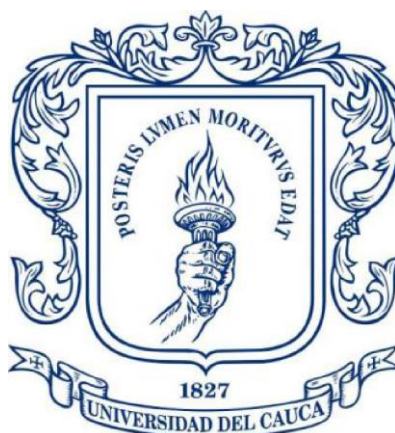


EFFECTOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL MERCURIO EN *Leucostethus fraterdanieli* (ANURA: DENDROBATIDAE)



PRESENTADO POR: KAREN LIZETH CASTILLO CHINGAL

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
MAESTRIA EN BIOLOGIA
POPAYÁN
2022**

EFFECTOS GENOTÓXICOS E HISTOPATOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL MERCURIO EN *Leucostethus fraterdanieli* (ANURA: DENDROBATIDAE)



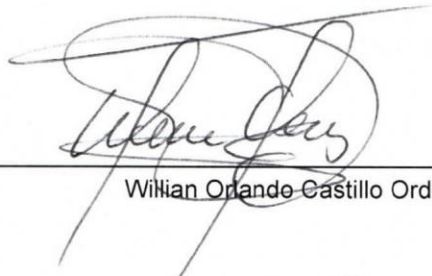
PRESENTADO POR: KAREN LIZETH CASTILLO CHINGAL
DIRECTOR: WILLIAN ORLANDO CASTILLO, Ph.D
ASESORA: NILZA VELASCO PALOMINO, Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA
POPAYÁN
2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

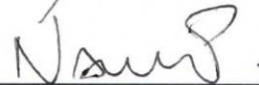
Aprobado

Director



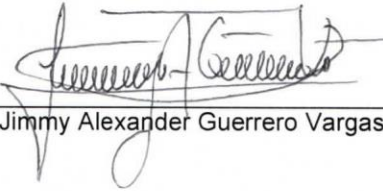
Willian Orlando Castillo Ordoñez

Jurado:



Nancy Yadira Guerrero Pepinosa

Jurado:



Jimmy Alexander Guerrero Vargas

DEDICATORIA

A mi familia, profesores y compañeros quienes apoyaron la consolidación de este trabajo.

A Francisco José Lopez Lopez (q.e.p.d).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por manifestarse a través de todas aquellas personas que estuvieron presentes y me acompañaron en el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad del Cauca y Vicerrectoría de investigaciones por financiar parcialmente este proyecto a través de la adjudicación de la Convocatoria Interna *“Programa de apoyo a proyectos de investigación, desarrollo e innovación en el marco de Maestrías, Doctorados”* – ID: 5117.

A la Maestría en Biología por instituir académicamente la motivación científica para desarrollar investigaciones con impacto ecológico y social, a su comité por respaldar y gestionar el proceso investigativo.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca CIBUC – Bioterio, a su coordinador y director, Doctores Jose Beltrán Vidal y Jimmy Alexander Guerrero y equipo de monitores; por brindar el espacio adecuado para llevar a cabo esta investigación y acompañar las extensas jornadas de trabajo durante 3 años.

A la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca y el Grupo de investigación en microscopía y análisis de imágenes (GIMAI) brindar el espacio adecuado para llevar a cabo el procesamiento y análisis histológico; al Doctor Gerardo Andres Torres Rodriguez y el equipo humano de este laboratorio, por su amabilidad, enseñanzas y acompañamiento.

Al Laboratorio de química analítica ambiental (GIQA) de la Universidad del Cauca y al Doctor Jose Antonio Gallo Corredor, por su continuo acompañamiento y asesoría en el análisis químico y manejo del mercurio, sus aportes y perspectivas de investigación científica sin duda son motivación para continuar, desarrollar e incentivar nuevos estudios que aborden la problemática de contaminación por metales pesados.

Al laboratorio Múltiple de la Facultad de Ciencias Agrarias y a su equipo de coordinación, por el espacio otorgado para desarrollar una de las fases de laboratorio por un periodo de 3 meses.

A el director de trabajo de grado, Doctor Willian Orlando Castillo por su acompañamiento y asesoría en el desarrollo de esta investigación.

A la Doctora Luz Stella Hoyos por facilitar reactivos y materiales para llevar a cabo la investigación; así mismo agradezco a todo el equipo humano del laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por sus asesorías.

Al Doctor, Harold Bolaños por su acompañamiento y asesoría en el análisis histológico y a Graciela Muñoz, por su asesoría y enseñanzas en el desarrollo y aplicación de técnicas histológicas.

Agradezco especialmente a la Doctora Nilza Velasco Palomino, por su asesoría y entrega a esta investigación, su carácter docente y apoyo incondicional durante estos años; por su paciencia y constancia para impulsar el alcance de los objetivos, fundamentalmente en las fases críticas de esta investigación.

Agradezco a la profesora Alejandra Velasco por su asesoría en la aplicación estadística de los resultados de esta investigación.

Agradezco especialmente a los evaluadores de este trabajo de grado, Doctores Jimmy Alexander Guerrero Vargas y Nancy Guerrero Pepinosa, por sus valiosos aportes realizados que sin duda incrementaron el valor sustancial de los resultados de esta investigación.

Agradezco a mi madre Mary por ser el impulso y la fuerza para continuar en cada proyecto, por su amor incondicional; a mi Padre Jaime y hermanos Hernán y David por su fortaleza.

A Roland Astaiza, por entenderme y acompañarme en todas y cada una de mis ideas y propósitos, a su familia por alentarme y apoyarme siempre con cariño.

A mi prima María Luisa Riascos Chalapud, por su cariño incondicional y motivación para alcanzar mis sueños y metas.

A Tania Camayo y Alejandra Montenegro, estudiantes, compañeras de investigación y amigas, por seguir los ideales de investigación en fauna, no desfallecer y siempre motivar con su curiosidad, ánimo y buena energía en las largas jornadas de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. OBJETIVOS	19
4. MARCO TEÓRICO	20
4.1 ECOTOXICOLOGÍA	20
5.1.1 Potencial tóxico del metilmercurio.	29
8. ANTECEDENTES	36
9. MATERIALES Y MÉTODOS	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	49
RESULTADOS	50
Análisis genotoxicidad	50
Análisis histológico del tejido hepático de <i>Leucostethus fraterdanieli</i>	56
Análisis de bioacumulación de mercurio en <i>Leucostethus fraterdanieli</i>	59
Discusión	63
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de formación de micronúcleos que contienen fragmentos acéntricos, cromátidas o cromosomas completos.

Figura 2. Mecanismos moleculares que conducen a la formación de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares.

Figura 3. Especie *Leucostethus fraterdanieli*: juvenil y adulto

Figura 4. Ubicación geográfica del corregimiento de Tunía- Municipio de Piendamó en el departamento del Cauca

Figura 5. Eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli* (a) Normales. (b) Micronúcleo (MN)

Figura 6. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones de Hg

Figura 7. Microfotografías anormalidades nucleares presentadas por eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*.

Figura 8. Anormalidades nucleares ligadas a eventos genotóxicos en eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli*. (a). Brote nuclear. (b). puente nucleoplasmico.

Figura 9. Microfotografías representativas del hígado de *Leucostethus fraterdanieli*.

Figura 10. Microfotografías representativas del hígado de *Leucostethus fraterdanieli* – Tinción con azul de toluidina, PAS y PAS Diastasa.

Figura 11. Bioacumulación de Hg en renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de la concentración de mercurio para cada uno de los grupos a evaluar.	42
Tabla 2. Medidas morfométricas promedio de renacuajos de <i>Leucostethus fraterdanieli</i> evaluados	47
Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de renacuajos de <i>Leucostethus fraterdanieli</i> tratados con diferentes concentraciones de Hg (\bar{x} + SE)	49
Tabla 4. Frecuencia de brotes nucleares en eritrocitos de renacuajos de <i>Leucostethus fraterdanieli</i> tratados con diferentes concentraciones (\bar{x} + SE)	51
Tabla 5. Frecuencia de puentes nucleoplásmicos en eritrocitos de renacuajos de <i>Leucostethus fraterdanieli</i> tratados con diferentes concentraciones (\bar{x} + SE)	52
Tabla 6. Bioacumulación de Hg en renacuajos de <i>Leucostethus fraterdanieli</i> tratados con diferentes concentraciones (\bar{x} + SE)	55

RESUMEN

El mercurio es un metal pesado altamente tóxico, liberado al ambiente por actividades antrópicas como la minería aurífera. Su persistencia en el ecosistema se debe al potencial de bioacumulación y biomagnificación; por ello, su uso desmedido representa un problema de salud pública y una amenaza para la fauna y la flora. Considerando lo anterior, a través de este estudio se analizaron los efectos genotóxicos e histopatológicos inducidos por el mercurio en renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*. Se analizaron 4 concentraciones de mercurio: 13,6; 50,13; 86,66 y 123,2 $\mu\text{gHg/L}$, previamente reportadas para el afluente del río la Teta de Buenos Aires (Cauca) resultado del vertimiento asociado a las intensivas actividades de minería aurífera. Las evaluaciones experimentales se realizaron entre intervalos de 48h, 96h y 144h. La genotoxicidad se evaluó a través del test de Micronúcleos (MCN) en eritrocitos. Los análisis histopatológicos se realizaron en tejido hepático mediante descripción micro y ultraestructural (Microscopía óptica de alta resolución). La bioacumulación se evaluó a través de espectroscopia de absorción atómica con vapor frío. Para el análisis de genotoxicidad un total de 6.000 eritrocitos fueron contabilizados para cada concentración de mercurio, control positivo y negativo en cada intervalo de tiempo; la mayor frecuencia significativa de MCN, $3,71 \pm 1,07$, se observó a las 48h con la máxima concentración de mercurio usada $123,2 \mu\text{g/L}$; a las 96h la mayor frecuencia de MCN, $3,4 \pm 1,04$, se registró para la concentración $86,66 \mu\text{gHg/L}$, y a las 144h se registró la frecuencia de MCN, $3,18 \pm 0,55$ con la concentración $50,13 \mu\text{gHg/L}$. La frecuencia de MCN no evidenció un efecto dosis dependiente, según el análisis de correlación de Pearson se indica una correlación positiva en las primeras 48 horas de exposición ($r = 0,7014$ $p < 0,05$) posterior a ello, la relación disminuye (r 96h = $0,4414$ $p < 0,05$) y a las 144 horas no es significativa; probablemente esto se relacione a la presencia de anomalías nucleares, tales como brotes y puentes nucleoplásmicos que presentan un comportamiento similar a la frecuencia de MCN, es decir disminuyen a las 96 y 144 horas. El análisis del tejido hepático permitió identificar hepatocitos con numerosas vacuolas y presencia de glucógeno que indicó la reserva energética y estado nutricional de los renacuajos frente al proceso metamórfico. La bioacumulación tuvo un comportamiento dosis dependiente definido por el incremento del coeficiente de correlación de Pearson (48h $r = 0,908$ y 144h

$r= 0,9769$ $p < 0,05$); el mayor registro de bioacumulación fue $101,47 \mu\text{gHg}/0.1\text{g} \pm 4,8$ y se relaciona a la máxima concentración de mercurio ($123,2 \mu\text{gHg}/\text{L}$) y horas (144h) de exposición. En conclusión, la inducción de micronúcleos, anormalidades nucleares y la alteración hepática generada por el mercurio representa riesgo genotóxico e histopatológico para renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*. La bioacumulación fue rápida y representa el potencial de persistencia y rápida biomagnificación de este metal en los ecosistemas.

Palabras clave: micronúcleos, aberraciones nucleares, vacuolización, bioacumulación, mercurio.

ABSTRACT

Mercury is a highly toxic heavy metal released into the environment by human activities such as gold mining. Its persistence in the ecosystem is due to the potential for bioaccumulation and biomagnification; therefore, its excessive use represents a public health problem and a threat to fauna and flora. Considering the above, through this study the genotoxic and histopathological effects induced by mercury in tadpoles of *Leucostethus fraterdanieli* were analyzed. Four mercury concentrations were analyzed: 13.6; 50.13; 86.66 and 123.2 $\mu\text{gHg/L}$, previously reported for the tributary of the La Teta river in Buenos Aires (Cauca) as a result of dumping associated with intensive gold mining activities. The experimental evaluations were carried out between intervals of 48h, 96h and 144h. Genotoxicity was evaluated through the Micronucleus (MCN) test in erythrocytes, at intervals of 48h, 96h and 144h. Histopathological analyzes were performed on liver tissue by means of micro and ultrastructural description (high resolution optical microscopy). Bioaccumulation was assessed by cold vapor atomic absorption spectroscopy. For the genotoxicity analysis, a total of 6,000 erythrocytes were counted for each mercury concentration, positive and negative control at each time interval; the highest significant frequency of MCN, 3.71 ± 1.07 , was demonstrated at 48h with the maximum concentration of mercury used, 123.2 $\mu\text{g/L}$; at 96h the highest frequency of MCN, 3.4 ± 1.04 , increased for the concentration 86.66 $\mu\text{gHg/L}$, and at 144h the frequency of MCN increased, 3.18 ± 0.55 with the concentration 50.13 $\mu\text{gHg/L}$. The frequency of MCN did not show a dose-dependent effect, according to Pearson's correlation analysis, a positive correlation is indicated in the first 48 hours of exposure ($r = 0.7014$ $p < 0.05$) after that, the relationship decreases ($r_{96h} = 0.4414$ $p < 0.05$) and at 144 hours it is not significant; this is probably related to the presence of nuclear abnormalities, such as nuclear buds and nucleoplasmic bridges, both presented greater significant differences during the first 48 hours of exposure and, as in the case of micronuclei, their frequency decreased at 96 and 144 hours. The analysis of the liver tissue allowed the identification of hepatocytes with numerous vacuoles and the presence of glycogen, which indicated the energy reserve and nutritional status of the tadpoles against the metamorphic process.

The bioaccumulation had a dose-dependent behavior defined by the increase in the Pearson correlation coefficient (48h $r= 0,908$ y 144h $r= 0,9769$ $p < 0,05$), the highest bioaccumulation record was $101.47 \mu\text{gHg}/0.1\text{g} \pm 4.8$ and is related to the maximum concentration of mercury ($123.2 \mu\text{gHg}/\text{L}$) and hours (144h) of exposure. In conclusion, the induction of micronuclei, nuclear abnormalities and liver damage caused by mercury represents a genotoxic and histopathological risk for *Leucostethus fraterdanieli* tadpoles. Bioaccumulation was rapid and represents the potential for persistence and rapid biomagnification of this metal in ecosystems.

Keywords: micronuclei, nuclear aberrations, vacuolation, bioaccumulation, mercury.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mercurio (Hg) es un metal pesado altamente tóxico que se libera indiscriminadamente al ambiente en todo el mundo, su aumento paulatino en el ambiente se debe a su uso

directo o como compuesto en sustancias artificiales que se intensifican por el desarrollo industrial, agrícola y minero (Balali-Mood *et al.*, 2021; Soe *et al.*, 2022; Peakall & Lovett, 1972; Cálaho & Marrugo, 2015; Arora & Chauhan 2021). Uno de los principales consumidores de Hg a nivel mundial es Colombia (Brooks, 2012; IPEN, 2017), a pesar de que este metal se emplea en diferentes sectores industriales, su uso en el sector informal de la minería del oro es el más preocupante, a nivel mundial, esta actividad se considera la mayor fuente de contaminación por Hg en el ambiente (Esdaile & Chalker, 2018), su impacto trasciende gracias a los altos requerimientos de agua y la descarga en este medio de contaminantes complejos, entre ellos el Hg que se emplea en el proceso de amalgamación para extraer oro, y se libera en el agua y la atmósfera a través de la incineración de la amalgama, de esta manera, las concentraciones de Hg aumentan, contaminando gradualmente el medio ambiente y a las comunidades humanas (Olivero & Johnson 2002; Gallo *et al.*, 2021a; Gallo *et al.*, 2021b; Soe *et al.*, 2022); como ocurre a nivel regional con los asentamientos en las riberas del río Cauca y Magdalena, áreas en las que converge alta actividad de minería aurífera que se fortalece por el establecimiento de distritos mineros y el impulso de la extracción ilegal del oro, bajo el crecimiento en la demanda de oro a nivel mundial (Olivero, Johnson & Arguello, 2002; Olivero, Caballero & Marrugo 2011; Olivero, Young & Caballero, 2014; Yansura, 2021).

En consecuencia, a la intensidad de la minería aurífera, los sistemas acuáticos son los más afectados por el uso del Hg, su presencia en este medio facilita su movilización y transformación a la forma orgánica de mayor toxicidad, metilmercurio, esto gracias a la materia orgánica y el metabolismo aeróbico y anaeróbico de productores primarios como bacterias y hongos presentes en los cuerpos de agua (Beauvais-flück, Slaveykova, & Cosio, 2017; Chen, 2019; Bonville *et al.*, 2020). Por la versatilidad de las redes tróficas, la forma orgánica del Hg se bioacumula y biomagnifica en diferentes organismos de niveles superiores cuya capacidad de asimilación dependerá de sus características fisiológicas, sexo, edad, posición en la red trófica, grado de concentración y exposición (Atta, *et al.*, 2012; Zillioux & Porcella, 1993; Chouvelon *et al.*, 2018; Ponton *et al.*, 2021; Qu *et al.*, 2022).

El Hg orgánico actúa inicialmente a nivel celular y molecular, al provocar estrés oxidativo, lo que genera acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ishihara *et al.*, 2016), que intervienen en la capacidad de defensa celular, actividad mitocondrial y del retículo endoplasmático; además, afecta procesos enzimáticos y aquellos asociados a la funcionalidad de los ácidos nucleicos como la reparación, transcripción, traducción y segregación cromosómica durante la división celular, dando lugar a mutaciones, alteración de genes y fragmentación cromosómica (Jaishankar *et al.*, 2014; Kour, 2014; Beauvais-flück, *et al.*, 2017; Wyatt *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2021). En poblaciones humanas se destacan patologías que afectan el sistema digestivo, respiratorio, cardiovascular y nervioso; en este último, se evidencian parálisis cerebral, patologías contempladas en el espectro de retardo mental, enfermedad de Alzheimer, sordera e incapacidad para hablar, ceguera y posiblemente como ocurre en otros grupos de vertebrados, quizá afecta procesos reproductivos, etológicos y el desarrollo del feto (Yard, *et al.*, 2012; El-Saeed *et al.*, 2016; Wallin *et al.*, 2019; Sánchez- Alarcón *et al.*, 2021),

Bajo este escenario, la contaminación por Hg es motivo de preocupación para la comunidad científica y médica, pues las consecuencias en la salud ambiental y humana son severas y la resiliencia del metal es alta; por lo tanto, su potencial de afección se puede transmitir y prolongar durante meses después de la exposición (Kern *et al.*, 2016; Bell, Digangi & Weinberg, 2014; Llop *et al.*, 2012); en este contexto, el empleo de organismos bioindicadores como los anfibios se tornan de gran aplicación, su alta sensibilidad a contaminantes a través de diversas rutas de absorción, como: alimentación, difusión cutánea y branquial, tanto en su estado larval, como en los diferentes estadios del proceso metamórfico, que hacen visibles los posibles trastornos que puedan presentar frente a diversos estímulos tóxicos (Hernández, 2013); además, su posición trófica estratégica, con una biomasa que puede superar a la de mamíferos y aves en algunos ecosistemas (Burton & Likens, 1975; Kour, 2014), representan un factor fundamental en el proceso de dispersión de metales como el Hg y se consolidan además, como un acercamiento hacia el escenario crítico que enfrentan los anfibios, ya que el riesgo de extinción se mantiene sobre el 41% de las especies de este grupo en todo el mundo (IUCN, 2022), la toxicidad de metales pesados ha sido poco evaluada en anfibios

ya que los esfuerzos investigativos se han dirigido a entender principalmente la afectación causada por agroquímicos (Benvindo- Souza *et al.*, 2019).

Algunos estudios sugieren que los anfibios acumulan metales pesados o sufren alteraciones histopatológicas en órganos, como: hígado, branquias, riñón, intestinos, así mismo se altera la velocidad de metamorfosis, lo que disminuye las probabilidades de supervivencia (Huancaré-Pusari, 2002; Wada *et al.*, 2011; Atta, *et al.*, 2012; Boczulak, Vanderwel & Hall 2017), sin embargo, los mecanismos de acción a nivel celular y sobre el material genético del Hg no se han determinado para este grupo en específico, más aún para anuros de la familia Dendrobatidae, evidenciando la falta de atención por la comunidad toxicológica (Kour, 2014; Benvindo- Souza *et al.*, 2019).

Considerando lo anterior, es necesario evidenciar los efectos tóxicos específicos que causa este metal, haciendo uso de modelos biológicos como aquellos de distribución regional, ya que en los últimos años la contaminación por Hg de cuencas hidrográficas en el departamento de Cauca se ha agudizado, deteriorando la calidad de los recursos naturales y calidad de vida de las comunidades humanas en las zonas de influencia minera. De esta manera, este estudio busca identificar los efectos genotóxicos e histopatológicos inducidos por la bioacumulación de Hg en *Leucostethus fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae).

2. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones sobre metales pesados, como el Hg y su impacto en los ecosistemas se han intensificado a nivel mundial debido a la problemática de contaminación ambiental, salud pública y seguridad alimentaria (Tumannyan, Seliverstova & Zaitseva, 2020; Mitra *et al.*, 2022); consecuencia de su alta toxicidad y resiliencia en el suelo, agua y aire, que afectan las funciones biológicas de los ecosistemas (Stefansson, Heyes & Rowe, 2013; Reyes *et al.*, 2016; Tumannyan, Seliverstova & Zaitseva, 2020).

Eventos históricos como la tragedia ambiental ocurrida en Minamata en 1956, ha permitido reconocer la gravedad de la contaminación por Hg. En esta zona de Japón tanto los habitantes como la fauna marina de la bahía se envenenaron por el constante vertimiento de Hg al océano resultado de la actividad de fábrica de productos químicos, provocando que miles de personas desarrollaran lo que se denominó, la enfermedad de Minamata, un deterioro neurológico en la que destaca la falla en la motricidad y parálisis cerebral (García *et al.*, 2017; Hachiya, 2006; Semionov, 2018). Actualmente, a nivel mundial se busca ratificar el Convenio de Minamata, un tratado global para proteger la salud humana y el ambiente de la liberación de Hg por causa de actividades antropogénicas, Colombia aprobó el convenio de Minamata mediante la ley 1882 de 2018 y fue ratificada el 26 de agosto de 2019 (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2022); previamente se había establecido la ley 1658 de 2013 para regular, reducir y eliminar el uso del Hg con el fin de proteger la salud pública y ambiental (García, *et al.*, 2017), ambas estrategias buscan abordar de manera integral esta problemática.

