	61 (95,3)	31 (97,0)	30 (93,8)	
<b>Antihipertensivos n (%)</b>	Sí	7 (11,0)	0 (0)	1 (3,0)	0,426
	No	57 (89,0)	32 (100)	31 (97,0)	
<b>Recibe vitaminas n (%)</b>	Sí	1 (1,5)	0 (0)	1 (3,0)	0,99
	No	63 (98,5)	32 (100)	31 (97,0)	
<b>Mercurio en orina (<math>\mu</math>g/L)</b>	Media ( $\pm$ SD)	11,52 ( $\pm$ 41,1)	1,38 (2,18)	21,66 (56,83)	0,001
	Mediana (25-75)	2,73	0,34 (0,1-2,49)	4,80 (2,82-14,21)	
	Rango (min-máx)	0,09-320	0,1-11,1	0,64-320	

Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Wilcoxon y para las cualitativas,  $\chi^2$  de Fisher.

En los individuos expuestos al mercurio se encontró que 50% tenían un tiempo de exposición de 15 años o más; en ellos, la mediana de las concentraciones urinarias de mercurio fue de 4,8  $\mu\text{g/L}$  con una alta variabilidad individual (rango entre 0,64 y 320  $\mu\text{g/L}$ ). Como era de esperar, en los controles la mediana de concentración de mercurio era mucho más baja que en los expuestos (0,34  $\mu\text{g/L}$ , con rango entre 0,1 y 11,1  $\mu\text{g/L}$ ) (tabla 1).

En el análisis del ensayo cometa se encontró mayor daño genético en los expuestos que en los controles y las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,001$ ). La mediana del porcentaje de ADN en la

cola fue de 27,37 (cuartil 25-75: 11,97-34,35) para los expuestos y de 0,31 (cuartil 25-75: 0,009-0,67) para los controles. Por su parte, las concentraciones de MDA en la orina fueron ligeramente mayores en el grupo de los expuestos, pero no significativas desde el punto de vista estadístico, como se observa en la tabla 2.

Hubo una correlación débil entre el porcentaje de ADN en la cola y la concentración de mercurio ( $r = 0,39$ ) y entre esta medida de genotoxicidad y el MDA en la orina ( $r = 0,07$ ). Al analizar estos datos por subgrupos (expuestos frente a controles) no se encontró que la correlación mejorara en los expuestos (datos no mostrados).

**Tabla 2. Resultados de las alteraciones genéticas en el ensayo cometa y MDA urinario en controles frente a expuestos a mercurio**

Característica		Total n (%) 64 (100%)	Controles n (%) 32 (50%)	Expuestos n (%) 32 (50%)	p
Mediana % ADN en la cola	Media ( $\pm$ SD)	14,11 ( $\pm$ 16,89)	3,84 ( $\pm$ 10,84)	24,39 ( $\pm$ 15,64)	0,001
	Mediana (25-75)	2,75	0,31 (0,009-0,67)	27,37 (11,97-34,35)	
	Rango (min-máx)	0,003-66,6	0,003-44,98	0,0063-66,6	
MDA en orina	Media ( $\pm$ SD)	1,05 ( $\pm$ 1,06)	0,86 ( $\pm$ 1,06)	1,25 ( $\pm$ 1,04)	0,112
	Mediana (25-75)	0,61	0,51 (0,1-1,35)	1,28 (0,12-2,01)	
	Rango (min-máx)	0,1-4,81	0,1-4,81	0,1-3,49	

Prueba utilizada: Wilcoxon

## DISCUSIÓN

Antioquia es el primer departamento productor de oro de Colombia con dos regiones claramente definidas: el Bajo Cauca y el Nordeste; uno de los problemas relacionados con la explotación minera de este metal precioso es su extracción con mercurio metálico, sustancia altamente tóxica para los seres humanos y con gran absorción por vía respiratoria (más del 80%), a la cual están expuestos ocupacionalmente por tiempo prolongado los trabajadores de la minería y de la compra-venta de oro, que se convierten en una población

susceptible de contaminarse o intoxicarse con este metal pesado. Amalfi es un municipio ubicado en el nordeste antioqueño, donde la explotación artesanal del oro ha constituido por décadas la principal actividad económica, lo que explica la exposición ocupacional a mercurio a largo plazo en esta región. Por publicaciones previas, se sabe que en los pacientes expuestos a mercurio hay un aumento en la concentración de radicales libres y se cree que pueda estar relacionado con alteraciones genéticas. El presente estudio tuvo el objetivo de determinar en personas expuestas a mercurio metálico la correlación entre

sus valores de MDA urinario y el daño en el ADN para evaluar si el aumento en el estrés oxidativo podría tener alguna relación con el daño genético. En la muestra evaluada se encontró que los valores de mercurio urinario eran mucho más bajos en los controles (entre 0,1 y 11,1  $\mu\text{g/L}$ ) que en los expuestos al metal (entre 0,64 y 320  $\mu\text{g/L}$ ). Aunque no se especificó cuáles de los individuos expuestos eran mineros y cuáles, quemadores de oro en las compraventas, sí se evidenció que 28 de los 32 expuestos (87,5%) tenían valores de mercurio urinario por debajo del rango considerado como tóxico (35  $\mu\text{g/L}$  de orina) y que los 4 restantes (12,5%) tenían concentraciones tóxicas: tres de ellos entre 35 y 55  $\mu\text{g/L}$  de orina y uno muy por encima del rango permitido con un valor de 320  $\mu\text{g/L}$ .

En el presente estudio se encontró que las personas con exposición ocupacional a mercurio tienden a tener mayores concentraciones urinarias de MDA (mediana de 1,28  $\mu\text{g/L}$ ) que los no expuestos (mediana de 0,51  $\mu\text{g/L}$ ), resultados que no fueron estadísticamente significativos (posiblemente por falta de poder), pero que se asemejan a los reportados por otros autores (29). Lo anterior puede ser el reflejo del estrés oxidativo que se le ha atribuido al mercurio (17,25,28,29) y aunque el MDA no es el único parámetro que mide el desequilibrio entre los radicales libres, sí es uno de los marcadores de estrés oxidativo utilizados más ampliamente (26). También se encontró que las personas expuestas a este metal tienen mayores alteraciones genéticas, hallazgo similar al informado en otros estudios (19-25). En vista de lo anterior, se cree que las alteraciones genéticas que se presentan en individuos expuestos a mercurio se pueden explicar por el aumento de radicales libres que produce este metal; sin embargo, no se conoce bien el mecanismo. Uno de los objetivos del presente estudio fue explorar si la magnitud del daño en el ADN se correlacionaba con las concentraciones urinarias de MDA en los individuos expuestos y no expuestos ocupacionalmente a mercurio. En este trabajo no se pudo encontrar una buena correlación entre estas variables en la población estudiada, ni tampoco en los subgrupos de pacientes (expuestos frente a controles). El hecho de no haber encontrado correlación entre las concentraciones urinarias de MDA y el daño genético puede tener tres explicaciones: 1) falta de poder estadístico; 2) que la muestra de orina no haya sido la adecuada para reflejar el estrés oxidativo en el medio celular; 3) que los

radicales libres no sean la explicación principal del daño genético.

En el primer caso, es posible que un tamaño insuficiente de la muestra haya generado una falta de poder para encontrar buena correlación entre las variables; sin embargo, es poco probable que esto haya ocurrido debido a que en los gráficos de correlación ni siquiera se observó una tendencia a ver más daño genético por el aumento del MDA. En el segundo caso se podría considerar que la orina es un fluido corporal aceptado para determinar las concentraciones de MDA, pero que pudiera no ser la muestra adecuada para reflejar lo que realmente está sucediendo en el espacio intracelular con respecto a la producción de radicales libres, es decir, que puede haber un importante estrés oxidativo en los espacios intracelular e intranuclear que esté generando daño local, pero que no se refleje en la orina. Arguelles y colaboradores (30), por ejemplo, compararon en ratas las concentraciones séricas del ácido tiobarbitúrico y los peróxidos lipídicos (marcadores de estrés oxidativo) con las de diferentes tejidos (hígado, bazo, corazón y riñón); encontraron una buena correlación entre las concentraciones séricas y tisulares de los peróxidos lipídicos, pero una baja correlación de las concentraciones de ácido tiobarbitúrico sérico con las tisulares; posiblemente esto pueda explicar en parte los resultados obtenidos en nuestro estudio. En el último caso, podría considerarse que el daño genético no se debe directamente al estrés oxidativo, sino a otras razones; una posibilidad sería que haya factores que hagan a los individuos susceptibles a la genotoxicidad (como la incapacidad de reparar el ADN o la falta de sustancias antioxidantes endógenas) independientemente de la concentración de radicales libres. Otro elemento que vale la pena mencionar, aunque no hizo parte de los objetivos de este estudio, es la baja correlación encontrada entre las concentraciones de mercurio y el daño genético en la población total y en los expuestos a mercurio. Esto no es extraño pues ya se ha encontrado en otros estudios (31,32) que en trabajadores expuestos hay un aumento de las alteraciones cromosómicas y de los linfocitos micronucleados en la sangre periférica comparados con los controles, pero estas alteraciones no se correlacionaron bien con las concentraciones urinarias de mercurio ni con el tiempo de exposición. Es posible que el mercurio sea el causante del daño genético, pero, al igual que lo mencionado antes, también puede ser que