El departamento del Cauca no está ajeno a este escenario, la contaminación por Hg incrementa día a día a causa de actividades de minería aurífera que se intensifican por la demanda del mercado mundial del oro y de la articulación de la minería aurífera como medio de desarrollo regional, impulsado por las políticas de consolidación de los distritos mineros en el país (Cortés & Gómez, 2015; UPME, 2015; IPEN, 2017). En este departamento se destaca el distrito minero del Tambo por su alta influencia sobre la cuenca hidrográfica del Río Cauca, este distrito se ubica en el piedemonte de la Cordillera Occidental y lo conforman municipios como Suarez, Puerto Tejada, Santander de

Quilichao, Patía, El Tambo y Buenos Aires (Cortes & Gómez, 2015). En Buenos Aires, la reactivación y expansión de actividades mineras han agudizado la afectación ambiental, sobresalen sitios como el Cerro de la Teta y el Río la Teta en el que se ejecuta minería aurífera artesanal de tipo aluvión y filón, que genera la mayor demanda de recurso hídrico para desarrollar dicha actividad en la que además, se descarta Hg en diferente estado elemental al ambiente, creando un esquema de contaminación que se expande y deteriora los ecosistemas y las cuencas hidrográficas asociadas, como la del Río Cauca (Chindicue & Rivera, 2017; Cortes & Gómez, 2015; UPME, 2015).

Como efecto de estas actividades, en Colombia se ha registrado en fuentes hídricas directamente asociadas o presentes en las áreas de influencia de zonas mineras, concentraciones de Hg por encima del valor determinado por la Legislación Colombiana como apropiado para el consumo humano (2,0 µg/L) (Chindicue & Rivera, 2017; Olivero, 2010); esto hace evidente la necesidad de generar fundamentos científicos sobre el nivel de daño inducido por el Hg en diferentes sistemas, especialmente en los biológicos, como proceso clave para contribuir en el desarrollo de políticas públicas que busquen controlar el uso de este metal; sino también, para visibilizar a nivel regional el grado de afectación en la salud que puede tener el desarrollo de actividades que utilicen Hg; y de esta manera, contribuir al fortalecimiento de las políticas de control de Hg en el país desde las comunidades.

Por ello, este estudio evaluó el comportamiento tóxico del Hg en la rana *Leucostethus fraterdanieli*, generando un sistema de simulación ambiental artificial para provocar la bioacumulación de Hg y así determinar el potencial tóxico de este metal a través de la técnica de micronucleos, un biomarcador de efecto temprano considerado un ensayo práctico, válido, accesible y útil para evaluar inestabilidad genética y el impacto de agentes genotóxicos (Zalacain, Sierrasesúmaga & Patiño., 2005; Chavez, *et al.*, 2022) en un sistema biológico que permita abordar el comportamiento del metal y su extrapolación a los ecosistemas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico e histopatológico inducido por el Hg en *Leucostethus fraterdanieli*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la genotoxicidad del mercurio en la especie *Leucostethus fraterdanieli*.
- Analizar los efectos histopatológicos inducidos por el mercurio en la especie *Leucostethus fraterdanieli*
- Determinar la bioacumulación de mercurio alcanzada por *Leucostethus fraterdanieli* al exponerse a diferentes concentraciones experimentales de mercurio

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ECOTOXICOLOGÍA

La ecotoxicología estudia el destino y los efectos deletéreos de sustancias tóxicas, ya sean naturales o artificiales, sobre cualquier organismo o sistema biológico susceptible en un ecosistema, su enfoque contempla el análisis, transmisión y predicción de dichas sustancias, que por acción antropogénica alcanzan niveles anormales en la naturaleza, esto, sobre las cuatro matrices de distribución, como lo son: la atmosférica por evaporación, la litosfera por adsorción, la hidrosfera por disolución y la biosfera por absorción, inhalación o ingestión, (Truhaut, 1969; Butler, 1978; Wooley, 2008; Di Giulio & Newman, 2010; Planes & Fuchs, 2015; Carriquiriborde, 2021).

La ecotoxicología evalúa la exposición a polutantes y genera un diagnóstico que determina posibles efectos letales y subletales, a nivel ecosistémico, estos, por ejemplo, pueden estar asociados a la disminución en el tamaño poblacional de una especie susceptible a consecuencia de falla o incapacidad reproductiva, producto de la contaminación (Capó, 2003; Bizarro-Nevarés, 2018). El diagnóstico ecotoxicológico es eficiente cuando se emplean organismos bioindicadores de diferente nivel trófico y se determina cual es la concentración segura en la que la sustancia no producirá ningún efecto, pese al tiempo de exposición, o estima las causas y consecuencias del aumento progresivo del tóxico en las redes tróficas, que, considerando la complejidad y la diversidad de los ambientes, hacen que el comportamiento de muchas sustancias tóxicas sea subestimado (Vighi & Villa, 2003; Woolley, 2008; Salibián, 2015; Carriquiriborde, 2021), por ello, la ecotoxicología se ha constituido como una herramienta para conocer el impacto de tóxicos después de tragedias ambientales con contaminación descontrolada (Planes & Fuchs, 2015).

En este contexto, el objetivo de la ecotoxicología es informar sobre la degradación del ambiente y aportar datos para la toma de decisiones frente a los riesgos del uso inadecuado de una sustancia tóxica, y así evitar alteraciones irreversibles en el ecosistema, a través de la provisión de herramientas que permitan prevenir, mitigar o

remediar dichos efectos (Capo, 2003; Leblanc, 2004; Vighi & Villa, 2003; Woolley, 2008; Carriquiriborde, 2021). Los efectos se pueden evaluar de dos formas: mediante un *Monitoreo Ambiental*, el cual analiza el origen de liberación de una sustancia con potencial tóxico, el medio de transferencia y su destino en las diferentes matrices ambientales, a una escala mayor con alta resolución y especificidad de información con el objetivo de delimitar el daño ambiental y predecir los potenciales impactos (Fascista, 2022); y por otra parte, el *Monitoreo Biológico* evalúa los efectos de un contaminante en individuos, poblaciones, o ecosistemas desde el nivel molecular y celular hasta el nivel funcional del ecosistema, usando y desarrollando indicadores que permiten alcanzar objetivos de conservación o restauración (Karr, 2006).

La ecotoxicología difiere de la toxicología tradicional en que esta va más allá de evaluar los efectos de drogas, sustancias químicas o mezclas de ellas, sobre organismos a una escala menor, su escala trasciende desde el nivel molecular a los ecosistemas, sin embargo, en la toxicología tradicional destacan los avances generados en la toxicología clínica, toxicología forense y ambiental que abarca un campo multidisciplinario desde el químico, físico y biológico hasta el epidemiológico y económico (Zakrzewski, 2002).

4.2 BIOMODELO

Un biomodelo es, un organismo utilizado para estudiar el comportamiento de aspectos relacionados con los seres humanos, seleccionados en función de sus características específicas (Maldonado & Aquino, 2016; Castro, 2018). El fundamento parte entre la similitud entre seres humanos y animales por la conservación de las secuencias de ADN de los organismos, que expresa metabolismos parecidos entre ellos, gracias al desarrollo de modelos de experimentación se han descubierto tratamientos a enfermedades y se han entendido y tratado patologías, permitiendo que los pacientes tengan una mejor calidad de vida (Gómez *et al.*, 2011; Castro, 2018).

Los anfibios han sido usados como biomodelos de experimentación en investigación, por su fisiología, fácil mantenimiento en cautividad y similitud con los humanos (Novo et al., 2003; Pérez et al., 2009), por ello se ha generado conocimiento en distintas áreas y el desarrollo de nuevos tratamientos.

En investigaciones biomedicas de procesos biológicos y patológicos, se ha utilizado a *Xenopus laevis* que presenta una estructura inmune y funcional similar a los mamíferos, los genes relacionados con su inmunidad pueden evolucionar rápido y evidenciar procesos de defensa celular y potencial infectividad patógena, esta especie, así como a *Ambystoma mexicanum* se han empleado como modelos para estudiar la regeneración y diferenciación celular, como también la detención del ciclo celular en algunos casos de cáncer (Novo et al., 2003; Suleiman et al., 2020; Peñailillo, 2019); gracias a ello, se han secuenciado sus genomas completos y analizado desde la transcriptómica, que facilita la genómica comparativa, por ello establecer biomodelos anfibios de distinta procedencia taxonómica y por ende arquitectura genómica, garantiza establecer una amplia inferencia comparativa (Novo et al., 2003), especialmente considerando las particularidades regionales y nacionales, que moldean históricamente la evolución de estos organismos y su comportamiento frente a problemáticas ambientales desde las bases de resistencia o susceptibilidad de las especies diferenciada de los anfibios.

4.3 BIOINDICADOR

Los bioindicadores son organismos cuya presencia o estado en un ecosistema brinda información sobre características ecológicas de este o el posible impacto ambiental de ciertas prácticas sobre el mismo, por ello son utilizados para la evaluación de la calidad ambiental de los ecosistemas presentando características como: sensibilidad a las perturbaciones ambientales, distribución, abundancia, dispersión y éxito reproductivo (González et al., 2014; Piña et al., 2019).

La pérdida de poblaciones de anfibios a nivel mundial refleja el deterioro de los ecosistemas debido a su sensibilidad frente a cambios ambientales, lo que desataca su

importancia ecológica como grupo indicador para evaluar los atributos en los ecosistemas, especialmente si se considera el ciclo de vida bifásico que los expone con contaminantes a través del medio acuático y terrestre (González *et al.*, 2014; Rinas *et al.*, 2017; Womack *et al.*, 2022).

4.4 GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad describe el efecto destructivo de un elemento genotóxico sobre el material genético de la célula, como el ADN o ARN, que afecta la integridad de la célula; dependiendo de los efectos, las genotoxinas se pueden categorizar como: carcinógenos, mutágenos o teratógenos (Mohamed *et al.*, 2017; Savale, 2018; Kaur *et al.*, 2018). Los mecanismos de genotoxicidad pueden ser indirectos y causan aberraciones cromosómicas, ruptura del ADN y formación de aductos, mientras que los indirectos no se relacionan directamente con el ADN sino con enzimas que intervienen, por ejemplo: en la reparación de ADN, apoptosis, ciclo celular, formación del huso mitótico, etc; ambos conducen al daño al ADN, apoptosis, anormalidad, hipermutabilidad, proliferación descontrolada, inestabilidad genómica que alteran la transcripción y replicación, estos pueden ser heredados a células hijas (Srivastava, 2016; Hemmaphan & Bordeerat, 2022).

Esta afectación genómica es un riesgo para la salud de los organismos (Nascimento *et al.*, 2020), la exposición a genotóxicos pueden desencadenar a largo plazo resultados adversos generalmente silenciosos, como su potencial relación en el desarrollo de cáncer o toxicidad en la reproducción (Hayashi, 2022).

En el campo de la ecotoxicología y con el propósito de generar diagnósticos que respondan sobre los peligros potenciales de agentes físicos, químicos o biológicos, se han definido biomarcadores que evidencian el cambio de una respuesta biológica frente a una exposición tóxica ambiental en la que se detecta una desviación del estado normal, estos pueden ser, biomarcadores de exposición o biomarcadores de efecto que miden la consecuencia biológica adversa, su propósito es detectar a nivel de organismo para

prevenir niveles jerárquicos mayores como poblaciones, comunidades y ecosistemas (Peakall, 1994; Cazenave, Amé & Menone, 2021).

Para buscar e identificar la progresión alcances de daño sobre el material genético, se considera eficiente el Test de Micronúcleos, una alternativa sencilla y adecuada para evaluar el daño *in vivo* (Woolley, 2008; García, 2009; Cálaho & Marrugo, 2015; Kaur *et al.*, 2018).

4.4.1 Test de Micronúcleos. Es un biomarcador de efecto, ya que permite evaluar y cuantificar el cambio fisiológico producido en el organismo como resultado de la exposición a un compuesto químico exógeno que se puede asociar a un efecto adverso o enfermedad (Escobar, 2007; Chaves *et al.*, 2022), se constituye como una de las mejores pruebas para realizar biomonitoreo *in vivo*, es uno de los métodos más usados para evaluar la genotoxicidad en medios acuáticos y efectos genotóxicos ocupacionales ya que permite determinar el impacto de un factor de amenaza biológica (Cavaş, 2008; Rincón & Sánchez, 2021), su facilidad de aplicación permite obtener resultados de manera rápida, para así generar alertas tempranas sobre la toxicidad de sustancias químicas, físicas o biológicas, a través de la detección de pérdida de material genético, establecida por la visualización de micronúcleos, los cuales son cuerpos extranucleares que contienen fragmentos de cromosomas dañados o cromosomas completos que no se segregan a los polos de la célula durante la mitosis y por lo tanto no se incorporan al núcleo después de la división celular, posteriormente se envuelven en su propia membrana para formar un micronúcleo (Obiakor *et al.*, 2012; Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013; Torres & Ramos, 2013; Fenech, 2020; Rincón & Sánchez, 2021).

Los micronúcleos se pueden originar por la rotura de cadenas de ADN que no se reparan, el entrecruzamiento de estas y la formación de aductos que generan fragmentos cromosómicos acéntricos; por mala segregación de cromosomas durante la mitosis, rotura cromosómica dicéntrica o inestabilidad cromosómica, consecuencia de un agente genotóxico (Sommer, Buraczewska, Kruszewski., 2020). Los micronúcleos se pueden formar de modo general a través de fragmentos de cromátidas o cromosomas acéntricos

que, posterior a un daño en el ADN, se reordenan incorrectamente, lo que facilita intercambios cromosómicos asimétricos; o pueden ser cromátidas o cromosomas completos, que se forman por fallas en la segregación durante la anafase debido a daños en el huso mitótico, cinetocoro, hipometilación del ADN centromérico, por lo que no se incluyen en el núcleo principal durante la telofase (Figura 1) (Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013).

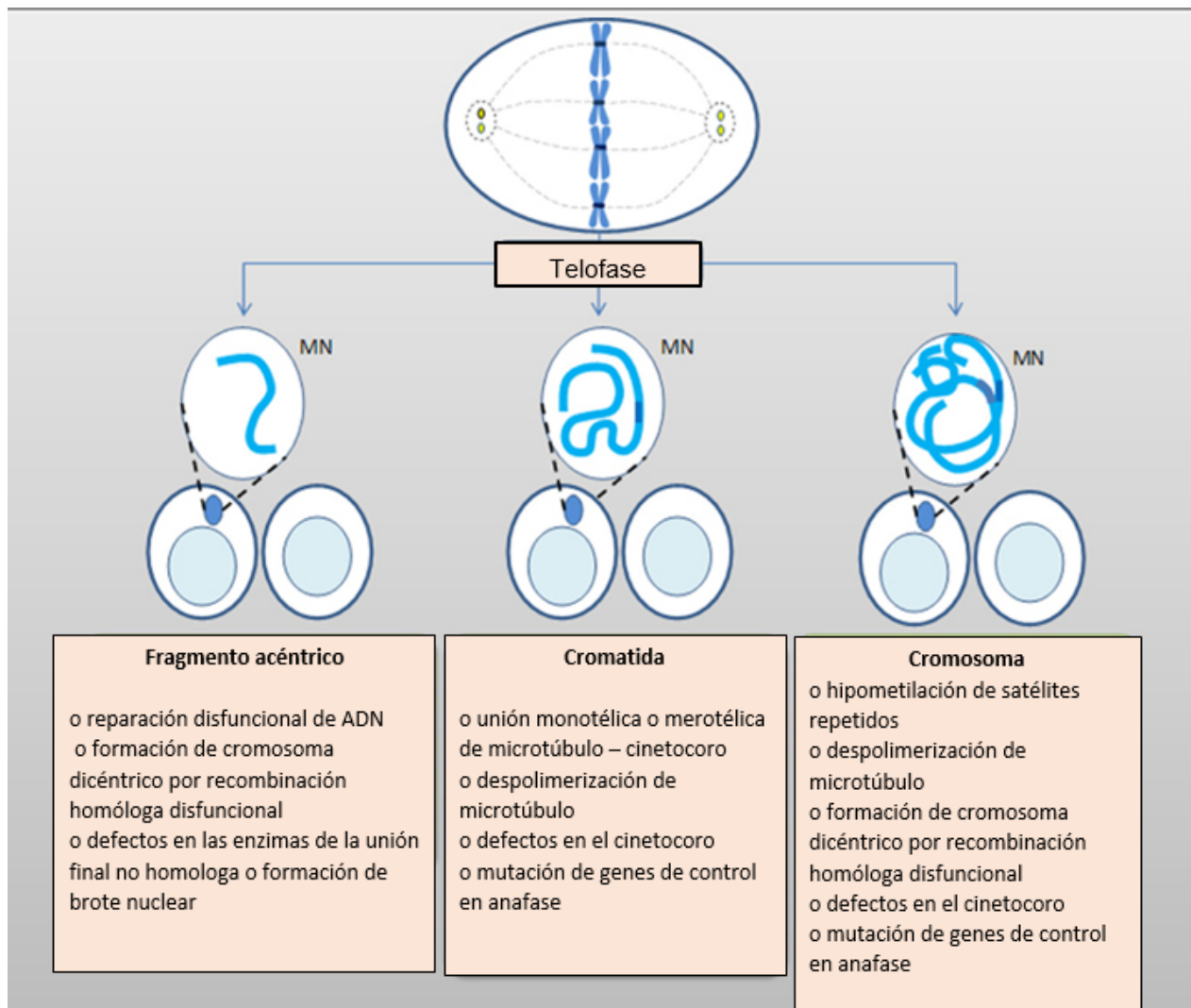


Figura 1. Mecanismos de formación de micronúcleos que contienen fragmentos acéntricos, cromátidas o cromosomas completos. Tomado y modificado de: Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, (2013).

Se considera que los eventos para formación de micronúcleos no son aislados, es decir pueden ocurrir simultáneamente, lo que conduce a un evento aditivo o sinérgico que provoca la aparición de otras anomalías nucleares, como: puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. La figura 2 describe las rutas para la formación de cada uno de ellos (Fenech, 2020).

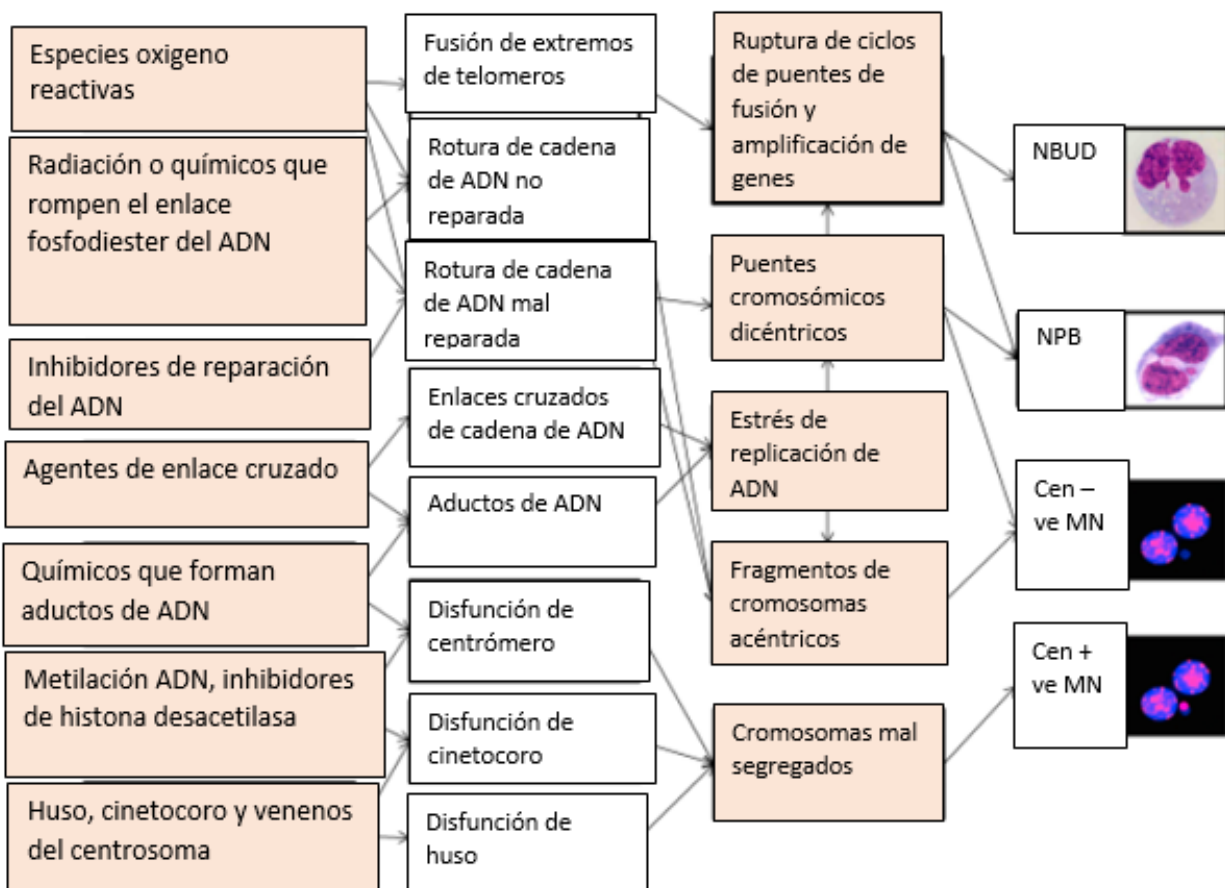


Figura 2. Mecanismos moleculares que conducen a la formación de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. Tomado y modificado de: Fenech, 2020.

En este proceso sinérgico de daño al ADN, pueden ocurrir eventos que provocan el reordenamiento de cromosomas o muerte celular y pueden conducir al desarrollo de neoplasias (Sastre & Ruiz, 2017). La rotura de ADN representa gran amenaza para las células, la alteración de ciclos de puentes de fusión y amplificación de genes, se

relacionan a la actividad telomérica y su control sobre duración de la vida de las células; los telómeros participan durante la mitosis en la regulación del número de divisiones celulares (Hernández, 1999); regulan la formación del huso mitótico y la inhibición de la horquilla de replicación, un anomalía en estas funciones crean susceptibilidad de daño genético, reordenamiento o reparación genómica erróneo y fusión de telómeros o cromosomas rotos que pueden producir cromosomas dicéntricos y conducir a ciclos de rotura – fusión – puente, que pueden desembocar en aneuploidías e implicar pérdida de material genético, en este caso, su biomarcador de presencia son la formación de puentes nucleoplásmicos, eventos comunes en el desarrollo del cáncer (Ligon, 2004, Umbreit *et al.*, 2020; Zamora, 2020; Carriquiriborde, 2021)

4.5 MERCURIO EN EL AMBIENTE

El Hg es un metal pesado líquido a temperatura ambiente, su número atómico es 80 y su punto de ebullición es 356.73°C (Nabí, 2014). Se encuentra comúnmente en la superficie terrestre como sulfuro de mercurio (HgS), es insoluble y se extrae del mineral conocido comúnmente como cinabrio. La distribución del Hg sobre la superficie terrestre se hace a través de dos ciclos; uno a nivel global, en el que circula como vapor de Hg elemental, afectando a la tierra y los océanos. A nivel local, el Hg se transforma en metilmercurio (CH_3Hg^+) por procesos de metilación llevados a cabo por microorganismos dentro de sistemas acuáticos, como bacterias, fito y zooplancton (Boening, 2000; García, *et al.*, 2017; Vargas & Marrugo, 2019).

Por décadas el empleo de metales pesados en procesos productivos industriales y agroindustriales, ha generado el vertimiento prolongando de contaminantes como el Hg al ambiente (Malmqvist & Rundle, 2002; Gworek, Dmuchowski & Baczewska, 2020). La versatilidad química de este metal facilita su aplicación en procesos de extracción minera, fabricación de elementos eléctricos y electrónicos, productos agroquímicos, médicos, odontológicos, y cosméticos.(Tchounwou *et al.*, 2012; Tibau & Grube, 2019; Yoshimura, Suemasu, & Veiga, 2021; Soe *et al.*, 2022).