existan factores protectores o de riesgo que hagan al mercurio menos o más lesivo en algunos individuos, o que haya otros factores ambientales en la minería y compraventa del oro que favorezcan los daños producidos por este metal, así como comorbilidades que puedan afectar los resultados. Se sabe, por ejemplo, que en estos ambientes de trabajo se utilizan otros elementos para la extracción y recuperación del oro, entre ellos cianuro (33), plomo, cadmio (9), arsénico, níquel, talio, manganeso, selenio, zinc y cromo (34), que pudieran interferir con el ADN. Además, hay comorbilidades que pueden aumentar el estrés oxidativo independientemente de la exposición a mercurio tales como el consumo de cigarrillo, especialmente cuando se fuman más de 10 cigarrillos al día (35), el consumo de alcohol, la edad por encima de 60 años (36), la hipercolesterolemia (37), la falla renal, el cáncer (38), la hipertensión arterial (39), la cardiopatía (falla cardíaca grave o eventos coronarios agudos), la artritis reumatoide (40), la diabetes mellitus (41), el hipertiroidismo (42), la EPOC u otras enfermedades que produzcan hipoxemia crónica y la sepsis (43); en este estudio se tuvieron en cuenta algunos de estos factores, pero no todos pudieron ser controlados.

La principal limitación de este estudio fue su carácter retrospectivo que causó disminución del tamaño de la muestra debido al no cumplimiento de los criterios de elegibilidad y a la pérdida de datos. Fue difícil manejar los sesgos de selección ya que se tomaron los datos de las historias clínicas (interrogatorio) sin confirmación paraclínica de las enfermedades de base de los participantes.

En conclusión, en esta investigación no se pudo demostrar que los individuos con concentraciones más elevadas de MDA en la orina presentaran mayor daño genético; sin embargo, sí se encontró un significativo mayor daño del ADN en individuos expuestos ocupacionalmente al mercurio (minería y compraventa de oro) lo que corrobora lo reportado en la literatura y abre un amplio campo de investigación que requiere buscar otras muestras biológicas para medir el estrés oxidativo, que reflejen lo que ocurre en el núcleo celular con los radicales libres, y/o buscar otras causas fisiopatológicas para explicar las alteraciones en el material genético en esta población, como la presencia de otros metales o de otras sustancias ambientales en su sitio de trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palacio JD, Zapata ON. Exposición ocupacional al mercurio en trabajadores del oro. Municipios de Cauca y Cáceres (Antioquia, Colombia). Boletín epidemiológico de Antioquia. 1994; 3:306-16.
2. Satoh H. Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. *Ind Health*. 2000 Apr;38(2):153-64.
3. Sitio oficial de Amalfi, Antioquia, Colombia (sede web). Nuestro municipio (acceso diciembre 16 de 2013). Información general; disponible en <http://www.amalfi-antioquia.gov.co/index.shtml>.
4. Grisham MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: *Physiology of Oxygen Radicals*. Taylor A E, Matalon S, Ward P A, editors. Baltimore: Waverly Press; 1986. pp. 1-18.
5. Parkins CS, Dennis MF, Stratford MR, Hill SA, Chaplin DJ. Ischemia reperfusion injury in tumors: the role of oxygen radicals and nitric oxide. *Cancer Res*. 1995 Dec;55(24):6026-9.
6. Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol*. 1994 Nov;66(5):427-32.
7. Tyrrell RM, Keyse SM. New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Mar;4(4):349-61.
8. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1-2):269-85.
9. Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect*. 1994 Sep;102 Suppl:45-50.
10. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*. 1979 May;204(4393):587-93.
11. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res*. 1992 Sep;275(3-6):257-66.
12. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*. 1995 Jun;18(6):1033-77.
13. Loeb LA, James EA, Waltersdorff AM, Klebanoff SJ. Mutagenesis by the autooxidation of iron with isolated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 Jun;85(11):3918-22.

14. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 1992 Jan;61:1175–212.
15. Friedberg E C, Walker G C, Seide W. Contribution of Mitochondrial DNA Repair to Cell Resistance from Oxidative Stress. *DNA Repair.* San Francisco: Freeman; 1994. p. 135–90.
16. Sarafian TA. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. *Met Ions Biol Syst.* 1999 Jan;36:415–44.
17. Olivieri G, Brack C, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Herrmann M, Renard P, et al. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2000 Jan;74(1):231–6.
18. Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett.* 2001 May 25;304(3):199–203.
19. Robison SH, Cantoni O, Costa M. Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds. *Carcinogenesis.* 1982 Jan;3(6):657–62.
20. Cantoni O, Evans RM, Costa M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Sep 30;108(2):614–9.
21. Cantoni O, Christie NT, Swann A, Drath DB, Costa M. Mechanism of HgCl<sub>2</sub> cytotoxicity in cultured mammalian cells. *Mol Pharmacol.* 1984 Sep;26(2):360–8.
22. De Flora S, Bennicelli C, Bagnasco M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat Res.* 1994 Feb;317(1):57–79.
23. Cebulska-Wasilewska A, Panek A, Zabiński Z, Moszczyński P, Au WW. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutat Res.* 2005 Oct 3;586(2):102–14.
24. Queiroz ML, Bincoletto C, Quadros MR, De Capitani EM. Presence of micronuclei in lymphocytes of mercury exposed workers. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 Feb;21(1):141–50.
25. Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008 Oct;128(4):501–23.
26. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990 Jan;9(6):515–40.
27. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1993 May 25;45(10):2017–24.
28. Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B.* 2001 Sep;36(5):687–97.
29. Kobał AB, Horvat M, Prezelj M, Briski AS, Krsnik M, Dizdarevic T, et al. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidative capacity and lipid peroxidation in mercury miners. *J Trace Elem Med Biol.* 2004 Jan;17(4):261–74.
30. Argüelles S, García S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 1;1674(3):251–9.
31. Anwar WA, Gabal MS. Cytogenetic study in workers occupationally exposed to mercury fulminate. *Mutagenesis.* 1991 May;6(3):189–92.
32. Mabille V, Roels H, Jacquet P, Léonard A, Lauwerys R. Cytogenetic examination of leucocytes of workers exposed to mercury vapour. *Int Arch Occup Environ Health.* 1984 Jan;53(3):257–60.
33. Ivanova E, Staykova T, Velcheva I. Cytotoxicity and genotoxicity of heavy metal and cyanide-contaminated waters in some regions for production and processing of ore in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* 2008; 14 (2): 262-268
34. Science Integrity Knowledge. Evaluación de riesgos de los constituyentes químicos de la mina de oro Marlín, Guatemala [Internet]. Vancouver: Intrinsic Environmental Sciences Inc; 2010. Disponible en: [http://hria-guatemala.com/es/docs/Human Rights/EDH\\_Apendice\\_I\\_Evaluacion\\_de\\_riesgos\\_Intrinsic.pdf](http://hria-guatemala.com/es/docs/Human_Rights/EDH_Apendice_I_Evaluacion_de_riesgos_Intrinsic.pdf)
35. Chia T, Hsu CY, Chen HL. Oxidative damage of workers in secondary metal recovery plants affected by smoking status and joining the smelting work. *Ind Health.* 2008 Apr;46(2):174–82.

36. Spitteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol.* 2001 Sep;36(9):1425–57.
37. Holvoet P, Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998 Apr;137 Suppl:S33–8.
38. Rajneesh CP, Manimaran A, Sasikala KR, Adaikappan P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med J.* 2008 Aug;49(8):640–3.
39. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bächler JP. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens. Res.* 2007 Dec;30(12):1159–67.
40. Humad S, Zarling E, Clapper M, Skosey JL. Breath pentane excretion as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Free Radic Res Commun.* 1988 Jan;5(2):101–6.
41. Soliman GZA. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J.* 2008 Feb;49(2):129–36.
42. Andryskowski G, Owczarek T. [The evaluation of selected oxidative stress parameters in patients with hyperthyroidism]. *Pol Arch Med Wewn.* 2007 Jul;117(7):285–9.
43. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, et al. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediators Inflamm.* 2008 Jan;2008:168652.