A pesar de la resiliencia de los ecosistemas acuáticos por ser sistemas altamente dinámicos, con una biota capaz de autorregularse, estos no soportan la presión de carga contaminante del Hg y por lo tanto, altera los procesos biogeoquímicos, aumentando la disponibilidad del Hg en las cadenas tróficas: magnifica su potencial de transferencia y bioacumulación logrando permanecer en sedimentos y biota como los peces que son sustento alimenticio para diferentes comunidades (Lechler, *et al.*, 2000; Canuel *et al.*, 2011; Vargas & Marrugo, 2019).

4. 5.1 Biotransformación y bioacumulación de Hg en sistemas biológicos. El Hg se encuentra en tres estados de oxidación Hg^0 , Hg^+ y Hg^{2+} , su transformación en medio acuoso se realiza principalmente por organismos como las bacterias (Gao *et al.*, 2022). El proceso comprende la emisión previa de Hg^0 a la atmósfera y su precipitación por lluvias o la descarga de Hg elemental directamente al agua, pasando a formar parte de los sedimentos del agua en donde se transforma a través de complejo sistema con factores interdependientes (O'Connor *et al.*, 2019). Químicamente se puede convertir a una forma soluble como Hg^{2+} mediante una reacción de oxidación llevada a cabo por bacterias aeróbicas en el que participa una catalasa; o pueden convertirse mediante oxidación sulfuro de mercurio (HgS) a sulfato de mercurio ($HgSO_4$), este proceso nuevamente se puede invertir y volver a Hg^0 con la coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido (NADH) que pasa a ser NAD^+ , este último proceso, lo pueden llevar a cabo, por ejemplo, bacterias del género *Pseudomonas*, como mecanismo de desintoxicación, estos procesos que volatilizan e inmovilizan el Hg, actualmente se exploran como herramientas biorremediación de suelos contaminados con este metal (Figura 2) (Olivero & Johnson, 2002; Colombo *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2022; Ignatavičius *et al.*, 2022) .

El ión mercúrico Hg^{2+} se puede transformar en metilmercurio (CH_3Hg^+) o en dimetilmercurio ($(CH_3)_2Hg$), a través de dos rutas dependiendo del tipo de metabolismo aeróbico o anaeróbico, en este último la transformación es más rápida. La transformación de Hg inorgánico por metabolismo anaeróbico, se desarrolla por bacterias metanogénicas, o algunas reductoras de sulfato o hierro y microorganismos

fermentativos, acetogénicos y celulolíticos, se destacan: *Clostridium* y *Desulfovibrio*, en este proceso se puede emplear metilcobalamina que transfiere uno o dos grupos metilo (Olivero & Johnson, 2002; Chemaly, 2002; Lu *et al.*, 2016; Ma, Du & Wang, 2019). La segunda ruta se desarrolla por metabolismo aeróbico, inicia con la formación de un complejo entre Hg^{2+} y el grupo sulfidrilo de la cisteína, la cisteína puede mejorar la absorción y metilación de Hg, posteriormente, interviene una transmetilasa y un grupo donador de metilo que facilitan la separación del complejo; así finalmente, se obtiene el CH_3Hg^+ ; este proceso lo pueden desarrollar bacterias de géneros, como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, o especies, como: *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes*, se considera que esta ruta es de menor eficiencia al ser una posible respuesta pasiva al estrés por Hg y depender del nivel de intoxicación (Olivero & Johnson, 2002; Lin *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2021).

Una vez el Hg se encuentra en su forma orgánica en el medio acuático, ingresa a la cadena trófica a través de rutas como: dieta, difusión o por enlace a proteínas transportadoras presentes en los organismos, esto desencadena un proceso de bioacumulación que consiste en la acumulación interna de una sustancia química tanto en microorganismos, como: bacterias o algas y macroorganismos, como: plantas, invertebrados y vertebrados, de este modo, las concentraciones de Hg son más altas en los niveles superiores de la cadena trófica correspondiendo esto a un proceso denominado biomagnificación, ambos varían por nivel de contaminación, fisiología del grupo taxonómico que puede hacer más susceptibles a ciertas clases de organismos, de modo que existe un grado de vulnerabilidad diferenciado (Driscoll *et al.*, 2007; Canuel *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2022).

4.5.2 Potencial tóxico del metilmercurio. La toxicidad de los metales depende de su estado elemental, dosis, grado, duración de exposición y las características fisiológicas del receptor, como: edad, género, estado genético y nutricional (Balali-Mood *et al.*, 2021; Rajkumar & Gupta 2022).

El metilmercurio es un tóxico sistémico que aún en concentraciones bajas es capaz de inducir múltiples daños a diferentes órganos, su toxicidad está mediada por el bloqueo de los grupos reactivos tiol y selenol de las proteínas, que a su vez determina el potencial tóxico del metilmercurio, definido principalmente por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que causa estrés oxidativo a nivel celular, fenómeno que se considera parte de su patogénesis (Valko *et al.*, 2006; Nogara *et al.*, 2019; Fujimura & Usuki, 2020; Gochfeld & Burger, 2021).

El estrés oxidativo ocurre bajo un exceso de reacciones de oxidación, que produce incontroladamente moléculas altamente reactivas como radicales libres, ejemplo de ello son EROs, una serie de radicales formados sobre electrones no apareados de oxígeno, que si bien, son un atributo normal de la vida aeróbica y en condiciones normales actúan como mensajeros o reguladores a nivel celular de un amplio espectro de rutas que mantienen la homeostasis celular y control de factores de transcripción, una alteración del sistema antioxidante y EROs, es capaz de conducir mutaciones genómicas e inducir modificaciones irreversibles de proteínas, lípidos y glicanos, de este modo, pierden su funcionalidad y promueven la degeneración o muerte celular al desencadenar irregularidades en la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Checa & Aran, 2020; Sies & Jones, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Lo anterior, es consecuencia de que los compartimentos subcelulares que se relacionan a la producción y regulación de EROs, cumplen con funciones de regulación metabólica e inflamatoria en los que se incluyen el citoplasma, membrana celular, retículo endoplásmico, peroxisomas y mitocondrias, estos últimos organelos sobresalen debido a que en condiciones normales producen el 90% de EROs (Forrester *et al.*, 2018; Tirichen *et al.*, 2021). La pérdida de su funcionalidad, induce mutaciones en el ADN mitocondrial, daño de la cadena transportadora de electrones, cambio en la permeabilidad de la membrana y homeostasis del calcio, el cual está implicado en la activación de proteasas, endonucleasas y fosfolipasas responsables de la reparación del ADN (Valko *et al.* 2006; Guo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019); el daño se agudiza por falla en los ribosomas y el retículo endoplasmático, que afecta la transcripción y traducción, el metilmercurio puede

también intervenir en la formación del huso mitótico, destrucción de microtúbulos que origina defectos en la segregación cromosómica y además inducir el aumento moléculas neurotóxicas como serotonina, aspartato y glutamato (Jaishankar *et al.*, 2014; Tchounwou *et al.*, 2012; Valko *et al.*, 2006; Patrick, 2002).

A nivel sistémico, el metilmercurio puede conducir a enfermedades neurodegenerativas, como: Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, a través de la mediación o amplificación de la disfunción neuronal provocada por el estrés oxidativo en mitocondrias y retículo endoplásmico que dirigen rutas de apoptosis neuronal; destrucción de oligodendrocitos, depleción de la proteína básica de mielina y desmielinización (Guo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019; Shandilya *et al.* 2022); es peligroso para el desarrollo del feto al conducir daños cognitivos y motores tras la afectación de células de Purkinje (Aaseth *et al.*, 2020); contribuye a la progresión del cáncer, al desregularizar la localización de mitocondrias en la periferia celular para aumentar energía localizada con el fin de aumentar movilidad y metástasis tumoral (Ježek, Cooper & Strich, 2018); fomenta el desarrollo y progresión de la enfermedad renal crónica (Hasna *et al.*, 2021); se considera causa y contribuyente del desarrollo en trastornos del espectro autista (Yassa, 2014; Kern *et al.*, 2016; Jafari *et al.* 2020).

En otros grupos de vertebrados las repercusiones son de similar importancia fisiológica afecta el tamaño corporal, procesos reproductivos, de desarrollo, neurobiológicos, cognitivos, motores y sensoriales (Boening, 2000; Atta *et al.* 2012; Novo *et al.*, 2021); las neuronas embrionarias de mamíferos son susceptibles a neurotóxicos como el Hg (Abbott & Nigussue, 2021), durante el embarazo y lactancia de neonatos descendientes de ratones expuestos a metilmercurio se disminuye el número de neuronas motoras de la médula espinal y regulación a la baja de la proteína básica de mielina en diferentes segmentos de la médula en desarrollo (Da Silva *et al.*, 2022).

En consideración a esta problemática, la significancia del proceso de contaminación por Hg en salud pública fundamenta la necesidad urgente de desarrollar programas para minimizar su uso indiscriminado y garantizar la calidad de vida, la disponibilidad y

sostenibilidad de recursos naturales y alimentarios, no solo para comunidades humanas; sino también, para todas las formas de vida que pueden ser afectadas directa o indirectamente como las que habitan en las zonas de vertimientos y su influencia (Driscoll *et al.*, 2007; Olivero, Young & Caballero, 2013 ; Tchounwou *et al.*, 2012).

4.6 CONTEXTO TERRITORIAL DE LA MINERÍA EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

En Colombia la extracción de minerales como el oro hace parte de las estrategias económicas impulsadas por políticas minero-energéticas de desarrollo; sin embargo, sus prácticas no contemplan la afectación sociocultural y ambiental que éstas conllevan (CINEP/PPP, 2012). La explotación de recursos naturales como modelo productivo extractivista no posee ningún seguimiento ambiental y sus consecuencias se hacen más evidentes en departamentos como el Cauca, en el que confluyen diferentes problemáticas sociales que agravan el establecimiento de estos procesos.

Históricamente el Cauca ha mantenido sus tradiciones mineras y por restricciones geográficas e institucionales se ha facilitado la creación de distritos mineros con el propósito de articularse al mercado mundial; bajo este proceso, se han degradado ríos, bosques y ecosistemas, que tienden a la desaparición por la intensificación de esta actividad a la luz de ausencia de reservas naturales plenamente establecidas (Cortez & Gómez, 2015).

En el Cauca, uno de los municipios más azotados por la minería del oro es el municipio de Suarez, en el que se ha establecido como una economía ilegal, agudizada por el establecimiento de la represa la Salvajina, cuya represa representó para los pobladores locales entre otros el despojo de tierras, fomentando así la desigualdad económica y social. Entre sus habitantes, el 81,52% de su población se dedica a la minería artesanal especialmente después de la revelación de vetas de oro por remoción de tierras (Caicedo, 2017). A nivel nacional, el departamento del Cauca se ubica en el cuarto lugar dentro de los departamentos con mayor productividad de oro; actividad asociada directamente a la

carga de Hg contaminante que se vierte a las cuencas hidrográficas (Díaz-Arriaga, 2014). La cuenca del río Cauca como principal fuente hídrica de este municipio se ve afectada, dado que, a su paso por los municipios de Popayán, Santander de Quilichao, Puerto Tejada, Suarez y Buenos Aires, recibe descargas de aguas residuales e industriales, no sólo producto de la minería sino de las actividades agrícolas y pecuarias (Moreno Angulo, 2014).

En Colombia, la legislación constitucional ha determinado que las concentraciones admisibles de Hg en fuentes hídricas destinada para consumo humano deben ser menor a 2, 0 µg/L y para actividades pecuarias de 10, 0 µg/L y agrícolas de 0, 0 µg/L (Díaz-Arriaga, 2014); sin embargo, las concentraciones de Hg en fuentes hídricas incluidas las de consumo humano son más altas a las establecidas. En la cuenca alta del río Cauca en el departamento del Valle del Cauca se ha determinado concentraciones que varían de 0,00169 µg/ml hasta 0,02333 µg/ml (Vásquez, 2001).

4.7 *Leucostethus fraterdanieli* COMO ESPECIE PARA BIOMONITOREO AMBIENTAL

La idoneidad del empleo de anfibios como biomodelos se caracteriza por una fisiología básica conocida, ocupan diferentes hábitats con adaptaciones morfológicas y fisiológicas particulares y se han empleado como modelos para mamíferos y humanos, debido a que mantienen características como: una amplia diversidad filogenética y procesos de desarrollo embrionario que puede ser directo, acelerado en condiciones xerófilas, metamórfico y pedomórfico, así como cualidades regenerativas y de tolerancia a oxígeno y temperatura variable, sobreviviendo algunas especies a periodos de congelación, de este modo proveen material experimental para enfrentar innumerables incógnitas científicas (Burggren & Warburton, 2007; Murugan *et al.*, 2022).

Mecanismos de análisis molecular han permitido ampliar y en otros casos reducir el número de especies incluidas en algunos géneros de dendrobátidos (Frost *et al.*, 2006;

Rodríguez, 2020). Marin y colaboradores (2018) evaluaron el estado filogenético del complejo de *Colostethus fraterdanieli*, usando datos moleculares, morfológicos y bioacústicos, como resultado se transfirió al complejo *C. fraterdanieli* a *Leucostethus*, incrementando el número de especies en el género *Leucostethus* (7 sp.) y redujo las especies del género *Colostethus*; así el género *Leucostethus* lo conforman especies de ranas que poseen hábitos diurnos, coloración críptica y ausencia de veneno en la piel (Rodríguez, 2020)

Leucostethus fraterdanieli es una especie de rana endémica y abundante para Colombia (Figura 3), se distribuye en bosques secos húmedos tropicales y andinos nublados entre los 650 msnm hasta los 2900 msnm en los departamentos de Cauca, Nariño, Valle del Cauca, Huila, Tolima, Risaralda, Quindío, Caldas y Antioquia (Bernal & Lynch, 2008; Guevara, Benítez & Londoño, 2017). En el departamento del Cauca tiene una amplia distribución, se encuentra comúnmente en los alrededores de Popayán y en municipios cercanos como Piendamó y Santander de Quilichao (Consortio CCA Consultoría Plyma-Concesionario Nuevo Cauca, 2017).



Figura 3. Juvenil y Adulto de la especie *Leucostethus fraterdanieli*. Fuente: Elaboración propia.

Esta especie se encuentra en hábitats cercanos a cuerpos de agua, sobre hojarasca o vegetación de porte bajo. En su fase reproductiva, la postura de nidadas contiene entre 17 a 21 huevos, los cuales serán cargados en forma de larvas por el macho que los deposita en cuerpos de agua poco profundos con caudal suave para que continúen con su desarrollo metamórfico (Grant & Castro, 1998; Guevara et al., 2017).

Por estas razones esta especie, así como la mayoría de anfibios cuya historia natural está altamente ligada al agua, se establecen como bioindicadores para evaluar la calidad de los ecosistemas en los que habitan.

A nivel de la evaluación específica de genotoxicidad, histopatologías y bioacumulación para esta especie y la familia a la cual pertenecen, Dendrobatidae, no se han desarrollado estudios mucho menos se han contemplado como biomodelo, se resalta la importancia de considerar el empleo de organismos de diferente origen taxonómico como biomodelos para proveer una mayor diversidad de resultados que permitan visibilizar y contrastar la potencial vulnerabilidad a la que se enfrentan los organismos desde sus particularidades biológicas y de historia natural, puesto que cada familia presenta particularidades biológicas, genéticas y evolutivas que hacen que respondan de modo diferente al ambiente, por ello es necesario contemplar biomodelos distintos a *Xenopus laevis*, *Silurana tropicalis* y *Ambystoma mexicanum* y así desarrollar estudios de bioprospección y ecotoxicología con especies de distribución nacional y regional (Savage et al., 2014; Henao et al., 2021) que esten sometidas a las condiciones ambientales que se pretendan evaluar.

Leucostethus fraterdanieli, hace parte de la familia Dendrobatidae bajo la cual se encuentran especies amenazadas, no solo por la destrucción y contaminación del hábitat sino por su tráfico para comercio de mascotas (Guillory et al., 2019), por lo que requieren estrategias de conservación y evaluación de impacto ambiental frente a problemáticas regionales, como: la contaminación de cuerpos de agua por metales pesados producto de la minería aurífera, un escenario cotidiano en algunos municipios al norte del Cauca; bajo este escenario, se encuentran muchas especies de anfibios amenazados y

desarrollar protocolos que permitan acercar a esas especies con declive poblacional y riesgo de extinción hacia un plan de manejo, requiere desarrollo de herramientas con poblaciones taxonómicamente cercanas.

5 ANTECEDENTES

La contaminación por Hg a nivel mundial se ha datado desde la ocurrencia de graves tragedias ambientales que han evidenciado el potencial tóxico del Hg y el complejo de enfermedades y afectaciones en los que se involucra y que aun en la actualidad se siguen investigando para determinar los alcances de la toxicidad, ejemplo de ello es la tragedia de Minamata que ocurrió en Japón y se registró en 1956, en este hecho, vertimientos contaminados con Hg, procedentes de la empresa Chisso corp. productora de acetaldehído, llegaron a la bahía de Minamata, una vez en el agua, el Hg contamina los organismos marinos, se acumuló en ellos y se transfirió a través de la cadena trófica, afectó a los habitantes del área de influencia que se intoxicaron por consumir peces y mariscos contaminados, parte de la población afectada falleció o quedó con secuelas patológicas severas, que tienen como factor común el deterioro del sistema nervioso (Hachiya, 2006; García, *et al.*, 2017; Planes & Fuchs, 2015).

Años después, en 1981 se publica un caso de envenenamiento en Nicaragua, producto de la actividad industrial de una planta de cloro- álcali, propiedad de la empresa multinacional química y farmacéutica Pennwalt Inc., durante la producción de cloro y soda cáustica se vertieron más de 40 toneladas de Hg inorgánico sobre el lago Managua, en consecuencia, el 37% de los empleados evidenciaron síntomas de envenenamiento por Hg relacionados al sistema nervioso, que afectó las habilidades cognitivas y motoras, registrando así déficit de memoria – atención y parestesias (Hassan *et al.*, 1981). De modo similar ocurrió en Kazajstán, ubicado en Asia Central y considerado actualmente uno de los territorios más contaminados con Hg en el mundo, esto como resultado de la intensa actividad industrial que llevaron a cabo dos plantas de acetaldehído y cloro –álcali

de las ciudades de Temirtau y Pavlodar, durante 1950 hasta 1997. Se estima que más de 2000 toneladas de Hg elemental se vertieron al ambiente a través de emisiones atmosféricas y fugas descontroladas, descargas a cuerpos de agua y sedimentos, a la fecha se realizan labores de remediación pero existe una alerta continua y el peligro es latente puesto que las comunidades influenciadas aun obtienen recursos alimenticios de los cuerpos de agua asociados (Guney *et al.*, 2020).

Las actividades mineras también han contribuido en tragedias ambientales a gran escala, ejemplo de ello se registró en el año 2000 en Choropampa, Perú. En esta área, un camión que transportaba Hg para ser utilizado en la minera Yanacocha ubicada en Choropampa, derramó 151 kg de este metal. En el lugar hubo afectación no solo por Hg metálico, sino por inhalación de vapores de Hg resultado de la interacción del metal con las condiciones climáticas del área afectada y el traslado del mismo a las viviendas, hecho realizado principalmente por niños provenientes de familias que desconocían por completo la toxicidad del Hg. Esta tragedia afectó a más de mil campesinos, quienes presentaron problemas respiratorios, renales, sarpullidos, temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de memoria y afectación del sistema neuromuscular (Arana, 2009).

Considerando la importancia de establecer los mecanismos moleculares que se relacionan a la toxicidad del Hg, se han desarrollado a nivel mundial investigaciones en diferentes campos biológicos, a nivel genotóxico destacan contribuciones que se han obtenido de estudios como el de Queiroz y colaboradores (1999), quienes analizan la presencia de micronúcleos en linfocitos de trabajadores de una planta productora de Hg que han sido expuestos durante un aproximado de 12 años. La población evaluada presentó niveles de Hg en orina por debajo del límite aceptado de 50 ug/g de creatinina, sin embargo, se determinó un porcentaje de micronúcleos significativo respecto al grupo control, lo que indica que existe un efecto genotóxico del Hg, incluso a niveles establecidos como seguros (Queiroz *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta la importancia de los recursos alimenticios que son obtenidos por comunidades ribereñas que hacen uso de la fauna íctica como sustento nutricional, se han desarrollado estudios para identificar la problemática sobre este grupo de animales

con dirección a identificar qué consecuencias pueden tener este tipo de actividades. Destacan estudios como el de Oporto, Araújo y Feldberg (2005), que evalúan los efectos genotóxicos de la contaminación por Hg en tres especies de peces provenientes del río Madeira, establecida como área contaminada con Hg y Río Solimões como área no contaminada, dentro de la cuenca del Río Amazonas. Las frecuencia de micronúcleos de los individuos provenientes del Río Madeira, fueron significativamente mayores que las del Río Solimões, las especies piscívoras registraron una mayor frecuencia de micronúcleos que las detritívoras u omnívoras, indicando el efecto potencial del Hg al bioacumularse y biomagnificarse (Oporto, Araújo & Feldberg, 2005).

En 2009, Palacio y coinvestigadores, evalúan el estrés genotóxico mediante la prueba de micronúcleos en 11 especies ícticas en dos ambientes lénticos con diferente grado de contaminación y que hacen parte de las lagunas inundables de Cachimbero en Santander y Ayapel en Córdoba. La frecuencia de micronúcleos fue mayor en las especies provenientes de Ayapel, establecido como el área con mayor grado de contaminación, destaca por su sensibilidad *Cyphocharax magdalenae*, los autores relacionan los efectos a la presencia de Hg y de sustancias químicas persistentes, sugieren además que la prueba de micronúcleos es útil y efectiva para monitorear contaminantes ambientales y que es adecuado emplear especies con diferente sensibilidad biológica (Palacio *et al.*, 2009).

En este mismo año, Cavaş realiza un ensayo para evaluar la genotoxicidad del cloruro de Hg y acetato de plomo mediante el test de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica coloreados con naranja de acridina y en células epiteliales de branquias y aletas de *Carassius auratus auratus*, los peces fueron expuestos a tres concentraciones de cloruro de Hg, 1, 5 y 10 microg/L y tres concentraciones de acetato de plomo 10, 50 y 100 microg/L durante 2,4 y 6 días. Las frecuencias de micronúcleos aumentaron en relación a la contaminación por metales pesados, determinando además que las células branquiales tienen mayor sensibilidad que los eritrocitos y células de aletas, los resultados ratifican la genotoxicidad y citotoxicidad de Hg y plomo (Cavaş, 2009).

Nirchio y colaboradores (2019) evalúan los efectos genotóxicos del cloruro de mercurio en el pez *Andinoacara rivulatus*, con el propósito de comprender el efecto de metales pesados como el Hg en ecosistemas acuáticos y su interacción con redes tróficas al bioacumularse, para ello, expusieron a individuos de esta especie a tres dosis de cloruro de mercurio (HgCl_2) 0,1, 0,25 y 0,50 mg/kg de peso corporal, administradas mediante inyección intraperitoneal. Identificaron anomalías en eritrocitos de tipo micronúcleos, núcleos ampollados o con muescas y células binucleadas, proponen un nuevo mecanismo de formación de micronúcleos que corresponde a la fragmentación de la cromatina en núcleos con muescas en consecuencia de efectos citotóxicos y estrés mecánico por Hg.

Así mismo, se han realizado estudios para evaluar la genotoxicidad en otros grupos de vertebrados, sobresale el estudio de Kourt (2014) en el que analiza los efectos genotóxicos de diferentes metales pesados en la rana *Euphlyctis cyanophlyctis* en Jammu (India), determina que las mayores concentraciones de metales pesados aumentan las frecuencias de aberraciones cromosómicas y micronúcleos, especialmente en eritrocitos y células intestinales. Teniendo en cuenta la sensibilidad de los anfibios a la exposición de metales pesados, son ampliamente recomendados como biomonitores ambientales y resalta la importancia de tratar adecuadamente vertimientos contaminados con metales pesados, pues estos representan no solo una amenaza para la fauna anfibia sino para las comunidades humanas.

Colombia se ha consolidado como uno de los principales consumidores de Hg a nivel mundial (Brooks, 2012), por su naturaleza química no biodegradable, la contaminación por este metal pesado es una amenaza que perjudica la disponibilidad de recursos naturales, la salud ambiental (Reyes *et al.*, 2016), y es persistente por el aumento las minas ilegales de explotación aurífera asociadas a cuencas hidrográficas, por ello en el país se han desarrollado diferentes estudios encaminados a evaluar esta problemática, analizando el comportamiento del Hg en diferentes sistemas biológicos, en los que se destacan estudios de bioacumulación de Hg en peces (Marrugo, Benitez, Olivero, Lans & Gutiérrez, 2010; Olivero, 2010), que sobrepasan el límite de concentración permitido

en peces para consumo humano (0,5 µg/g). Se destacan especies como *Caranx hippos* con una concentración máxima de 2,45µg/g (Olivero & Johnson 2002), *Pseudopimelodus schultzi* con 2,01µg /g (Palacios, Caballero & Olivero, 2017) y en *Calophysus macropterus* 1,805 µg/g (Olivero, 2010), esta acumulación de Hg es común en peces carnívoros que se encuentran en un nivel superior de la red trófica acuática, son piscívoros y al consumir peces contaminados contribuyen al proceso de biomagnificación del Hg.

La preocupación por la contaminación de las principales fuentes hídricas del país y de la oferta alimenticia que albergan, han contribuido a que el mayor esfuerzo de investigación se desarrolle sobre la fauna íctica, algunos estudios han analizado los efectos genotóxicos del Hg sobre comunidades humanas, Madrid y colaboradores (2011) analizaron el efecto genotóxico de algunos metales pesados que incluyen al Hg en habitantes de una zona minera en la cuenca del río San Jorge en el departamento de Córdoba, las concentraciones de Hg excedieron el valor permitido (<5.8µg/L) por la agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA), registrando daños en el ADN con una frecuencia de aparición de micronúcleos de 0.18-2.56, sugiriendo que la liberación de metales pesados por la actividad minera tiene fuerte repercusión sobre el material genético y celular. Calao & Marrugo (2015) evaluaron los efectos genotóxicos de metales como el Hg, cadmio y plomo en habitantes expuestos a metales pesados de la región de la Mojana. La evaluación se hizo mediante el ensayo cometa y encontraron que las concentraciones de todos los metales sobrepasaron el límite permitido por la Organización Mundial de la Salud, y los daños al ADN fueron estadísticamente significativos, sugiriendo que las fuentes de contaminación son el agua, los alimentos y plaguicidas utilizados en la agricultura.

Pese a la problemática que representa la contaminación por Hg, y su constitución como una amenaza para la biodiversidad Colombiana, son escasos los estudios desarrollados en fauna diferente a especies ícticas; para algunas especies de mamíferos como el delfín, la nutria, murciélagos y el jaguar se han evaluado concentraciones de Hg (Racero, Pinedo, Ballesteros, & Marrugo,2017; Mosquera, Trujillo, Caicedo, & Martínez,

2015;Toro, 2013; Alfonso, Marrugo, & Pinedo, 2012; Madero & Marrugo, 2011), de estas se destaca las concentraciones de Hg encontradas en heces y mucosidad de la nutria *Lontra longicaudis* (Toro, 2013), que exceden el límite permitido de concentraciones de Hg para fauna silvestre que es $0.1\mu\text{g/g}$ propuesto por Eisler, (1985). Para el grupo de las aves, tan solo cinco especies han sido objeto de análisis de bioacumulación, de estas se destaca la especie *Egretta thula* cuyos huevos presentaron las mayores concentraciones de Hg, lo que probablemente podría representar una amenaza para la descendencia de esta especie (Burgos, Navarro, Marrugo, Enamorado, & Urango 2017; Burgos, Marrugo, Navarro & Urango, 2014; Olivero, Agudelo & Caballero 2013). La tortuga *Trachemys callirostris* es la única especie evaluada para el grupo de los reptiles, se destaca que el tejido muscular presentó la mayor concentración de Hg $0.39\mu\text{g/g}$ (Mosquera 2017; Zapata, Bock & Palacio 2014; Rendon, Zapata, Páez & Palacio 2014).

En los últimos años, Calao y colaboradores (2021) realizan un importante aporte científico al evaluar a los murciélagos como modelo centinela en la detección de agentes genotóxicos como el Hg en la región del Caribe Colombiano. Para ello, analizan muestras de sangre periférica, mediante el test de micronúcleos y la concentración de Hg en hígado y Bazo mediante espectroscopía de absorción atómica, de once especies de cuatro familias de diferentes gremios tróficos provenientes de Ayapel y Majagual que hacen parte de la región de la Mojana y que actualmente enfrenta problemas de contaminación ambiental consecuencia del vertimiento de desechos tóxicos producto de la minería ilegal en el sur de Bolívar, cuenca de San Jorge y Noreste de Antioquia. Las mayores concentraciones de Hg se registraron en individuos de Ayapel y la frecuencia de micronúcleos fue mayor en individuos de Majagual, en ambos casos destacan los murciélagos insectívoros, indicando así procesos de bioacumulación, contaminación por vías atmosférica y trascendencia en el nivel de afectación del Hg respecto a las funciones biológicas que desarrollan los mamíferos voladores, como la polinización (Calao *et al.*, 2021).

En anfibios el esfuerzo investigativo es similar al resto de fauna, exceptuando la íctica, dos investigaciones determinaron las concentraciones de Hg en cinco especies de

anfibios, en estos registros los renacuajos de *Rhinella margariifera* presentaron las mayores concentraciones de Hg con $0.1788\mu\text{g/g}$ (Hernández, Castro & Páez 2014; Peña, Cantera, & Muñoz (2012). En Colombia no se han desarrollado estudios de genotoxicidad sobre este grupo de vertebrados, sin embargo, Muñoz & Palacio (2010) evalúan los efectos del cloruro de Hg sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*, determinando que la concentración letal Cl_{50} a las 96 horas de exposición al cloruro de Hg fue $0,41\text{ mg/L}$, tres de las concentraciones ($0,04 - 0,08$ y $0,1\text{ mg/l HgCl}_2$) tuvieron efecto sobre el peso y la longitud de los renacuajos durante su desarrollo. Los autores relacionan este efecto a la capacidad del Hg para alterar las actividades enzimáticas lo que afecta el desarrollo fisiológico (Muñoz y Palacio, 2010).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en dos fases: la primera fase corresponde a la de campo en la que se colectaron renacuajos de la especie *Leucostethus fraterdanieli*. La segunda es la fase de laboratorio, que corresponde a la exposición y análisis experimental del efecto del cloruro de mercurio (HgCl_2) sobre los ejemplares colectados. La investigación se desarrolló bajo las consideraciones éticas para investigación científica establecidas por la Universidad del Cauca y basadas en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de salud.

9.1 FASE DE CAMPO

9.1.1 Área de estudio. La colecta de ejemplares se llevó a cabo en el corregimiento de Tunía, Municipio de Piendamó en el departamento del Cauca (Figura 4), en esta zona no se desarrolla ni tiene influencia de minería aurífera, mucho menos de exposición a metales pesados. Para la colecta de ejemplares se establecieron transectos en predios privados con coordenadas geográficas: N 2.677586 -W 76.530227 y N 2.674461- W 76.536298, estos corresponden a sitios en los que se identificó previamente individuos de esta especie.

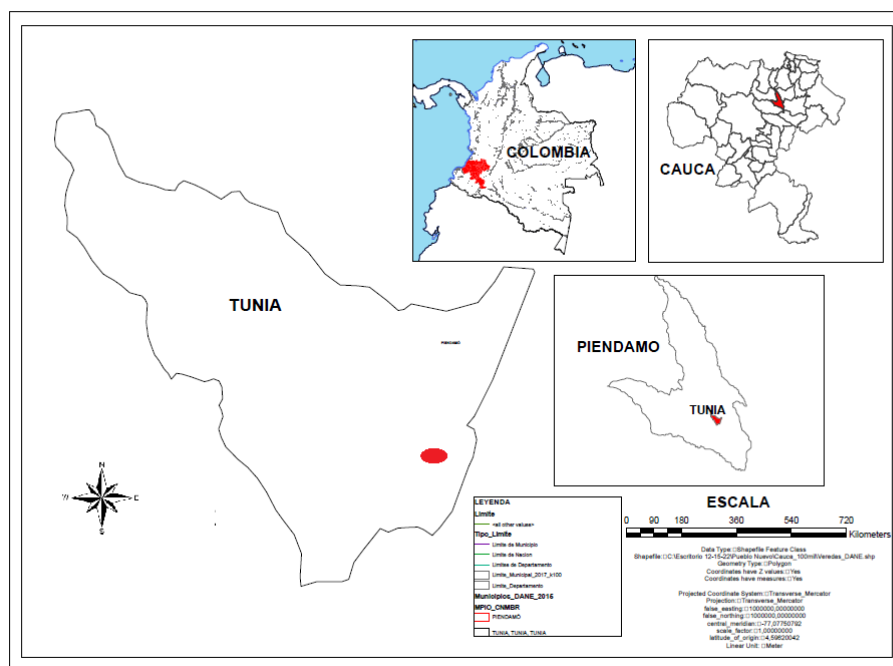


Figura 4: Ubicación geográfica del área de estudio en el corregimiento de Tunía - Municipio de Piendamó en el departamento del Cauca. Elaboración propia.

9.1.2 Colecta de ejemplares. Con el objetivo de coleccionar renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* en estadios entre 26 y 36 según la clasificación de Gosner (1960) que define la etapa de premetamorfosis en los que apenas comienzan a surgir extremidades inferiores; se realizaron recorridos diurnos en transectos libres delimitados por tiempo y dirigido a fuentes de agua (Angulo, et al., 2006; Rueda, et al., 2006). Este método de colecta se aplicó desde las 9 am a 4pm.

9.2 FASE DE LABORATORIO

6.7.1 Implementación de sistema de cautiverio. La implementación del acuario y condiciones de cautiverio se aplicaron de acuerdo a lo establecido por Muñoz y Palacio (2010), con algunas modificaciones para este estudio. El sistema se dispuso en el área de investigación del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC - Bioterio). En esta etapa, se inició la fase de aclimatación, para ello se depositaron los renacuajos en recipientes de vidrio, inicialmente con agua proveniente

del lugar de colecta hasta el cambio total con agua dulce reconstituida tipo suave que se preparó con bicarbonato de sodio (NaHCO_3), sulfato de calcio (CaSO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4), cloruro de potasio (KCl) y agua destilada (Ramírez et al., 2018), este procedimiento se desarrolló durante 14 días. Para lograr el cambio total de agua en los acuarios, cada 24 horas se cambió el 25% del agua original.

Las variables microclimáticas y fisicoquímicas que se establecieron para el sistema de cautiverio corresponden a las reportadas por Muñoz y Palacio (2010) y las registradas para el río la teta por Chindicue & Rivera (2017), se definieron como: temperatura entre 19°C – 21°C , fotoperiodo 14:10 de luz: oscuridad, pH básico, concentración de oxígeno disuelto 6,4 mg/L (Muñoz & Palacio, 2010; Chindicue & Rivera, 2017). Durante el experimento los renacuajos se alimentaron con comida comercial para peces según consideraciones de Cortés y colaboradores (2004) y de Muñoz y Palacio (2010) (Cortez et al., 2004; Muñoz & Palacio, 2010).

6.7.2 Exposición a mercurio. La preparación de las concentraciones experimentales correspondiente a agua contaminada con Hg se realizó con cloruro de mercurio (HgCl_2) que es una sal soluble en agua, para ello se preparó una solución *stock* en la que se disuelve cloruro de mercurio sólido (HgCl_2) y se realizaron diluciones hasta alcanzar las concentraciones establecidas de Hg en el medio (Muñoz & Palacio, 2010), se tomaron como referencia las concentraciones de Hg registradas en una de las áreas con mayor problemática ambiental del departamento del Cauca, consecuencia de intensas actividades mineras que descargan altas concentraciones de Hg al agua, el río la Teta del municipio de Buenos Aires (Cauca), reportadas por Chindicue & Rivera, 2017 y UPME 2015.

En este proceso se utilizaron 4 diluciones de agua con cloruro de Hg, la concentración de $123,2\mu\text{g/L}$, valor registrado por UPME (2015) se estableció como el rango máximo de dilución y la concentración $13,6\mu\text{g/L}$ (Chindicue & Rivera, 2017) se estableció como el rango mínimo de dilución, las concentraciones finales empleadas se describen en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Relación de la concentración de Hg para cada uno de los grupos a evaluar.

GRUPO	Concentración Hg ($\mu\text{g/L}$)
1	13,6 $\mu\text{g/L}$
2	50.13 $\mu\text{g/L}$
3	86.66 $\mu\text{g/L}$
4	123,2 $\mu\text{g/L}$

La solución correspondiente a cada concentración de Hg se renovó cada 48 horas y el tiempo total de exposición fue de 144 horas. Se estableció un grupo control que no se sometió a exposición con Hg; finalmente, todos los grupos del modelo experimental se controlaron cada 12 horas, tiempo en el que se consideró nivel de actividad, patrones de comportamiento y eventuales muertes.

6.7.3 Diseño experimental. Un total de 108 renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* fueron empleados para el proceso experimental, el ensayo se llevó a cabo por triplicado con grupos de 6 renacuajos. Se evaluaron las 4 concentraciones problema, un control negativo que consistió en el agua dulce reconstituida sin Hg y un control positivo que se constituyó con agua dulce reconstituida y ciclofosfamida (5 mg/L). Se realizaron extracciones de sangre en intervalos de 48 horas durante 6 días, en las que se tomaron 2 individuos de cada una de las repeticiones para un total de 6 individuos de cada una de las concentraciones, todos los individuos se sometieron a eutanasia y dispusieron para realizar los bioensayos que a continuación se describen.

6.8 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

9.3.1 Análisis de Genotoxicidad. Para realizar la metodología de micronúcleos (Mns) se evaluó la frecuencia de Mns en sangre de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*, para ello se siguió los parámetros establecidos por Lajmmanovich y colaboradores (2005)

con algunas modificaciones (Lajmmanovich *et al.*, 2005). Se extrajo sangre por punción directa al corazón y se realizó un extendido en placas de vidrio por cada individuo, se dejaron secar al aire por 24 horas, se fijaron en metanol por 20 minutos y las placas se colorearon con Giemsa al 5% durante 12 minutos.

La evaluación de extendidos sanguíneos se desarrolló en el laboratorio Múltiple de la facultad de ciencias agrarias de la Universidad del Cauca, usando un microscopio de luz modelo LEICA DM750 con aumento de 100X. La frecuencia de micronúcleos se determinó al contar 1000 eritrocitos por cada recuento. El conteo se realizó con el sistema doble ciego, según las consideraciones de Campana y colaboradores (2003) y Silva y colaboradores (2021), en el que un único investigador realiza la evaluación de los extendidos sanguíneos y por bloqueo visual no puede reconocer a qué tratamiento corresponde el extendido (Campana *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2021).

El daño sobre el ADN se analizó teniendo en cuenta la frecuencia de aparición de micronúcleos (**FAM**) como lo plantean Madrid y colaboradores (2011) (Madrid *et al.*, 2021) bajo la relación:

$$\mathbf{FAM} = \left[\frac{\text{Número de eritrocitos encontrados en cada lámina}}{\text{Número de micronúcleos encontrados}} \right] \times 100$$

Los criterios para la identificación de micronúcleos son los establecidos por Fenech y colaboradores (2003) y Lajmmanovich y colaboradores (2005) (Fenech *et al.*, 2003; Lajmmanovich *et al.*, 2005), quienes consideran que:

- El conteo de micronúcleos se debe realizar sobre células viables
- El diámetro de MCN debe oscilar entre 1/16 y 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
- Los MCN no son refractarios
- Deben tener una intensidad de tinción y forma similar al núcleo principales

- No estar conectado con el núcleo principal
- Puede tocar el núcleo, pero no solaparse

La evaluación de extendidos sanguíneos permitió determinar diferentes anomalías en los eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli*, cada uno de estos se registró fotográficamente en la Unidad de Microscopía Electrónica (UME), a través de microscopio Nikon eclipse 80i y el programa NIS elements F.

9.3.2 Análisis histopatológicos. El análisis se realizó según los planteamientos metodológicos de Mojica (2012) y Jayawardena y colaboradores (2017) con algunas modificaciones (Mojica, 2012; Jayawardena *et al.*, 2017). En este proceso y posterior a la eutanasia, las muestras se separaron considerando el proceso evaluativo, para procesamiento con parafina se preservó el renacuajo (cuerpo completo) en formalina buferada al 10% y para evaluación de ultraestructuras con aplicación de técnicas de microscopía electrónica se preservó en glutaraldehído al 2% únicamente el hígado.

Las muestras preservadas en formalina buferada al 10%, se lavaron con agua destilada por 24 horas, posteriormente se sometieron a deshidratación por baño en serie de etanol (30%; 50%; 70%; 80%; 90%; 95%; 100%) y a un agente aclarante xilol para finalmente agregarse en una matriz de parafina. En seguida, se realizaron cortes del cuerpo completo de los renacuajos, utilizando un micrótopo Leica/ ultracut UCT en secciones con un grosor de 5-8 μ m y finalmente se sometieron a tinción doble con hematoxilina y eosina.

La identificación y diferenciación histológica se realizó comparando con documentación de referencia para anfibios, según el atlas histológico de *Xenopus laevis* de Wiechmann & Wiechmann (2003), con ello se describieron los principales hallazgos, dirigidos a tejido hepático. El tejido hepático preservado se proceso para evaluación ultraestructural, para ello, las muestras se lavaron tres veces con PBS, se fijaron en glutaraldehído al 3% durante dos horas a 37°C y se post fijaron en 1% de OsO₄ durante dos horas a 4°C; posteriormente, los tejidos se lavaron en tampón fosfato de sodio 0,1 M con pH 7,3 y se

deshidrataron a través de una batería creciente de etanol (25%: 50%: 70%: 80%: 90%: 95%: 100%), luego los tejidos se infiltraron y polimerizaron en resina EMBED 812 (EMS) durante 72 horas a 60°C. Con los preparados se realizaron cortes semifinos (0,5 µm) en ultramicrotomo Leica modelo ultracut R y se colorearon con 1% de azul de toluidina. Finalmente se tomaron microfotografías con un microscopio Nikon eclipse 80i, acoplado a una cámara Nikon Digital Sight- DS- SmV y se fotografiaron haciendo uso del programa NIS elements F.

9.3.4 Análisis de mercurio absorbido por *Leucostethus fraterdanieli*

La medición de Hg se realizó a través de espectroscopia de Absorción Atómica con Vapor frío (EAAVF) en la que Hg^{2+} se reduce a Hg^0 , este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de química analítica ambiental (GIQA) de la Universidad del Cauca; se evaluaron muestras compuestas, conformadas por tres individuos (cuerpo completo) para cada concentración, tomadas a las 48 y 144 horas de exposición, el uso de muestras compuestas buscó garantizar la lectura de las concentraciones mínimas de Hg. El proceso inició con la digestión y oxidación de cada muestra, para ello, los tejidos se secaron a 60°C durante 12 horas, se pesaron y se sometieron a digestión ácida con la adición de 5mL de ácido nítrico concentrado durante 6 horas a 60°C, controlando que estos parámetros sean constantes para evitar la degradación de la muestra; por último, se realizó el proceso de oxidación para obtener el Hg en estado elemental, para ello a 10ml de muestra se agregaron 5mL de H_2SO_4 , 2.5 mL de HNO_3 y 15 mL de $KMnO_4$, la oxidación se llevó a cabo en baño maría a 80°C, las lecturas se tomaron por triplicado con el equipo Thermo Scientific - serie ICE 3000.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para los análisis de efecto genotóxico y bioacumulación, los datos se expresaron como los valores de la media y la desviación estándar ($\bar{x} \pm DE$) de cada tratamiento. Se aplicó pruebas de normalidad a los valores con el estadístico de Shapiro Wilks ($\alpha=0,05$). Y homogeneidad de varianzas con el Test de Levene. Las diferencias estadísticas de los

datos se determinaron a través de pruebas no paramétricas, considerando que los datos no se ajustaron a los supuestos de normalidad y homogeneidad, para ello se usó el test de Kruskal wallis y Pos Hoc Bonferroni con ajuste a la mediana, así se evaluó el factor que corresponde a los tratamientos: Control positivo, negativo y las cuatro concentraciones de Hg en cada uno de los tiempos de exposición: 48 h, 96 h y 144 h, valores de $p < 0.05^*$, fueron considerados significativos, estos test se realizaron usando el software GraphPad Prisma 5.03 y BioEstat 5.0. El análisis de dosis dependencia se llevó a cabo en el programa BioEstat 5.0 en el que se evaluó la normalidad de los datos y considerando que se ajustaron a los supuestos de normalidad, se aplicó la correlación de Pearson en el cual la significancia establecida fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la fase de campo se capturaron renacuajos de la especie *Leucostethus fraterdanieli* en diferentes estadios de desarrollo, por ello la fase de aclimatación y mantenimiento en cautiverio se prolongó por 24 días, las características morfométricas de los individuos empleados en el experimento, se describen en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Medidas morfométricas promedio de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* empleados en el experimento.

n	Estadios	Longitud rostro – cloaca (mm)	Ancho del cuerpo (mm)	Largo total (mm)	Peso (g)
108	30 - 36	12,78	7,55	36,01	0,358

* medidas tomadas 1 día previo al desarrollo experimental.

Análisis genotoxicidad

En total 6.000 eritrocitos fueron contabilizados para cada concentración de Hg, control negativo y positivo en cada intervalo de tiempo (48; 96; 144h), para ello, en cada evento de evaluación, se tomaron 2 muestras por cada una de las repeticiones realizadas en cada tratamiento, para un total de 6 muestras tomadas tanto para las cuatro

concentraciones problema, el control positivo y control negativo en cada tiempo de exposición establecido, de cada muestra/individuo se contabilizó 1000 eritrocitos.

Los eritrocitos maduros de *Leucostethus fraterdanieli* se caracterizaron por tener una forma oval oblonga con núcleo céntrico bien definido, los micronúcleos observados correspondieron a estructuras esféricas bien definidas y separadas del núcleo principal (Figura 5).

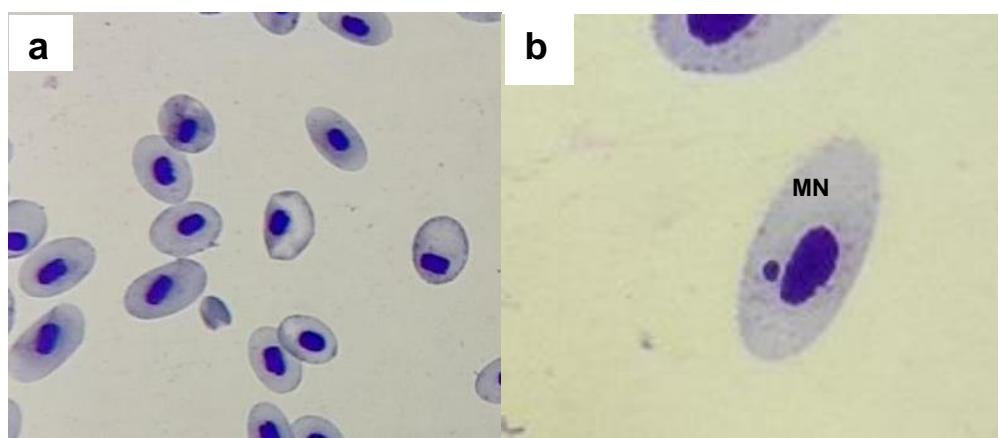


Figura 5. Eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli* (a) Normales. (b) Micronúcleo (MN) (Aumento 100x).

La evaluación de genotoxicidad del Hg mediante la inducción de micronúcleos en eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli* determinó una frecuencia basal de micronúcleos entre el rango promedio de $0,55 \pm 0,18$ a $0,63 \pm 0,30$ establecida sin ningún tipo de exposición a contaminantes y se considera en este estudio, el rango normal de aparición de micronúcleos; en contraste se empleó la ciclofosfamida, un compuesto genotóxico conocido y ampliamente usado como control positivo en el test de micronúcleos para renacuajos debido a su naturaleza alquilante y facultad de incrementar las frecuencias de micronúcleos (Zoll -Moreux & Ferrier, 1999; Campana, Panzer, Moreno & Duolut, 2003; Lajmanovich, Cabagna, Peltzer, Stringhini & Attademo, 2005). El ensayo con ciclofosfamida determinó la máxima frecuencia de micronúcleos alcanzada en el experimento, que corresponde a $5,4 \pm 2,31$ bajo 144h de exposición, el comportamiento de este genotóxico fue la referencia del presente análisis.

Los datos obtenidos no se ajustaron a los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas ($p < 0,05$), por ello se aplicó la prueba no paramétrica de análisis de varianza de Kruskal Wallis, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni. Los resultados indican que la mayor frecuencia de micronúcleos se observó a las 48h con las concentraciones 86,66 y 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ las cuales fueron estadísticamente significativas $p < 0,05$ al compararse con el control negativo respectivamente (Tabla 3). A las 96 horas de exposición, se observa que la formación de micronúcleos en la concentración 86,66 $\mu\text{gHg/L}$ presentó el mayor valor después del control positivo, esta frecuencia de micronúcleos es menor a las presentadas por esta misma concentración a las 48 h, es decir disminuyó con el tiempo. Finalmente a las 144 horas, únicamente se observó diferencias significativas en la concentración 50,13 $\mu\text{gHg/L}$ y el control positivo respecto al control negativo .

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones de Hg ($\bar{X} + \text{SE}$)

Concentración	n*	48 h $\bar{X} + \text{SE}$	96 h $\bar{X} + \text{SE}$	144 h $\bar{X} + \text{SE}$
Control negativo	6	0,55 \pm 0,18	0,6 \pm 0,26	0,63 \pm 0,30
13,6 $\mu\text{gHg/L}$	6	1,516 \pm 0,64	2,2 \pm 1,0	1,71 \pm 0,89
50,13 $\mu\text{gHg/L}$	6	2,1 \pm 1,37	2 \pm 1,03	3,18 \pm 0,55*
86,66 $\mu\text{gHg/L}$	6	3,63 \pm 0,43 *	3,4 \pm 1,04	1,78 \pm 1,46
123,2 $\mu\text{gHg/L}$	6	3,71 \pm 1,07 *	3,23 \pm 1,70	2,18 \pm 1,02
Control positivo	6	1,98 \pm 1,06	4,73 \pm 1,70 *	5,4 \pm 2,31 *

* n evaluado en cada intervalo de tiempo y concentración. $p < 0.05$ * comparado con control negativo (Prueba de Kruskal Wallis). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni. Control positivo: Ciclofosfamida 5mg/L Control negativo: Agua dulce reconstituida.

Se observó que la frecuencia de micronúcleos durante la primera fase de contaminación (48h) aumentó, en los eventos subsiguientes de evaluación se observó disminución en las mismas (Figura 6) .

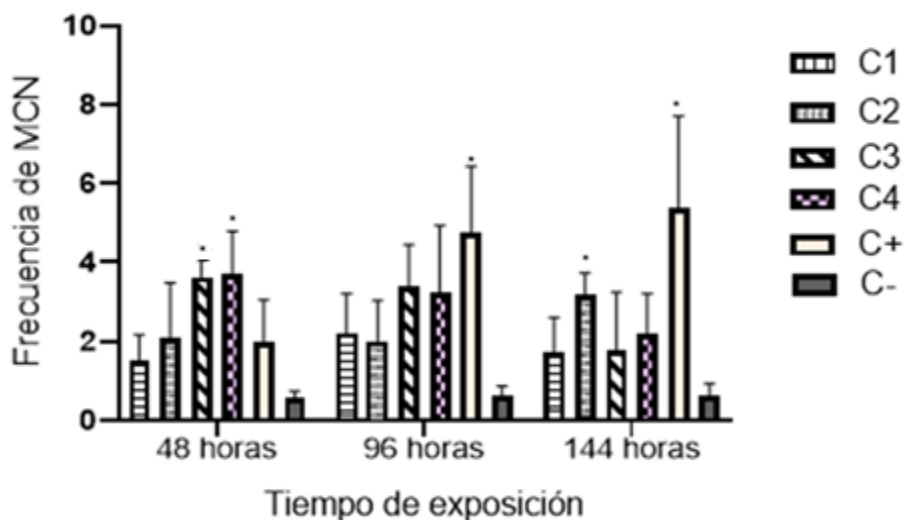


Figura 6. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones de Hg ($\bar{X} + SE$). $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$ comparado al control negativo

La frecuencia de micronúcleos presentada en eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli* muestra dosis dependencia significativa en las primeras 48 horas ($r = 0,7014$ $p < 0,05$), el análisis de correlación de Pearson indicó una fuerte correlación positiva en este intervalo de tiempo de exposición, entre la frecuencia de micronúcleos y las 4 concentraciones experimentales de Hg (Figura 7), es decir que en este intervalo de tiempo al aumentar la concentración de Hg experimental, aumenta la frecuencia de micronúcleos, posterior a ello la correlación disminuye, los coeficientes de correlación a las 96 establecieron una correlación si bien significativa moderada ($r = 0,4414$ $p < 0,05$) y a las 144 horas fueron menores sin evidencia de significancia estadística ($r = 0,017$ $p > 0,05$), es decir que después del primer intervalo de evaluación de la frecuencia de micronúcleos (48h), la correlación disminuye hasta perder significancia.

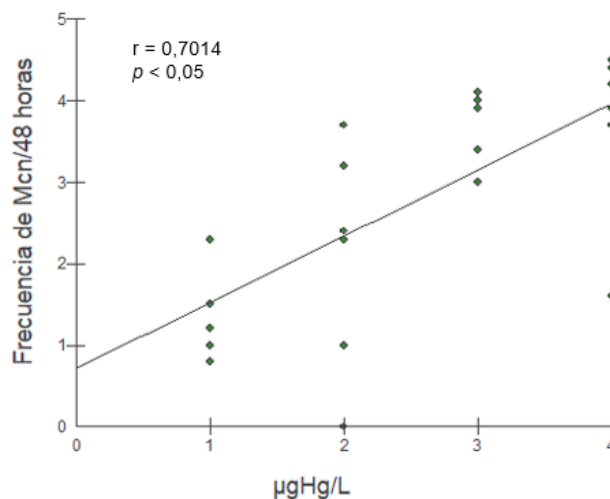
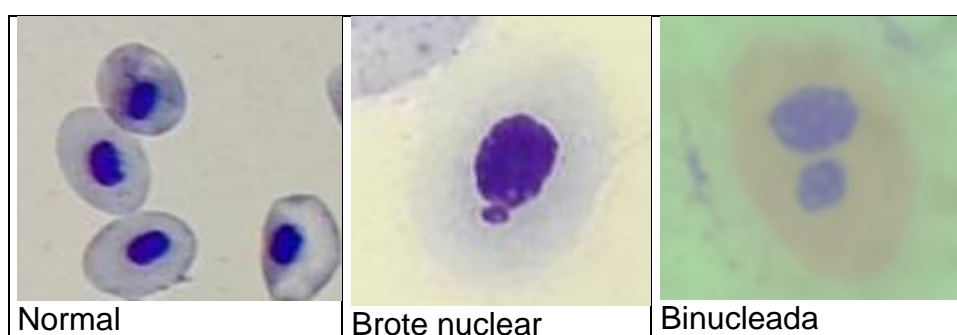


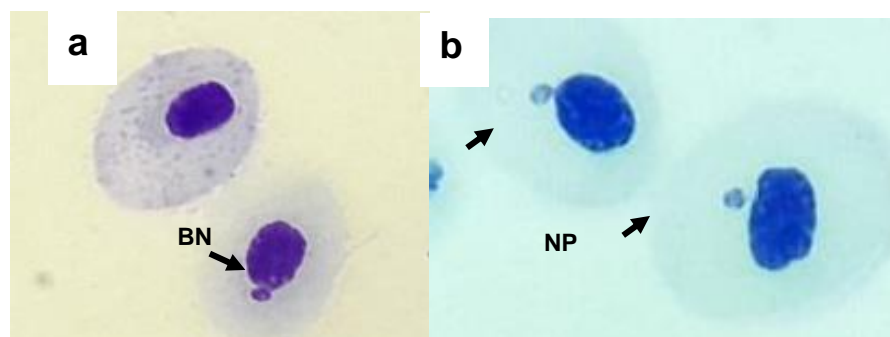
Figura 7. Correlación positiva entre la frecuencia de micronúcleos y las concentraciones de Hg experimentales durante las primeras 48 horas de exposición.

La evaluación de los eritrocitos de las placas tomadas a las 96h y 144h, evidenciaron diferentes aberraciones nucleares, como las descritas por Benvindo- Souza y colaboradores en 2019 (Benvindo – Souza *et al.*, 2019), de estas destacaron los brotes nucleares, binúcleos, núcleos mellados, núcleos ariñonados y núcleos lobulados (Figura 8).



Considerando los aportes realizados por Fenech y colaboradores (2011) respecto a la aparición de anomalías nucleares ligadas a eventos genotóxicos, como la formación de puentes núcleo – plásmicos (NP) y brotes nucleares (BN), se procedió a contabilizar cada tipo de aberración, bajo las mismas consideraciones establecidas para

micronúcleos. NP y BN se han establecido como biomarcadores de eventos genotóxicos e inestabilidad cromosómica (Figura 9) (Fenech *et al.*, 2011).



Anormalidades nucleares ligadas a eventos genotóxicos en eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli*. (a). Brote nuclear. (b). puente nucleoplásmico.

La frecuencia de brotes nucleares (FBN), responde a un efecto de dosis dependencia moderado a leve desde las 96 horas a 144 horas, en estos intervalos de evaluación se determinó una correlación de Pearson significativas $r = 0,5229$ y $0,4262$ respectivamente ($p < 0,05$), se observó un incremento de las anomalías a través de la mayor exposición en tiempo y concentración de Hg; a las 48 horas, dos concentraciones de Hg 86,66 y 123,2 $\mu\text{gHg/L}$, evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en FBN respecto al grupo control; a las 96 horas, la FBN registradas a 123,2 $\mu\text{gHg/L}$, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación al control negativo, finalmente, en la exposición realizada durante 144 horas se evidenció que las concentraciones 50,13, 86,66 , 123,2 $\mu\text{gHg/L}$, aumentaron la FBN y fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control (Tabla 4)

Frecuencia de brotes nucleares en eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

Concentración	n*	48 h $\bar{X} \pm \text{SD}$	96 h $\bar{X} \pm \text{SD}$	144 h $\bar{X} \pm \text{SD}$
Control negativo	6	0,966 \pm 0,41	1,2 \pm 0,36	0,86 \pm 0,39
13,6 $\mu\text{gHg/L}$	6	6,08 \pm 2,94	4,75 \pm 3,5	2,26 \pm 1,31
50,13 $\mu\text{gHg/L}$	6	4,45 \pm 2,65	2,91 \pm 2,05	6,86 \pm 1,81*
86,66 $\mu\text{gHg/L}$	6	4,48 \pm 1,14*	4,4 \pm 1,36	5,35 \pm 3,62
123,2 $\mu\text{gHg/L}$	6	4,55 \pm 0,84*	14,9 \pm 9, 8*	6,66 \pm 2,72*
Control positivo	6	3,55 \pm 1,73	6,58 \pm 1,2*	7,08 \pm 2,35*

* n evaluado en cada intervalo de tiempo y concentración. $p < 0.05$ * comparado con control negativo (Prueba de Kruskal Wallis). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni. Control positivo: Ciclofosfamida 5mg/L Control negativo: Agua dulce reconstituida.

La frecuencia de puentes nucleoplásmicos (FPN) evidencia un efecto de dosis dependiente negativo en las primas 48 horas de evaluación ($r = -0,4303$ $p < 0,05$), los valores r Pearson calculados en cada intervalo de evaluación a continuación (96 h y 144h), tienen a disminuir y alcanzar valores de cero, es decir que a mayor tiempo de exposición sobre las diferentes concentraciones evaluadas no se determinan frecuencias de puentes nucleoplásmicos significativos (96 h $r = 0,1054$; 144 h $r = 0$ $p < 0,05$). Las primeras 48 horas de exposición permitieron evidenciar que las concentraciones 13,6 $\mu\text{gHg/L}$ y 86,66 $\mu\text{gHg/L}$ presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) de este tipo de aberración, a las 96 horas se estableció en la concentración 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ un FPN significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto al grupo control (Tabla 5), a las 144 horas se observa un valor significativo en el grupo control positivo.

Frecuencia de puentes nucleoplásmicos en eritrocitos de renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

Concentración	n*	48 h $\bar{X} \pm \text{SD}$	96 h $\bar{X} \pm \text{SD}$	144 h $\bar{X} \pm \text{SD}$
Control negativo	6	0,15 \pm 0,13	0,23 \pm 0,17	0,18 \pm 0,18
13,6 $\mu\text{gHg/L}$	6	1,18 \pm 0,68 *	1,033 \pm 0,72	0,48 \pm 0,24
50,13 $\mu\text{gHg/L}$	6	0,55 \pm 0,27	0,51 \pm 0,64	0,58 \pm 0,69
86,66 $\mu\text{gHg/L}$	6	0,91 \pm 0,40*	0,43 \pm 0,28	0,56 \pm 0,42
123,2 $\mu\text{gHg/L}$	6	0,26 \pm 0,21	1,55 \pm 0,78 *	0,46 \pm 0,25
Control positivo	6	0,65 \pm 0,24	0,95 \pm 0,45	1,06 \pm 0,24*

* n evaluado en cada intervalo de tiempo y concentración. $p < 0.05$ * comparado con control negativo (Prueba de Kruskal Wallis). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni. Control positivo: Ciclofosfamida 5mg/L Control negativo: Agua dulce reconstituida.

Análisis histológico del tejido hepático de *Leucostethus fraterdanieli*

En la examinación histológica de las microestructuras del tejido hepático de los renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* del control negativo, se identificó tejido con estructura homogénea respecto a las formas regulares de las células como los hepatocitos (HPC), se observaron centros melanomacrofagos (MMC), espacios sinusoidales (ES) y eritrocitos (ER) (Figura 10 a-b). Se observaron leves cambios histológicos en el tejido hepático de los individuos expuestos a Hg; la exposición a la concentración intermedia 50,13 $\mu\text{gHg/L}$ (Figura 10 c-d) y alta 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ (Figura 10 e-f) provocaron a las 96 y 144 horas respectivamente, un fenómeno de vacuolización (VN).

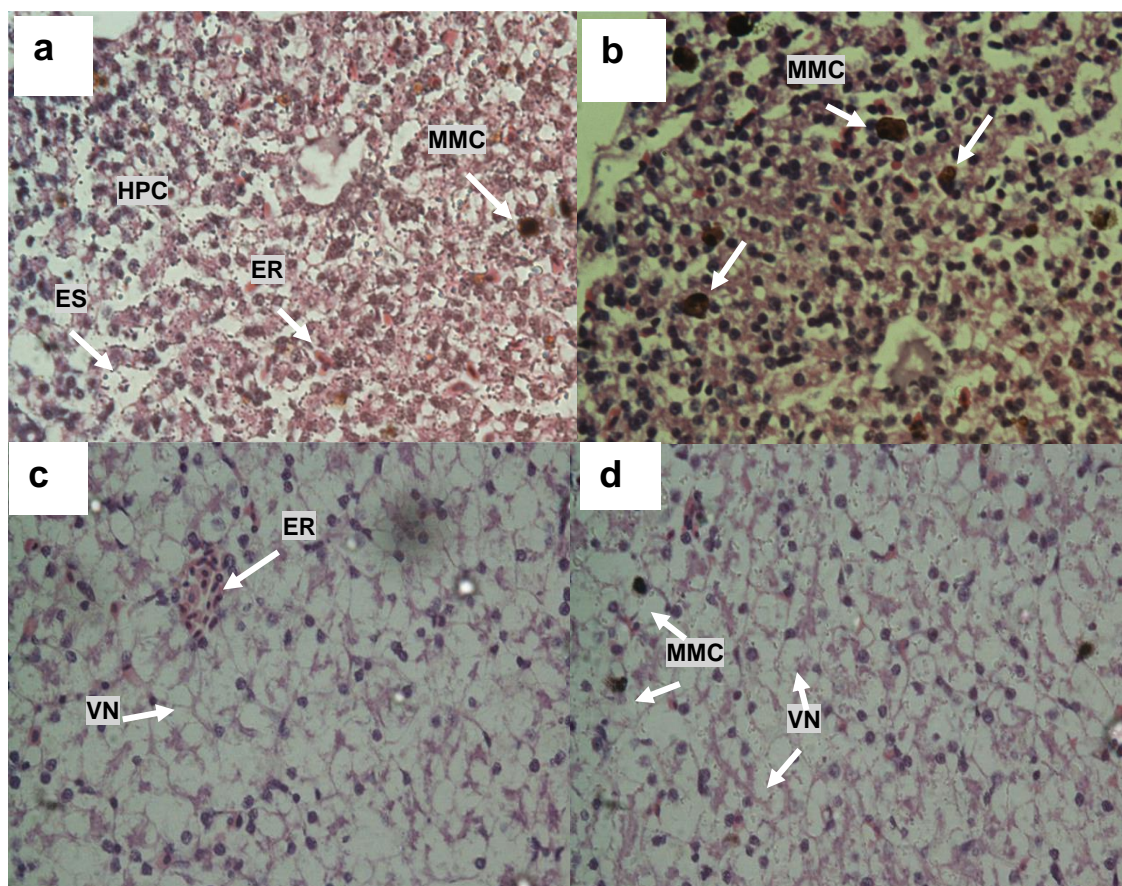


Figura 10. Microfotografías representativas del hígado de *Leucostethus fraterdanieli*. (a-b) Sección histológica de tejido hepático que muestra la homogeneidad de estructuras en el grupo control negativo. (c – d) Tejido hepático con vacuolización después de 96h de exposición a 50,13 $\mu\text{gHg/L}$. (e - f) Tejido hepático con vacuolización provocada a las 144h bajo la exposición de 123,2 $\mu\text{gHg /L}$. Hepatocitos (HPC), centros melanomacrófagos (MMC), espacios sinusoidales (ES), eritrocitos (ER), vacuolización (VN).

El análisis de cortes ultrafinos teñidos con azul de toluidina, corrobora el fenómeno de vacuolización y la presencia de cuerpos grasos (Figura 11– a-b). Teniendo en cuenta la importancia del contenido de las vesículas, se aplicó la tinción PAS para identificar polisacáridos como el glucógeno y PAS – Diastasa que evidencia la eliminación de glucógeno; la coloración rojo a magenta en la Figura 11– c y la ausencia de esta misma coloración (rojo a magenta) en la Figura 11– d, indica positivo para la presencia de glucógeno.

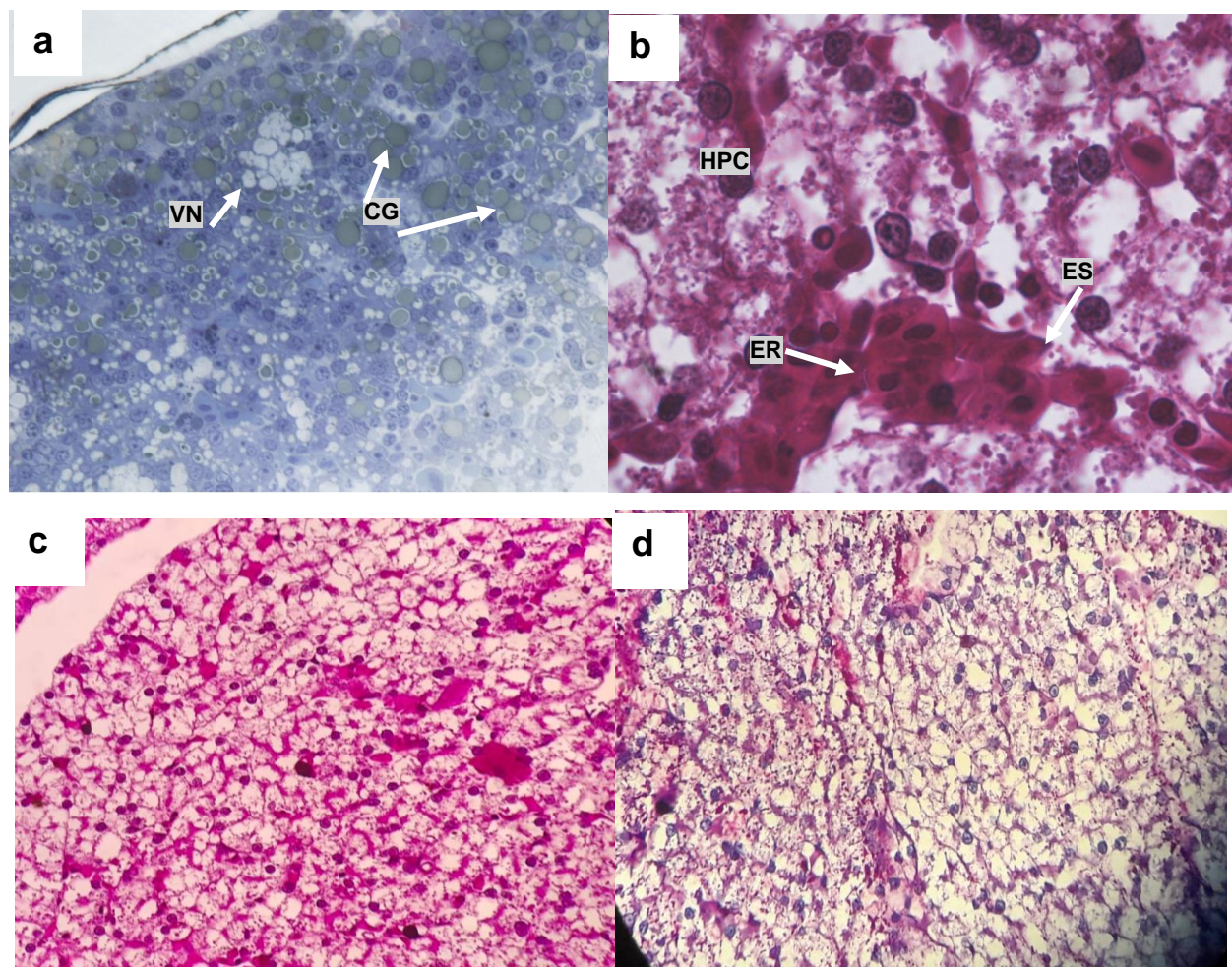


Figura 11. Microfotografías representativas del hígado de *Leucostethus fraterdanieli* – Tinción con azul de toluidina, PAS y PAS Diastasa. (a) Corte ultrafino de hígado expuesto a 50,13 $\mu\text{gHg/L}$ – 144h, presenta vacuolización y cuerpos grasos (b) Hepatocitos y paso de eritrocitos por espacios sinusoidales - Tejido hepático expuesto a 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ - 144h. (c) Fenómeno de vacuolización observado bajo tinción PAS – Tejido hepático expuesto a 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ -144h (d). Fenómeno de vacuolización observado bajo tinción PAS diastasa- Tejido expuesto a 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ -144h. Cuerpo Graso (CG)Hepatocitos (HPC), espacios sinusoidales (ES), eritrocitos (ER), Vacuolización (VN).

Análisis de bioacumulación de mercurio en *Leucostethus fraterdanieli*

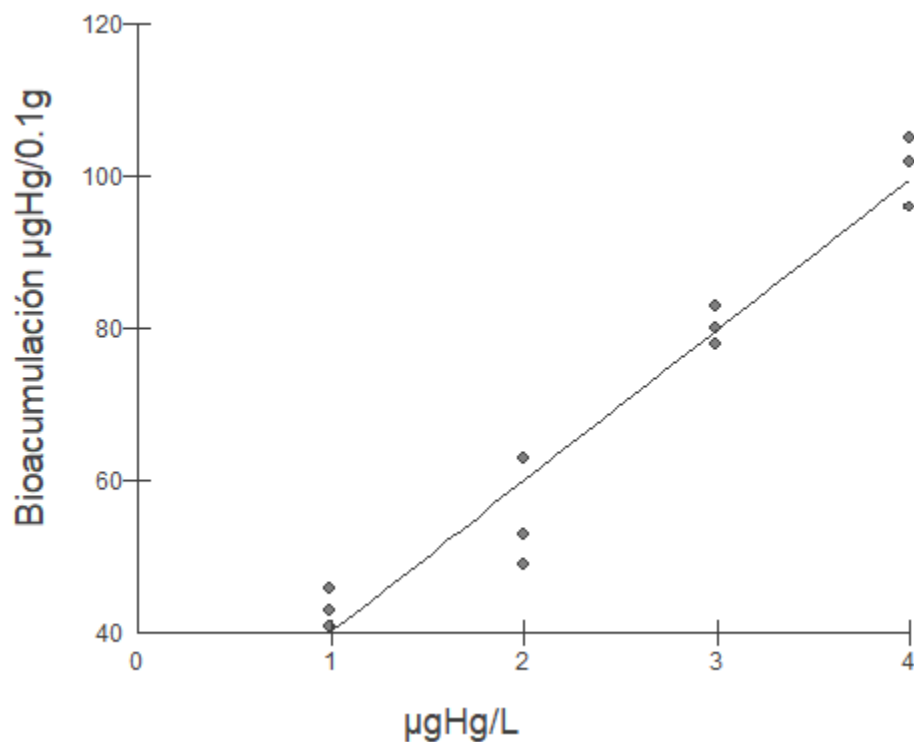
El proceso de bioacumulación de Hg en los renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*, responde a un efecto dosis dependiente (Tabla 6), en el que la mayor concentración de Hg se encontró en aquellos renacuajos que se sometieron a mayores concentraciones del metal durante más tiempo y por tanto el coeficiente de correlación incrementa en

estas condiciones (48h $r = 0,908$ y 144h $r = 0,9769$ $p < 0,05$) (Figura 12), es decir que los resultados muestran una fuerte relación positiva entre las concentraciones experimentales de Hg empleadas y la concentración de Hg bioacumulado. En general, todas las concentraciones determinadas incrementaron respecto al grupo control, sin embargo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se registraron únicamente en la concentración 123,2 $\mu\text{gHg/L}$ en los dos intervalos de tiempo evaluados, es decir, que la mayor exposición de concentración de mercurio causó la mayor bioacumulación de este metal en los renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* (Tabla 6).

Bioacumulación de Hg en renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* tratados con diferentes concentraciones ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

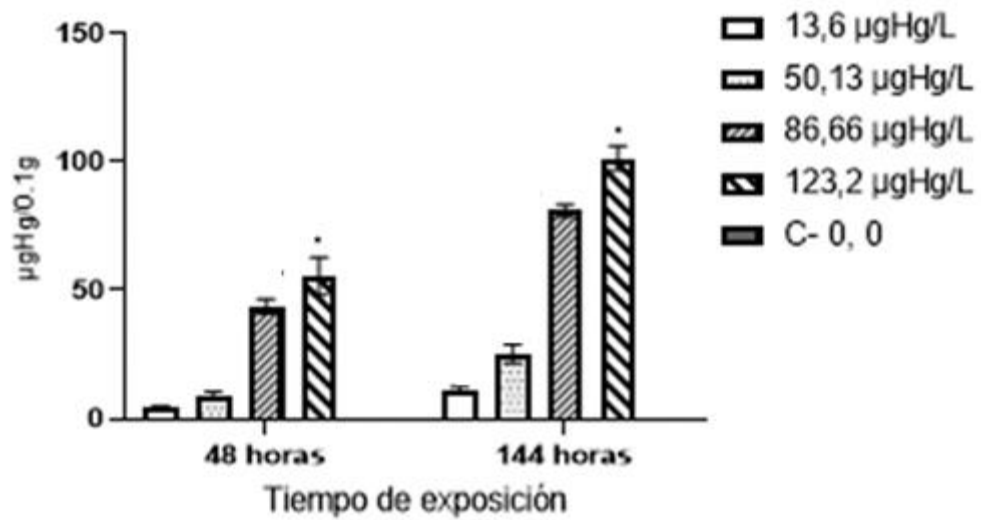
Concentración	48 horas $\mu\text{gHg}/0.1\text{g}$	144 horas $\mu\text{gHg}/0.1\text{g}$
0,0 $\mu\text{gHg/L}$	0	0
13,6 $\mu\text{gHg/L}$	$4,82 \pm 0,05$	$11,13 \pm 1,12$
50,13 $\mu\text{gHg/L}$	$8,94 \pm 1,65$	$25,39 \pm 3,67$
86,66 $\mu\text{gHg/L}$	$43,70 \pm 2,90$	$80,91 \pm 2,49$
123,2 $\mu\text{gHg/L}$	$55,51 \pm 7,32^*$	$101,47 \pm 4,8^*$

$p < 0.05^*$ comparado al control negativo (C -).



. Correlación positiva entre la bioacumulación y las concentraciones de Hg experimentales durante las 48 Y 144 horas de exposición

La Figura 13 muestra la progresión de la bioacumulación de Hg y evidencia gráficamente el efecto dosis dependencia; durante las primeras 48 horas de exposición, el rango de bioacumulación en los especímenes para todas las concentraciones se estableció entre $4,82 \pm 0,05$ a $55,51 \pm 7,32$ y para las 144 horas el rango estuvo entre $11,13 \pm 1,12$ a $101,47 \pm 4,8$; las mayores concentraciones $86,66 \mu\text{gHg/L}$ y $123,2 \mu\text{gHg/L}$ a las 144 horas provocaron el mayor efecto de bioacumulación, que se aproximó a la concentración del medio.



Bioacumulación de Hg en renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*.

Discusión

El Hg es considerado uno de los contaminantes más importantes para el medio ambiente por su toxicidad y alta persistencia en los ecosistemas (Maktoof *et al.*, 2020); el efecto genotóxico de este y otros metales pesados en poblaciones de renacuajos ha sido poco estudiado a través del test de micronúcleos; a nivel mundial, los análisis genotóxicos en renacuajos se han desarrollado principalmente para evaluar pesticidas y agroquímicos, estudios con residuos mineros que contienen metales pesados son escasos (Benvindo - Souza *et al.*, 2019).

La disminución a nivel mundial de las poblaciones de anfibios y su conducción a niveles de extinción, se ha asociado a contaminación por metales pesados como el Hg; su vulnerabilidad en estadio larval es mayor, considerando el daño genético que interfiere con el crecimiento, desarrollo y el impacto biológico que representa la contaminación es alto, frente al riesgo de extinción global de los anfibios (Campana *et al.*, 2003; AmphibiaWeb, 2022).

Los resultados de este estudio indican que la frecuencia de micronúcleos, aberraciones nucleares, así como la bioacumulación estimada de Hg, establecen a *Leucostethus fraterdanieli* como una especie sensible a las concentraciones de Hg empleadas, que reflejan, la contaminación por Hg detectadas en ecosistemas acuáticos al norte del Cauca y que además influyen las comunidades asociadas al Río la Teta.

El incremento de frecuencias tanto de micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos fue proporcionalmente similar, entre 6 y 7,8 veces respecto a las frecuencias basales calculadas en este estudio. El comportamiento de las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos de *Leucostethus fraterdanieli* es un indicador biológico adecuado que evidencia el efecto genotóxico del Hg en este organismo; el incremento de frecuencias de micronúcleos que fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control, especialmente a las 48 horas de exposición (*Tabla 3*), muestra la velocidad del daño, sin embargo su declinación a las 96 y 144 horas, implica un evento sinérgico a nivel biológico del daño; el cloruro de mercurio inhibe la producción de eritrocitos (Trivedi *et*

al., 2022), es decir que disminuye la progresión mitótica y por lo tanto, la evidencia de formación de micronúcleos por fallas en este proceso.

Las frecuencias de micronúcleos determinadas en este estudio son mayores que el máximo registro obtenido, por: Pollo y colaboradores 2016 (1.42 ± 1.09) que evalúa el efecto de la contaminación por una mina de fluorita, empleando adultos y renacuajos de *Hypsiboas cordobae*; sin embargo, son en general más bajas que las registradas en la carpa dorada *Carassius auratus auratus*, que oscilaron entre $2,34 \pm 0,41$ hasta $5,71 \pm 0,61$ pese a que fueron expuestos a un rango de 1 a 10 $\mu\text{g/L}$ de cloruro de mercurio (Pollo *et al.*, 2016; Cavaş, 2008).

El pico en la frecuencia de micronúcleos a las 48 horas registrado en este estudio, es semejante al determinado en peces por Nirchio *et al.*, 2019, que sugiere un envenenamiento del huso mitótico y/o efectos clastogénicos rápidos, que ocurren durante los primeros días de exposición, después de las 72 horas, sugieren un debilitamiento de la mitosis; algunos estudios han registrado este fenómeno que disminuye los eritrocitos, ya sea por efecto del cloruro de mercurio, en animales como el conejo (Capcarová *et al.*, 2009) y la trucha marrón del caspio (Mousavi & Yousefian, 2012); en peces por efecto de otros metales pesados, como el arsénico (Kumar R., & Banerjee, 2016), o pesticidas, como el organofosfatado profenofos (Kumar, Nagpure & Trivedi, 2011) y el insecticida carbamato que contiene pirimicarb aficida, al cual fueron expuestos renacuajos de *Rhinella Arenarum* y que muestra un comportamiento similar al registrado en este estudio, respecto al incremento de frecuencias de micronúcleos a las 48 horas y disminución de la significancia en la frecuencia a las 96 horas, presentando igualmente una disminución de eritrocitos (Vera *et al.*, 2010).

El registro de brotes nucleares, se asocia a un mecanismo de reparación del ADN, probablemente asociado a una aneuploidía, es decir la detección de un potencial cromosoma extra posterior al proceso de amplificación (Fenech *et al.*, 2011; Mitkovska *et*

al., 2021), el brote nuclear se forma para tratar de eliminar ADN amplificado o eliminar dicho exceso de cromosomas (Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013); las frecuencias de esta anomalía registradas en este estudio, son más altas que las registradas por Pollo y colaboradores (2015) (1.14 ± 1.27 y 0.39 ± 0.86) que evalúan efectos genotóxicos en dos matrices ambientales con diferente grado de perturbación antrópica y emplean como biomodelo a *Rhinella arenarum*, sin embargo son menores a las registradas por Mitkovska *et al.*, 2021 (15.32 ± 11.06) que evalúa el efecto de la exposición crónica a metales pesados en el Río Chaya de Plovdiv en Bulgaria, en el que se detectó hierro, plomo, zinc, cobre, cadmio, níquel, arsénico, Hg y plomo y se estima un efecto sinérgico.

Los puentes nucleoplásmicos se originan a partir de una mala reparación de roturas de ADN, la presencia de dos centrómeros en el cromosoma que conduce durante la anafase a la unión a dos husos opuestos que tiran la Cromatida, al no romperse la membrana nuclear envuelve a los dos núcleos formando un puente entre ellos y fusión de extremos de telómeros (Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013), estas anomalías reflejan inestabilidad genómica y se consideran a estos el inicio de los ciclos rotura- fusión – puente, en los que posterior a una fragmentación cromosómica desencadena cromotripsis, un reordenamiento de cromosomas que se relaciona al desarrollo de cáncer (Fenech *et al.*, 2011; Luzhna, Kathiria & Kovalchuk, 2013; Umbreit *et al.*, 2020).

La debilitación del proceso de mitosis debido a la toxicidad del Hg, se soporta no solo por la presencia de micronúcleos sino por el incremento de las frecuencias de aberraciones nucleares, que inclusive permiten considerar un efecto citotóxico (Nirchio, Tasneem & Yasmeeen, 2018; Nirchio *et al.*, 2019); del conjunto de aberraciones nucleares detectadas en este estudio (Figura 5), la frecuencia de brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos, tuvieron un comportamiento similar a las frecuencias de micronúcleos, no solo al no evidenciar un comportamiento dosis dependiente, sino al indicar un aumento significativo en la frecuencia de brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos en las primeras horas de exposición ($p < 0.05$; *Tabla 4* y *Tabla 5*).

En general, las aberraciones nucleares determinadas y la presencia de micronucleos, son un indicador de daño genotóxico e inestabilidad genómica, un factor común en la evolución del cáncer; es fundamental resaltar bajo este contexto que los factores que participan en el ensamblaje del huso de anfibios como *Xenopus laevis* se conserva en el ensamblaje del huso humano, los MCN están relacionados a procesos de tumorigénesis, debido a la pérdida de ADN del núcleo principal que conduce a reordenamientos genómicos mediante la cromotripsis, el reensamble aleatorio de fragmentos cromosómicos que ocurre posteriormente a este fenómeno, no solo causa inestabilidad genómica sino promueve una respuesta inmune que contribuye en la metástasis del cáncer, en consecuencia de una exposición citoplasmática del ADN del micronúcleo después de activación de vías de autofagia y sensores enzimáticos como cGAS provoca inflamación; los cromosomas o fragmentos de estos dentro del micronúcleo exhibe el daño en el ADN y por tanto la inestabilidad del genoma (Cross & Powers, 2009; Kalsbeeky & Golsteyn, 2017; Kneissig *et al.*, 2019; He *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019; Krupina, Goginashvili & Cleveland, 2021)

Las células con micronucleos pueden sobrevivir varios ciclos de división celular, y el cromosoma o fragmento que se encuentre dentro del micronúcleo puede reincorporarse erróneamente al núcleo principal de las células hijas y conducir a una fase de muerte celular o de adaptación en que las células dañadas no responden a las señales de muerte celular y por lo tanto resisten los tratamientos contra el cáncer, usualmente ocurre una mutación en genes que codifican supresores de tumores como p21 y p53 en consecuencia a la cromotripsis y así se promueve el desarrollo de cáncer (Kalsbeeky & Golsteyn, 2017; Ye *et al.*, 2019).

Los micronucleos son un efecto genotóxico que evidencia además el daño en la maquinaria mitótica, su proceso de formación está asociado al estrés causado por especies reactivas de oxígeno que lesionan el ADN y promueven el cáncer (Heng *et al.*, 2021), el mercurio tiene este efecto al generar radicales libres, causa estrés oxidativo que disminuye las reservas protectoras del antioxidante glutatión en las que interviene su

capacidad de unirse a grupos sulfhidrilo, así mismo puede actuar directamente sobre el ADN al oxidar las bases nitrogenadas (Sánchez- Alarcón *et al.*, 2021).

En este contexto, los niveles de afectación del mercurio trasciende del campo genotóxico, carcinogénico a teratogénico, en este último caso, hay evidencias de superación de barreras hematoencefálicas y placentarias por el mercurio inorgánico y orgánico, en las que se registra estas formas de mercurio en el cerebro de recién nacidos (Counter & Buchanan, 2004); las consecuencias intracelulares de la actividad del mercurio que generan aberraciones y especialmente niveles elevados de micronúcleos, pueden conducir a una vitalidad reducida y mayores riesgos de extinciones locales en el caso de poblaciones de fauna silvestre (Santovito, Audisio & Bonelli, 2020).

La permanencia de los anfibios en ecosistemas acuáticos, su desarrollo metamórfico y rutas de ingestión de contaminantes, facilitan procesos de contaminación por metales pesados, como: el Hg, afectando órganos o tejidos durante el proceso de transporte o acumulación del mismo, conduciendo al desarrollo de enfermedades degenerativas o neoplásicas, especialmente en órganos diana (Pollo *et al.*, 2016; Jayawardena *et al.*, 2017). El hígado es un órgano diana, metaboliza y almacena moléculas absorbidas después de la digestión, así como desencadenar funciones detox frente a contaminantes ambientales, además está involucrado en la activación o señalización para modulación cambios que ocurren en la metamorfosis de los anfibios (Washabau & Day, 2013; Zhu *et al.*, 2019).

El análisis histológico muestra que el tejido hepático de los renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* posee normalmente numerosos depósitos de grasa, este órgano se considera el depósito primario de grasa y su adaptación fisiológica es acorde a ello, esta grasa se considera el combustible metabólico para impulsar el desarrollo metamórfico, las reservas hepáticas, como: los triglicéridos, proporcionan señales que modulan la metamorfosis (Zhu *et al.*, 2019), por ello, en la Figura 11, se observan numerosos depósitos o vacuolas lipídicas en condición traslúcida o sin teñir, ya que por el procesamiento histológico se facilita la pérdida de lípidos a través de lixiviación, pero es

posible observar fácilmente estos depósitos en los cortes ultrafinos teñidos con azul de toluidina (Figura 11).

En el tejido hepático de *Leucostethus fraterdanieli* tratado, se observó incremento de la vacuolización o vesículas lipídicas así como la degeneración de hepatocitos con las diferentes concentraciones de Hg empleadas, esta anomalía tiene el potencial de causar compresión en los sinusoides hepáticos, distensión del citoplasma y desplazamiento del núcleo del hepatocito hacia fuera de la célula, cada evento hace parte de la respuesta inflamatoria relacionada a daño citotóxico y de microvascularización, que se desencadena por el incremento de especies reactivas de oxígeno EROs (Miller & Zachary, 2017; Franco – Belussi *et al.*, 2020) como las que se provocan por la continua exposición a Hg, en consecuencia los organismos están sometidos a estrés fisiológico por la intoxicación química (Riaño, Ortiz, Pinto & Gomez, 2020).

Los resultados son consistentes con los hallados en otros estudios, como los realizados por Shi y colaboradores (2018), quienes evalúan el efecto crónico del Hg en renacuajos de *Bufo gargarizans* y registran daños en el hígado por degeneración y desintegración de los hepatocitos así como vacuolización mitocondrial y rupturas del retículo endoplasmático después de exponer los individuos a dosis de 24 y 30 µg/L de mercurio (Shi *et al.*, 2018), dosis menores a las tres concentraciones más altas empleadas en este estudio con renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* y que se encuentran registrados en el Río la Teta.

Las alteraciones histopatológicas registradas en *Leucostethus fraterdanieli* son evidencia de toxicidad celular similares a las obtenidas por Saenphet y colaboradores (2018), en su evaluación de la toxicidad aguda y cambios histopatológicos en el hígado de renacuajo *Hoplobatrachus rugulosus* expuestos a bioinsecticidas derivados de *Azadirachta indica*, *Stemona curtissi* y *Mammea siamensis*, los investigadores registran alteraciones, como: vacuolización, infiltración de leucocitos, células necróticas y congestión sanguínea, necrosis del epitelio del ducto biliar, cariólisis y dilatación sinusoidal; Bo y colaboradores (2018) reportan el incremento de depósitos lipídicos y otras anomalías histológicas,

como: degeneración de células del parénquima hepático e incremento de centros melanomacrófagos, al exponer renacuajos de *Bufo gargarizans* a fluoruros, evalúan biomarcadores del metabolismo lipídico y detectan inhibición de niveles de transcripción de genes relacionados al mismo (Saenphet *et al.*, 2018; Bo *et al.*, 2018).

Estudios similares realizados en anfibios, como el de Ortiz y colaboradores (2016) sobre los cambios histológicos hepáticos y peroxidación lipídica en el ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum* y su comportamiento frente a sedimentos contaminados con metales pesados tales como: plomo, cadmio y Hg, registraron daño hepático, como: vasodilatación de los sinusoides, infiltración de leucocitos y vacuolización citoplasmática de hepatocitos, daños asociados a la exposición a sedimentos de la zona turística (Ortiz *et al.*, 2016). Boiarski y colaboradores (2020) expusieron durante siete días renacuajos de *Lithobates catesbeianus* a agua proveniente del Rio Cascavelsur de Brasil para evaluar el sistema antioxidante de los organismos frente a contaminantes urbanos, entre las principales lesiones del hígado, registran vacuolización de hepatocitos y alteración de biomarcadores bioquímicos como la peroxidación lipídica (Boiarski *et al.*, 2020).

Safajieh y colaboradores (2011), exponen al pez *Acanthopagrus latus* a concentraciones de Hg entre 10 y 80µg/ L durante 3 semanas, registran lesiones hepáticas, entre ellas vacuolización; el pez *Scatophagus argus* fue sometido a concentraciones de 10, 20 y 30µg/ L de Hg, durante 72 horas, dicha exposición, indujo cambios histológicos como exceso de acumulación de grasa en el citoplasma, proceso que induce una atrofia nuclear debido a que se empuja el núcleo hacia la periferia celular (Morovati *et al.*, 2010; Safajieh *et al.*, 2011).

La presencia en el tejido hepático de cuerpos grasos, así como glucógeno (Figura 11), son garantía y reserva energética que contribuye al cambio metamórfico, el glucógeno se agota rápidamente bajo un requerimiento energético sobre los lípidos, esto es posible observar en estados de inanición (Emel'yanova *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019), lo que indica que los renacuajos evaluados se encontraban en un estado nutricional óptimo para el desarrollo experimental.

La evaluación de bioacumulación de Hg en renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*, refleja un comportamiento dosis dependiente de la capacidad de absorción del tejido total de los organismos evaluados frente a las dosis constantes de Hg expuestas. El incremento de bioacumulación de Hg fue significativo en el mayor nivel de exposición 123,2 µgHg/L a las 48 y 144 horas ($p < 0.05$; Tabla 6) respecto al control negativo, durante las primeras 48 horas del experimento se observó una absorción de Hg entre 17,8% - 50,42% y paso a un rango de absorción de 50,6% - 96,4% a las 144 horas.

Los resultados indican que los renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli* absorben rápidamente el Hg presente en el agua; considerando el límite permitido de concentraciones de Hg para fauna silvestre que es 0,1µg/g (Eisler 1985), los renacuajos analizados en este estudio se pueden categorizar como altamente contaminados por Hg, reflejando así el potencial contaminante para la fauna anfibia presente o relacionada al Río la teta del municipio de Buenos Aires (Cauca).

La alta absorción de Hg registrada en este bioensayo, supera los registros de concentraciones de Hg en renacuajos de las especies de anfibios como *Hypsiboas rosenbergi*, *Smilisca phaeota*, *Rhinella margaritifera*, *Lithobates vaillanti* evaluados en áreas afectadas por la minería del oro en el río Dagua en Buenaventura, que reportó un rango entre 0,07 a 0,17 µg/g, aunque los autores sugieren que los valores podrían aumentar al considerar una reactivación de la intensidad de la minería en el área (Hernandez, Castro & Páez, 2013). Por otra parte, estudios conducidos en *Lithobates catesbaianus* en la laguna de sonso en la cuenca alta del Río Cauca registraron un valor de 0,018 µg/g (Peña, Cantera & Muñoz, 2012).

En este escenario, los porcentajes de bioacumulación de Hg y el rol ecológico de los renacuajos en los que son presa de depredadores como peces, aves, reptiles y fauna acuática, se puede considerar a estos organismos como indicadores de exposición potencial para organismos de nivel trófico superior (Burger & Snodgrass, 2001); bajo las condiciones experimentales en las que se empleó HgCl₂ y la capacidad de bioacumulación obtenida, se sugiere un probable proceso de biotransformación de este

elemento a metilmercurio, una forma versátil de mayor interacción biológica capaz de unirse a metalotioneínas que intervienen en la desintoxicación de metales como el Hg, y facilitan la bioacumulación en aproximadamente ocho veces más que el HgCl₂ (Prati *et al.*, 2002).

Las aplicaciones prácticas que se consideran en la actualidad para establecer biomonitoreos de ecosistemas acuáticos, requieren elementos funcionales que visibilicen la problemática de contaminación ambiental, evaluar referencias reales que se registren en la dinámica de dichos sistemas es fundamental para establecer herramientas y modelos que acerquen a la dinámica poblacional y de comunidad, a través de la perspectiva de la bioacumulación que refleja el equilibrio entre la exposición ambiental exterior, la absorción, excreción, almacenamiento y degradación de un tóxico en un organismo (Zhou *et al.*, 2007), así como las probabilidades de transmisión a través de procesos de biomagnificación; por ello, considerar la velocidad y alta absorción de mercurio en *Leucostethus fraterdanieli* fortalece el establecimiento de esta especie como bioindicadora.

Se ha reconocido a los anfibios como los vertebrados con mayor amenaza a nivel mundial, considerando el riesgo de extinción o el declive poblacional, el 40,7% de las especies se encuentran en peligro de extinción (Cox *et al.*, 2022). Los anfibios en medios acuáticos están constantemente expuestos a contaminantes de diferente origen (Gonçalves *et al.*, 2019). En Colombia, la minería aurífera se ha consolidado como uno de los principales problemas de contaminación de los recursos hídricos que conducen a la disminución de su calidad debido a los desechos del proceso, entre los que destaca el Hg junto a otros metales pesados como el plomo, cadmio y cromo (Gallo, Pérez, Figueroa, R & Figueroa, A. 2021; Gallo, Vargas, Velasco, Gutierrez & Pérez, 2021).

Los esfuerzos para evaluar los efectos adversos del Hg en anfibios, se han dirigido a evaluar la mortalidad de renacuajos, deformación morfológica e inhibición del desarrollo (Muñoz & Palacio, 2010; Shi *et al.*, 2018), por ello, esta investigación evaluó a través de distintas metodologías el efecto genotóxico, histopatologías y bioacumulación del Hg en

renacuajos de *Leucostethus fraterdanieli*, los hallazgos revelan la genotoxicidad demostrada por el daño de ADN determinado a través de las frecuencias de micronúcleos, hepatotoxicidad principalmente definida por la vacuolización de hepatocitos y bioacumulación del Hg en este biomodelo, proporcionando una alerta significativa sobre el estado de vulnerabilidad de esta especie y de las que residen en hábitats influenciados por el Río La Teta del municipio de Buenos Aires, Cauca, los resultados indicaron los efectos perjudiciales para el biomodelo y para las poblaciones de anfibios relacionadas, que pueden retrasar la metamorfosis, afectar el metabolismo, desencadenar eventos teratogénicos y disminuir la capacidad de supervivencia o fitness individual o poblacional (Boiarski *et al.*, 2020; Peluso *et al.*, 2020, Yajawardena 2021), brindando así, un panorama del estado de salud del área de influencia el Río La Teta del municipio de Buenos Aires, Cauca.

CONCLUSIONES

- La emulación de las concentraciones de Hg registradas para el río La Teta del municipio de Buenos Aires facilitó un acercamiento realista al comportamiento del Hg a nivel regional y provee la primera evidencia del efecto genotóxico, histopatológico y de bioacumulación del Hg en anfibios de la familia Dendrobatidae a nivel nacional e internacional.
- Los resultados de este estudio, determinan las concentraciones relacionadas a los registros de Hg del Río la Teta del municipio de Buenos Aires Cauca, como genotoxicos sobre el biomodelo *Leucostethus fraterdanieli*.
- El incremento significativo tanto de frecuencias de micronucleos así como aberraciones nucleares, es indicador del daño en el ADN, inestabilidad genómica, aneuploidia y propensión al desarrollo de enfermedades, como el cáncer.
- Las histopatologías generadas por el Hg en *Leucostethus fraterdanieli* están definidas por el potencial hepatotóxico de este metal y se reflejó principalmente a través del incremento de la vacuolización del tejido hepático.
- La bioacumulación de Hg registrada en el biomodelo es un indicador de la alta y rápida absorción de Hg que pueden tener los renacuajos y representa la importancia de estos organismos en procesos de biomagnificación de este metal a través de las cadenas tróficas, no solo en los sistemas acuáticos sino en los terrestres cuando alcanzan su fase adulta.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el comportamiento genotóxico, histopatológico y de bioacumulación del conjunto de metales pesados presentes en los sedimentos de las fuentes hídricas relacionadas a las zonas de actividad minera, debido a que el Hg no es el único metal en dichas actividades.
- Establecer un biomodelo alternativo que permita desarrollar estudios comparativos con los resultados obtenidos en esta investigación, para así determinar si la vulnerabilidad de los anfibios al Hg u otros metales pesados está definida por las características tanto de especie como familia de Anuro.
- Dirigir los esfuerzos de análisis histopatológico a órganos diana como lo son el hígado y el intestino.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, L. & Nigussie, F. (2021). Mercury Toxicity and Neurogenesis in the Mammalian Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14): 7520.
- Aaseth, J., Wallace, D., Vejrup, K. & Alexander, J. (2020). Methylmercury and developmental neurotoxicity: A global concern. *Current Opinion in Toxicology*, 19: 80-87.
- Aguirre, V. & Davila, D. (2021). Contaminación ambiental por mercurio y la salud fisiológica y psicológica del poblador de Huepetuhe – Madre de Dios 2019. *Ciencia Latina, revista científica multidisciplinar*. 5 (6): https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i6.1178 p11440
- Alfonso, J., Marrugo, J. & Pinedo, J. (2012). Hallazgo de mercurio en piezas dentales de jaguares (*Panthera onca*) provenientes de la zona amortiguadora del parque nacional natural paramillo, Córdoba, Colombia. *Revista latinoamericana de conservación*, 2 (2)-3 (1), 87-92.
- Altig, R. (2007). A primer for the morphology of anuran tadpoles. *Herpetological Conservation and Biology*, 2(1),71-74.
- Angulo, A., Rueda-Almoacid, J. V. Rodríguez-Mahecha, J. V., & La Marca, E. (Eds). (2006). *Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina*. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N.º 2. Bogotá D.C. Panamericana Formas e Impresos S.A.
- Aragão, W., Bittencourt, L. O., Lima, L., de Souza, M., Nogueira, L. S., Dionizio, A., Buzalaf, M., de Oliveira, E., Crespo-Lopez, M. E., & Lima, R. R. (2022). DNA Damage and Proteomic Profile Changes in Rat Salivary Glands After Chronic Exposure to Inorganic Mercury. *Biological trace element research*, 10.1007/s12011-021-02986-7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02986-7>
- Arana, M. (2009). El caso de derrame de mercurio en Choropampa y los daños a la salud en la población rural expuesta. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 29(6).

- Arora, N.K., Chauhan, R. (2021). Heavy metal toxicity and sustainable interventions for their decontamination. *Environmental Sustainability* 4, 1–3
<https://doi.org/10.1007/s42398-021-00164-y>
- AmphibiaWeb. (2022). <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 25 Oct 2022.
- Atta, K. I., Abdel-Karim, A. E., & Elsheikh, E. H. (2012). Ultrastructural study of the effect of heavy metals on the regenerating tail fin of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 65(4), 232–239.
- Balali-Mood, M., Naseri., K, Tahergorabi., Z, Khazdair., MR & Sadeghi., M .(2021) Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front. Pharmacol.* 12:643972. doi: 10.3389/fphar.2021.643972
- Balcázar, R. (2011). *Estudio genotóxico en renacuajos Ecnomiohyla miotympanum del Río Escanela expuestos a residuos mineros de Pinal de Amoles, Querétaro*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Querétaro, México.
- Beauvais-flück, R., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2017). Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific reports*, 7(8034), 1–12.
- Bell, L., DiGangi, J. & Weinberg, J. (2014). Introducción a la contaminación por mercurio y al Convenio de Minamata sobre mercurio para las ONG. Ipen.
- Bergeron, C., Bodinof, C., Unrine, J., Hopkins, G. (2010). Bioaccumulation and maternal transfer of mercury and selenium in amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4): 989 -997.
- Bernal, M.H., y J.D. Lynch. 2008. Review and analysis of altitudinal distribution of the Andean anurans in Colombia. *Zootaxa*, 1826, 1-25.
- Benvindo-Souza, M., Santos, E., Alves, R., Gomes, C., Borges, R., Melo, D. & Souza, L. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. Review. *Chemosphere* 240- 124910. 1-7.
- Bhat, S. (2013). Ecotoxicology & impact on biodiversity. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 2(2),1-19.

- Bo, X., Mu, D., Wu, M., Xiao, H. & Wang, H. (2018). The morphological changes and molecular biomarker responses in the liver of fluoride - exposed *Bufo gargarizans* larvae.
- Boczulak, S., Vanderwel, M. & Hall, B. (2017). Survey of mercury in boreal chorus frog (*Pseudacris maculata*) and wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles from wetland ponds in the Prairie, Pothole Region of Canada. *Facets* 2, 315-329.
- Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere*, 40(12), 1335–1351.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Bohm, K., Prots, I., Unger, E., Thier, R., Bolt, H. & Degen, G. (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of toxicology* 78: 575 – 583.
- Boiarski, D., Toigo, C., Sobjak, T., Potulski, A., Romao, S. & Bittencourt, A. (2020). Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to water from an urban stream. *Ecotoxicology*
<https://doi.org/10.1007/s10646-020-02176-6>
- Bonville, J., Amyot, M., Giorgio, P., Tremblay, A., Bilodeau, F., Pontón, D. & Lapierre, J. (2020). Mobilization and transformation of Mercury across a dammed boreal river are linked to carbon processing and hydrology. *Water resources research*, 56(10).
- Brooks, W. (2012). Colombia mercury inventory 2011. *Geología Colombiana*, 37(2), 15-50.
- Burgos, S., Navarro, A., Marrugo, J., Enamorado, G. & Urango, I. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the Cispatá Bay, Colombia: A marine tropical ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*.
- Burgos, S., Marrugo, J., Navarro, A., Urango, I. (2014). Mercury in *Pelecanus occidentalis* of the Cispatá bay, Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*, 19(2), 4168-4174.
- Burggren, W. & Warburton, S. (2007). Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology. *Ilar Journal Issue Themes*. 48(3): 260 – 269.
- Burton, T. Likens, G. (1975). Energy Flow and Nutrient Cycling in Salamander Populations

- in the Hubbard Brook Experimental Forest. *New Hampshire*, 56(5), 1068–1080.
- Burger, J. & Snodgrass, J. (2001). Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah river site: location and body compartment effects. *Environmental Research* 86, 157_ 166.
- Caicedo, A. (2017). Vida campesina y modelo de desarrollo: configuraciones de despojo/privilegio en el norte del Cauca. *Revista Colombiana de antropología*, 53(1), 59-89.
- Cao, D., Chen, W., Xiang, Y., Mi, Q., Liu, H., Feng, P., Shen, H., Zhang, C., Wang, Y & Wang, D. (2021). The efficiencies of inorganic mercury bio-methylation by aerobic bacteria under different oxygen concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111538
- Carriquiriborde, P. (2021). Principios de Ecotoxicología. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Edulp.
- Cazenave, J., Amé, M. & Menone, M. (2021). Biomarcadores de Contaminación; Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas; 2021; 291-308
- Calao, C., Gaviria, D., Marrugo, J., Calderón, A., Guzmán, C., Martínez, C. & Mattar, S. (2021). Bats are an excellent sentinel model for the detection of genotoxic agents. Study in a Colombian Caribbean region. *Acta Tropica*, 224: 106241
- Cálo, C. R., & Marrugo, J. L. (2015). Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica*, 35(2015), 139–151.
- Calao, C. & Marrugo, J. (2013). Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de la Mojana, Colombia. *Biomédica* (35) 2-139- 151
- Capcarova, M., Massányi, P., Kolesárová, A. & Ondruska, L. (2009). Effect of mercury on selected haematological parameters of rabbits In Vitro. *Slovak Journal Animal Science*. 42(1): 3 – 7.
- Campana, M., Panzeri, A., Moreno, V., Duolut, F. (2003), Micronuclei induction in *Rana catesbiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda – cyalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26 (1): 99 – 103.

- Capó, M. (2003). La ecotoxicología, una ciencia de hoy. *Medicina Balear*, 18 (3), 101-104.
- Cavaş, T. (2009). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(1): 352 – 358.
- Cavas, T. (2008). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology* 46, 352-358.
- Chaves, A., Valle, L., Malespín, W. & Ramírez, V. (2022). Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis como biomarcador de daño genético en poblaciones sobreexpuestas a radiaciones ionizantes. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2). Doi: 10.15517/psm.v0i19.48078
- Chan, J., Yan, Z., Dong, J., Wu, X., Meng, Z., Shi, Y. & Chen, J. (2022). Mechanisms controlling the transformation of and resistance to mercury (II) for a plant-associated *Pseudomonas* sp. strain, AN-B15. *Journal of Hazardous Materials*, 425. 127948.
- Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020 Dec 2;13:1057-1073. doi: 10.2147/JIR.S275595. PMID: 33293849; PMCID: PMC7719303.
- Chen, L.; Li, F.; Huang, W.; Li, Z.; Chen, M. Evaluation of Mercury Transformation and Benthic Organisms Uptake in a Creek Sediment of Pearl River Estuary, China. *Water* 2019, 11, 1308. <https://doi.org/10.3390/w11061308>
- Chemaly, S. (2002). The link between vitamin B12 and methylmercury: a review. *South African Journal of Science*, 98: 568 – 572.
- Chindicue, M. & Rivera, N. (2017). Determinación de los niveles de mercurio y la calidad del agua, por efecto de la minería en el Rio la Teta, Municipio de Buenos Aires-Cauca. Trabajo de grado para optar al título de pregrado de Ingenieros Ambientales. Programa de ingeniería ambiental, Facultad de ingeniería ambiental. Universidad del Cauca.
- CINEP/PPP. (2012). *Minería, conflictos sociales y violación de derechos humanos en*

- Colombia. *Informe especial del CINEP/ Programa por la Paz*. Bogotá, Colombia.
- Cortez,C., Suarez,A. & Lopez-Lopez, F. (2004). Preparación y preservación de materia científico. 173-219. En:
- Cortez, R., Gómez, A. (2015). De la especulación a la endogeneidad del crecimiento: anotaciones críticas sobre la economía aurífera y desarrollo regional en el departamento del Cauca. *Investigación y desarrollo*, 3(2), 278-311
- Colombo, M., Ha, J., Reinfelder, J., Barkay, T. & Yee, N. (2014). Oxidation of Hg (0) to Hg(II) by diverse anaerobic bacteria. *Chemical Geology* 363: 334 – 340.
- Consortio CCA- Consultoría PLYMA - Concesionario Nuevo Cauca. (2017). Conservemos las especies autóctonas del corredor vial. *Boletín informativo Abriendo puertas*. Edición No 6.
- Cox, N., Young, B.E., Bowles, P. *et al.* A global reptile assessment highlights shared conservation needs of tetrapods. *Nature* 605, 285–290 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04664-7>.
- Counter S.A., & Buchanan L.H. (2004). Mercury exposure in children: A review. *Toxicology Appl. Pharmacology* ;198:209–230.
- Chouvelon, T., Cresson, P., Bouchoucha, M., Brach-Papa, C., Bustamante, P., Crochet, S., Marco-Miralles, F., Thomas, B., & Knoery, J. (2018). Oligotrophy as a major driver of mercury bioaccumulation in medium-to high-trophic level consumers: A marine ecosystem-comparative study. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 233, 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.015>
- Crespo, M.E., Macedo, G., Pereira, S., Arrifano, G., Picanco, D., Nascimento, J. & Herculano, A. (2009). Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research* 60: 212 – 220.
- Da Silva, D.C.B.; Bittencourt, L.O.; Baia-da-Silva, D.C.; Chemelo, V.S.; Eiró-Quirino, L.; Nascimento, P.C.; Silva, M.C.F.; Freire, M.A.M.; Gomes-Leal, W.; Crespo-Lopez, M.E.; et al. (2022). Methylmercury Causes Neurodegeneration and Downregulation of Myelin Basic Protein in the Spinal Cord of Offspring Rats after Maternal Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3777. <https://doi.org/10.3390/ijms23073777> Academic Editor: Atsush
- Driscoll, C., Ji-Han, Y., Chen, C., Evers, D., Fallon, K., Holsen, T., Kamman, N. & Munson,

- R. (2007). Forest and freshwater ecosystems in the northeastern United States. *BioScience* 57(1), 17-28.
- Díaz- Arriaga, F. (2014). Mercurio en la minería del oro: impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano. *Revista salud pública*, 16(6), 947-957
- Di Giulio R.T., & Newman M.C. (2010). Chapter 29. ecotoxicology. Klaassen C.D., & Watkins J.B., III(Eds.), Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2e. McGraw Hill.
<https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=449§ionid=39910799>
- El-Saeed, G., Abdel, S., Bassyouni, H., Raafat, J., Agybi, M., Wahby, A. & Aly, H. (2016). Mercury toxicity and DNA damage in patients with Down síndrome. *Medical Research Journal*. DOI: 10.1097/01.MJX.0000483973.37399.e7
- Esdaile, L. & Chalker, J. (2018). The mercury problem in artisanal and small- scale gold mining. Minireview. *Chemistry a European Journal*, 24, 6905 – 6916
- Escobar, L. (2007). Frecuencia de micronúcleos, polimorfismos en el gen de reparación del ADN XRCC1, susceptibilidad genética y riesgo de cáncer en una población ocupacionalmente expuesta a solventes orgánicos y pinturas. Trabajo de grado en Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Eisler R. (1985). Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, *Biological Report*, 85(1.2).
- Emel'yanova, L., Savina, M., Belyaeva, E. & Brailovskaya, V. (2007). Peculiarities of Functioning of Liver Mitochondria of the River Lamprey *Lampetra fluviatilis* and the Common Frog *Rana temporaria* at Periods of Suppression and Activation of Energy Metabolism. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 43(6): 564- 572.
- Fasista, A. (2022). Toward Integrated Large-Scale Environmental Monitoring Using WSN/UAV/ Crowdsensing: A Review of Applications, Signal Processing, and Future Perspectives. *Sensors* 2022, 22, 1824.
<https://doi.org/10.3390/s22051824>

- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Nataraj, A., Surrales, J., Crott, J., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D., Tucker, H. & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1): 125 – 132.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. (2003) HUman Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75
- Fenech, M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes* 11 (10): 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
- Ferreira, C., Bueno, H., Ranzani, M., Soares, S., Rivero, D. & Saldiva, P. (2003). Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia* 16 (2), 83 -88.
- Fonseca, V., Franca, S., Duarte, B., Caçador, I., Cabral, H., Mieiro, C., Coelho, J., Pereira, E., Reis, P. (2019). Spatial variation in mercury bioaccumulation and magnification in a temperate estuarine food web. *Frontiers in Marine Science*, 6(117): doi: 10.3389/fmars.2019.00117
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., & Griending, K.K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*.
- Fujimura, M. & Usuki, F. (2020). Methylmercury – mediated oxidative stress and activation of the cellular protective System. *Antioxidants*, 9, 1004; doi: 10.3390/antiox9101004
- Gao, Z., Zheng, W., Li, Y., Liu, Y., Wu, M., Li, S., Li, P., Liu, G., Fu, X., Wang, S., Wang, F., Cai, Y., Feng, X., Gu, B., Zhong, H. & Yin, Y. (2022). Mercury transformation processes in nature: Critical knowledge gaps and perspectives for moving forward, *Journal of Environmental Sciences*, 119: 152-165.
- Gallo, J.A., Vargas, G., Velasco, M., Gutierrez, L. & Pérez, E. (2021a). Use of the gray water footprint as an indicator of contamination caused by artisanal mining in Colombia. *Resources policy* 73- 102197.

- Gallo, J.A., Pérez, E., Figueroa, R. & Figueroa, A. (2021b). Water quality of streams associated with artisanal gold mining Suárez, Department of Cauca, Colombia. *Heliyon* 7
- Gallo, J.A., Pérez, E. H., Figueroa, R. & Figueroa, A. (2021). Water quality of streams associated with artisanal gold mining; Suárez, Department of Cauca, Colombia. *Heliyon*, Vol 1 (6).
- Gallo, J.A., Vargas, G. L., Velasco, M., Gutiérrez, L. & Pérez, E. (2021). Use of the gray water footprint as an indicator of contamination caused by artisanal mining in Colombia. *Resources Policy*, 73 - 102197
- Garaj-Vrhovac, V. & Kopjar, N. (2003). The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*, 18 (3), 265-271.
- García, C., Rodríguez, P., Pinto, E., Peña, J., Cabrera, M., Arciniegas, L., Varon, D. & Escolar, A. (2017). *El convenio de Minamata. Así actúa Colombia frente al mercurio*. Cali, Colombia: WWF- Colombia.
- García, G. (2010). Determinación de mercurio por generación de vapor frío y detección vía absorción y fluorescencia atómica. Trabajo de grado para optar por el título de licenciada en Química. Universidad Simón Bolívar. Sartenejas. Venezuela.
- Guevara, C., Benítez, E. & Londoño, C. (2017). *Colostethus fraterdanieli* (Silverstone 1971) Rana silvadora. *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia*, 3(2), 14-19.
- Gochfeld, M. & Burger, J. (2021). Mercury Interactions with Selenium and Sulfur and the Relevance of the Se: Hg molar ratio to fish consumption advice. *Environmental Science and Pollution Research* 28(15): 18407 - 18420
- Gonçalves, M., Viera, T., Maciel, N., Carvalho, W., Lima, L., Gambale, P., Cruz, A., Nomura, F., Bastos, R. & Silva, D. (2014). Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. *Environment Science Pollutant*, 1-8.
- Gonçalves, M.W., de Campos, C.B.M., Godoy, F.R., Gambale, P.G., Nunes, H.F.,

- Nomura, F., Bastos, R.P., da Cruz, A.D., e Silva, D.D.M. (2019). Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common Amphibian species inhabiting agroecosystem environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 77 (3), 409e420.
- Gosner, K. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gworek, B., Dmuchowski, W. & Baczewska, A. (2020). Mercurio en el entorno terrestre: una revisión. *Environ Sci Eur* 32, 128. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00401-x>
- Guney M, Akimzhanova Z, Kumisbek A, Beisova K, Kismelyeva S, Satayeva A, Inglezakis V, Karaca F. Mercury (Hg) Contaminated Sites in Kazakhstan: Review of Current Cases and Site Remediation Responses. *Int J Environ Res Public Health.* (2020) Dec 1; 17(23):8936. doi: 10.3390/ijerph17238936. PMID: 33271828; PMCID: PMC7730887.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X. & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research* 8(21): 2003 -2014.
- Hachiya, N. (2006). The history and the present of Minamata Disease, entering the second half a century. *Japan Medical Association Journal*, 49(3), 112-118.
- Hasna, T., Hasnaa, Y., Weiwei, X., Changxin, W., Rongshan, L. & Yafeng, L. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Frontiers in physiology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.627837>
- Hassan, A., Velasquez, E., Belmar, R., Coye, M., Drucker, E., Landrigan, P. J., Michaels, D., & Sidel, K. B. (1981). MERCURY POISONING IN NICARAGUA: A CASE STUDY OF THE EXPORT OF ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL HEALTH HAZARDS BY A MULTINATIONAL CORPORATION. *International Journal of Health Services*, 11(2), 221–226. <http://www.jstor.org/stable/45130498>
- Hayashi, M. (2022). Regulatory genotoxicity: past, present and future. Opinión. *Genes and Environment*, 44 (13): 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41021-022-00242-5>.
- He B., Gnawali N., Hinman A. W., Mattingly A. J., Osimani A., Cimini D.(2019). Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division.

Oncotarget 10: 2660-2674. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/26853/text/>

- Heddle, J., Fenech, M., Hayashi, M. & MacGregor, J. (2011). Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26(1), 3–10.
- Heng, E., Moy, A., Liu, G., Heng, H. & Kezhong. (2021). ER Stress and Micronuclei Cluster: Stress Response Contributes to Genome Chaos in Cancer. *Frontiers in cell and developmental Biology* (9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.673188>.
- Hemmaphan, S., Bordeerat, N.K. Genotoxic Effects of Lead and Their Impact on the Expression of DNA Repair Genes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 4307. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074307>.
- Herek, J., Vargas, L., Rinas Trindade, S., Rutkoski, C., Macagnan, N., Hartmann, P. & Hartmann, M. (2020). Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>
- Hernández-Fernández J, Pinzón-Velasco A, López EA, Rodríguez-Becerra P, Mariño-Ramírez L.. (2021). Transcriptional Analyses of Acute Exposure to Methylmercury on Erythrocytes of Loggerhead Sea Turtle. *Toxics*, 9(4):70. doi: 10.3390/toxics9040070. PMID: 33805397; PMCID: PMC8066450.
- Hernández, O. (2013). Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en zona de impacto por la minería de oro en el Medio Dagua, Buenaventura. *Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo*. Universidad del Valle. Santiago de Cali.
- Hernandez, O., Castro, F. & Paez, M. (2013). Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 341-348.
- Hernández, Rolando A. (1999). Telómeros y telomerasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 121-129. Recuperado en 22 de agosto de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001999000200009&lng=es&tlng=es
- Houserova, P., Hedbavny, J., Matejicek, D., Kracmar, S., Sitko, J. & Kuban, V. (2005). Determination of total mercury in muscle, intestines, liver and kidney tissues of cormorant (*Phalacrocorax carbo*), greatr crested grebe (*Podiceps cristatus*) and

- Eurasian buzzard (*Buteo buteo*). *Veterinarij medicina*, 50(2), 61-68.
- Huancaré-Pusari, R. K. (2002). Identificación histopatológica de lesiones inducida por bioacumulación de metales pesados en branquias, hígado y músculo de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo en etapa comercial de la Laguna Mamacocha, área de influencia minera, Cajamarca-P, 8(3), 367.
- Ignatavičius, G., Unsal, M., Busher, P., Wolkowicz, S., Satkūnas, J., Šulijiene, G., Valskys, V. (2022). Review Geochemistry of mercury in soils and water sediments. *AIMS Environmental Science*, 9(3): 261- 281.
- IUCN 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>
- Ishihara, Y., Tsuji, M., Kawamoto, T. & Yamazaki, T. (2016). Involvement of reactive oxygen species derived from mitochondria in neuronal injury elicited by methylmercury. *Journal of clinical biochemistry*, 59(3): 182 -190.
- IPEN- International pollutants elimination network (2017). La COP 1 en el convenio de Minamata – Informe sobre el artículo 3: Fuentes de suministro y comercio de mercurio. Disponible en: https://ipen.org/sites/default/files/documents/ES-print-ipen-brief-mercury-trade-v1_0-es.pdf
- IPCS (1990). Methylmercury. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 101).
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M et al. (2004) Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. *Redox Report* 9(5):237–247.
- Jafari, H., Rahmatian, A., Sayehmiri, F., Rafiei, M. (2020). The Relationship Between the Level of Copper, Lead, Mercury and Autism Disorders: A Meta-Analysis. *Pediatric Health Medicine and Therapeutics*.11:369-378. doi: 10.2147/PHMT.S210042. PMID: 33061742; PMCID: PMC7519826.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. & Beregowda, K. (2014). Toxicity, mechanism and health, effects of some heavy metals. *Interdisciplinar toxicology*, 7(2), 60-72.
- Jayawardena, U.A., Wickramasinghe, D.D., Ratnasooriya, W.D. and Udagama, P.V. (2013). Heavy metal induced toxicity of the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environmental toxicology and chemistry*.

- Jayawardena, U. A., Angunawela, P., Wickramasinghe, D. D., Ratnasooriya, W. D., & Udagama, P. V. (2017). Heavy metal-induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), 2855–2867. <https://doi.org/10.1002/etc.3848>
- Jayawardena, U., Wickramasinghe, D., Udagama, P. (2021). Cytogenotoxicity evaluation of a heavy metal mixture, detected in a polluted urban wetland: micronucleus and comet induction in the indian Green frog (*Euphlyctis hexadactylus*) erythrocytes and the *Allium cepa* bioassay. *Chemosphere* 277 (130278).
- Ježek, J., Cooper, K. & Strich, R. (2018). Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants* (Basel), 7(1):13. doi: 10.3390/antiox7010013. PMID: 29337889; PMCID: PMC5789323.
- Kalsbeeky, D. & Golsteyn, R. (2017). G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 23444.
- Kaur, R., Kumar, T., Kaur, S. & Rani, S. (2018). A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment. *The Pharma Innovation*, 7 (1): 353 – 359.
- Karr, J. (2006). Seven foundations of Biological monitoring and assessment. *Biologia ambientale*. 20 (2): 7 -18.
- Kern, J. K., Geier, D. A., Sykes, L. K., Haley, B. E., & Geier, M. R. (2016). The relationship between mercury and autism: A comprehensive review and discussion. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 37, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.06.002>
- Kour, P. (2014). Genotoxic Effects of Some Heavy Metals on Frogs (Amphibians). Tesis sometida a la Universidad de Jammu para optar por el título de doctor de filosofía en Zoología. Jammu India.
- Kumar R., & Banerjee TK. (2016). Arsenic induced hematological and biochemical responses in nutritionally important catfish *Clarias batrachus* (L.). *Toxicol Rep*. 2016 Jan 8; 3:148-152. doi: 10.1016/j.toxrep.2016.01.001. PMID: 28959533; PMCID: PMC5615784.

- Kumar, A., Nagpure, N. & Trivedi, S. (2011). Haematological responses in a freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to profenofos. *National Academy Science Letters*, 34 (9): 359 – 365.
- Krupina, K., Goginashvili, A. & Cleveland, D. (2021). Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*. 2021 Jun;70:91-99. doi: 10.1016/j.ceb.2021.01.004. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610905; PMCID: PMC8119331.
- Kneissig, M., Keuper, K., Pagter, M., Van Roosmalen, M., Martin, J., Otto, H., Passerini, V., Campos, A., Renkens, I., Kropveld, F., Vasudevan, A., Sheltzer, J., Kloosterman, W., Storchova, Z. (2019) Micronuclei-based model system reveals functional consequences of chromothripsis in human cells. *eLife* 8:e50292.
- Lacerda, L. & Malm, O. (2008). Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. *Estud. Av.*, 22(63), 173-190.
- Lajmanovich, R., Cabagna, M., Peltzer., P., Stringhini, G. & Attademo, A. (2005). Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research*, 587, 67-72.
- Leblanc, G. (2004). Basics of environmental toxicology. En: A Textbook of modern toxicology. 3^{ra} edición. 463-478
- Lechler, P., Miller, J., Lacerda, L., Vinson, D., Bonzongo, J., Lyons, W. & Warwick., J. (2000). Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments. *The science of the total environment*, 260, 87-96.
- Liu, W., Yang, T., Xu, Z., Xu, B., & Deng, Y. (2019). Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free radical research*, 53(1), 26–44. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1546852>
- Lin, H., Lu, X., Liang, L. & Gu, B. (2015). Cysteine Inhibits Mercury Methylation by *Geobacter sulfurreducens* PCA Mutant Δ omcBESTZ. *Environmental Science and Technology*, 2(5): 144 – 148.
- Ligon, A. (2004). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Telómeros. Online version: <http://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30117/tel->

oacute;meros.

- Llop, S., Ibarlucea, J., Sunyer, J. & Ballester, F. (2013). Estado actual sobre la exposición alimentaria al mercurio durante el embarazo y la infancia, y recomendaciones en salud pública. *Gaceta sanitaria*, 27(3), 273-278.
- Lu, X., Lium Y., Johs, A., Zhao, L., Wang, T., Yang, Z., Lin, H., Elias, D., Pierce, E., Liang, L., Barkay, T. & Gu, Baohua, G. (2016). Anaerobic Mercury Methylation and Demethylation by *Geobacter bemi* Bem. *Environmental Science & Technology*. 50(8): 4366–4373
- Luzhna, L., Kathiria, P. & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetics* 4 (3).
- Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo* (P. Edición (ed.)
- Ma, M., Du, H. & Wang, D. (2019): Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review, Critical Reviews. *Environmental Science and Technology*, DOI: 10.1080/10643389.2019.1594517
- Madrid, G., Gracia, M., Marrugo, J. & Urango, I. (2011). Genotoxicidad de metales pesados (Hg, Zn, Cu, Pb y Cd) asociado a explotaciones mineras en pobladores del río San Jorge del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias*, 23, 103-111.
- Malmqvist, B. & Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation*, 29(2), 134-153.
- Marrugo, J., Benitez, L., Olivero, J., Lans, E. & Gutierrez, F. (2010) Spatial and seasonal mercury distribution in the Ayapel marsh, Mojana Region, Colombia. *International journal of environmental health research*, 20(6), 451-459.
- Madero, A. & Marrugo, J. (2011). Detección de metales pesados en bovinos, en los valles de los ríos Sinú y San Jorge, departamento de Córdoba, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*, 16(1), 2391-2401.
- Maktoof, A., Nuhair, R., Al-Saaedi, A & Aljanabi, Z. (2020). Study the impact of the concentration of mercury chloride on micronuclei formation and some organs of

- juveniles of *Ctenopharyngodonidella*. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. 14 (3): 2690 – 2695.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2022). Convenio de Minamata. Disponible on line: <https://www.minambiente.gov.co/asuntos-ambientales-sectorial-y-urbana/convenio-de-minamata/>. Consultado en: 30 de Mayo de 2022.
- Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. (1998). Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 410: 81-116.
- Miller MA, Zachary JF. (2017) Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2-43.e19. doi:10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1
- Mitkovska, V., Dimitrov, H. & Chassovnikarova, T. (2021). Chronic exposure to heavy metals induces nuclear abnormalities and micronuclei in erythrocytes of the Marsh forg (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). *Ecologia Balkanica*, 4: 97 – 108.
- Mojica, L. (2012) Evaluación del rendimiento de la técnica de procesamiento histotecnológico libre de xilol versus la técnica convencional en el laboratorio de patología interfacultades de la Universidad Nacional. Tesis de grado desarrollada para obtener el título de Patólogo Anatómico y clínico. Facultad de medicina, Departamento de patología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá- Colombia.
- Mousavi, S.E., & Yousefian, M. (2012). The alterations in the hematological parameters of endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, exposed to waterborne mercuric chloride. *Asian Journal of Animal Sciences*, 6(4): 154-163. doi:10.3923/ajas.2012.154.163
- Moller, P. (2006). The alkaline Comet Assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damafing exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98, 336-345.
- Moreno Angulo, G. E. (2014). Análisis ambiental de la cuenca alta del Río Cauca, sus actores principales y la afectación en el suministro de agua potable para la

- ciudad de Santiago de Cali. ¿Qué acción tomar? Santiago de Cali, Colombia: Universidad ICESI. Facultad de ingeniería. Maestría en Ingeniería Industrial.
- Mosquera, F., Trujillo, F., Caicedo, D. & Martínez, S. (2015). Indicios de biomagnificación de mercurio total (Hg) en las especies del género *Inia* (Cetartiodactyla: Iniidae) en los ríos Amazonas y Orinoco (Colombia). *Momentos de Ciencia*, 12(2), 88-92.
- Mosquera, Y. (2017). Concentración de mercurio total (Hg-T) de *Trachemys c callirostris* en las cuencas de los ríos Sinú y San Jorge en el departamento de Córdoba, Colombia. Tesis presentada como requisito para optar el título de Magister en medio ambiente y desarrollo.
- Morovvati, H., Nikpour, Y., Zolgharneine, H., Ronagh, M., Abdi, R. & Roshan, A. (2010). Histological changes in the liver of reared spotted scat (*Scatophagus argus* L.) after exposure to mercury. *Comparative Clinical Pathology* 21(1): 745 – 753.
- Murugan, N., Vigran, H., Miller, K., Golgin, A., Pham, Q., Sperry, M., Rasmussen, C., Karen, A., Kaplan, D. & Levin, M. (2022). Acute multidrug delivery via a wearable bioreactor facilitates long-term limb regeneration and functional recovery in adult *Xenopus laevis*. *Science advances* 8: 1-17.
- Muñoz, E. & Palacio, J. (2010). Efectos del cloruro de mercurio (Hgcl₂) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actualidades biológicas*, 32(93), 187-197.
- Nascimento, F., De Melo, D., Nunes, H. & Parise, M. (2020). Evaluation o DNA damage and toxicological methodology development: A bibliometric study. *Human and experimental toxicology*, 39 (6): 870 - 880
- Nabi S. (2014). Occurrence and Properties. In: Toxic Effects of Mercury. *Springer*, New Delhi.
- Nirchio, M., Chocó, O., Quizpe, P., Hernández, G & Oliveira, C. (2019). Efectos genotóxicos del cloruro de mercurio en el pez neotropical *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae: Cichlasomatini). *Revista de Biología tropical*, 67(4). DOI 10.15517/RBT.V67I4.34133.
- Novo J, Martins B, Raposo RS, Pereira FC, Oriá RB, Malva JO, Fontes-Ribeiro C. Cellular and Molecular Mechanisms Mediating Methylmercury Neurotoxicity and

- Neuroinflammation. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 18; 22(6):3101. doi: 10.3390/ijms22063101. PMID: 33803585; PMCID: PMC8003103.
- Nogara, P., Oliveira, C., Schmitz, G., Piquini, P., Farina, M., Aschner, M. & Rocha, J. (2019). Methylmercury's chemistry: From the environment to the mammalian brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(12). 129284
- Torre, O. & Ramos, M. (2013). Utilidad de la prueba de Micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650- 657.
- Truhaut, R: (1975). Ecotoxicology. A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. En A.D. McINTYRE y C.F. MILLS (eds.) (1975). *Ecological Toxicology Research: Effects of Heavy Metal and Organohalogen Compounds. Plenum Press.* New York.
- O'Connor, D., Hou, D., Sik, Y., Mulder, J., Duan, L., Wu, Q., Wang, S., Tack, F. & Rinklebe, J. (2019). Mercury speciation, transformation, and transportation in soils, atmospheric flux, and implications for risk management: A critical review. *Environment International*. 126: 747 – 761.
- Obiakor, M. O., Okonkwo, J., Nnabude, P., Ezeonyejaku, C. (2012). Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as in situ Aquatic Pollution Biomarker: a review. *Journal of Animal Science Advances*, 2(1), 123-130.
- Olivero, J. (2010). Efectos de la minería en Colombia sobre la salud humana. Universidad de Cartagena.
- Olivero, J., Agudelo, D. & Caballero, K. (2013). Morphometric parameters and total mercury in eggs of snowy egret (*Egretta thula*) from Cartagena Bay and Totumo Marsh, north of Colombia. *Marine Pollution Bulletin*, 69, 105–109.
- Olivero, J., Johnson, B. & Arguello, E. (2002). Human exposure to mercury in San Jorge Basin, Colombia (South America). *The Science of the Total Environment*, 289, 41-47.
- Olivero, J., Caballero, K. & Marrugo, J. (2011). Relation between localization of gold mining areas and hair mercury levels in people from Bolivar, North of Colombia. *Biological trace element research*, 144, 118-132.

- Olivero, J. & Johnson, B. (2002). El lado gris de la minería del oro: La contaminación del mercurio en el norte de Colombia. Grupo de química ambiental y computacional, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Cartagena - Colombia.
- Olivero, J., Young, F. & Caballero, K. (2014). Contaminación por mercurio en aire del distrito minero de San Martín de Loba en el departamento de Bolívar, Colombia. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(1), 7-13
- Ortiz, E., López, E., Sedeño, J., Uría, E., Morales, I., Pérez, M. & Shibayama, M. (2016). Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *Journal of environmental sciences* 46: 156 - 164
- Palacios, Y., Caballero, K. & Olivero, J. (2017) Mercury pollution by gold mining in a global biodiversity hotspot, the Choco biogeographic region, Colombia. *Chemosphere*.
- Palacio, I., Palacio, J. & Camargo, M. (2009). Aplicación de pruebas de micronúcleos a especies ictícolas tropicales silvestres comunes en dos ambientes lénticos de las zonas bajas de Colombia. *Actualidades biológicas*, 31(90): 67-77.
- Prati, M., Gornati, R., Boracchi, P., Biganzoli, E., Fortaner, S., Pietra, R., Sabbioni, E. & Bernardini, G. (2002). A comparative study of the toxicity of mercury dichloride and methylmercury, assayed by the frog embryo teratogenesis assay- *Xenopus* (FETAX). *Atla* 30: 23 – 32.
- Patrick L. (2002). Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev*, 7(6), 456–471.
- Peakall, D. B., & Lovett, R. J. (1972). Mercury: Its Occurrence and Effects in the Ecosystem. *BioScience*, 22(1), 20–25.
- Peña, E., Cantera, J. & Muñoz, E (Compiladores). (2012). Evaluación de la contaminación en ecosistemas acuáticos, estudio de caso en la laguna de sonso, cuenca alta del río Cauca Cali: Programa Editorial Universidad del Valle.
- Planes, E. & Fuchs, J. (2015). Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencia e investigación*. Tomo 65 (2).
- Ponton, D., Lavoie, R., Leclerc, M., Bilodeau, F., Planas, D. & Amyot, M. (2021). Understanding food web mercury accumulation through trophic transfer and

- carbon processing along a river affected by recent run-of-river dams. *Environmental Science and Technology*, 55(5): 2949 – 2959.
- Porto, J., Araujo, C. & Feldberg, E. (2004). Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97(3): 287 - 292
- Pollo, F.E., Grenat, P.R., Otero, M.A., Salas, N.E., Martino, A.L., 2016. Assessment in Situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 466e474.
- Qu, P., Pang, M., Wang, P., Ma, X., Zhang, Z., Wang, Z. & Gong, Y. (2022). Bioaccumulation of mercury along continuous fauna trophic levels in the Yellow river estuary and adjacent sea indicated by nitrogen stable isotopes. *Journal of Hazardous Materials*. 432, 128631. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389422004204>.
- Queiroz, M. L., Bincoletto, C., Quadros, M. R., & De Capitani, E. M. (1999). Presence of micronuclei in lymphocytes of mercury exposed workers. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 21(1), 141–150. <https://doi.org/10.3109/08923979909016399>
- Racero, J., Pinedo, J., Ballesteros, J. & Marrugo, J. (2017). Metales pesados en especies de murciélagos (Quiróptera) asociados a una finca bajo manejo silvopastoril en el departamento de Córdoba, Colombia. *Acta zoologica mexicana*, 33(1).
- Rajkumar V & Gupta V. (2022). Toxicidad de metales pesados. [Actualizado el 28 de enero de 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560920/>
- Ramírez, A. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67, 49-58.
- Ramírez-Pinilla, M.P., M. Osorno-Muñoz, J.V. Rueda, A. Amézquita y M. C. Ardila-Robayo 2004. *Colostethus fraterdanieli*. En: IUCN 2015. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.2. Electronic Database accessible at <http://www.iucnredlist.org/>.

- Rendon, B., Zapata, B., Páez, V, Palacio, J. (2014). Niveles de mercurio en huevos, embriones y neonatos de *Trachemys callirostris* (Testudines, Emydidae). *Acta biológica Colombiana*, 19(3), 499-506.
- Renu, K., Chakraborty, R., Myakala, H., Koti, R., Famurewa, A., Madhyastha, H., Vellingiri, B., George, A. & Gopalakrishnan, A. (2021). Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review. *Chemosphere* 271, 128735.
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). Contaminación Por Metales Pesados: Implicaciones En Salud, Ambiente Y Seguridad Alimentaria. *Ingeniería Investigación Y Desarrollo*, 16(2), 66–77.
- Rincón, G., & Sánchez, C. (2021). Short Assay Design for Micronucleus Detection in Human Lymphocytes. *BioMed research international*, 2021, 2322257. <https://doi.org/10.1155/2021/2322257>
- Riaño C, M. Ortiz-Ruiz, Pinto-Sánchez N. R, E. Gómez-Ramírez. (2020). Effect of glyphosate (Roundup Activo®) on liver of tadpoles of the Colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (Amphibia: Anura), *Chemosphere* 126287
- Rodriguez, A., Noriss, E. & Fundora, M. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184-194.
- Rosales-Rimache, J. A., Elizabeth Malca, N., Alarcón, J. J., Chávez, M., & Gonzáles, M. A. (2013). Daño genotóxico en trabajadores de minería artesanal expuestos al mercurio. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, 30(4), 595–600.
- Sánchez-Alarcón J, Milić M, Bustamante-Montes LP, Isaac-Olivé K, Valencia-Quintana R, Ramírez-Durán N. (2021). Genotoxicity of Mercury and Its Derivatives Demonstrated In Vitro and In Vivo in Human Populations Studies. *Systematic Review. Toxics*; 9(12):326. doi: 10.3390/toxics9120326. PMID: 34941760; PMCID: PMC8704886.
- Saenphet, K., Saenphet, S., Intamong, J., Nakas, T. & Bumcharoen, W. (2018). cute toxicity and histopathological changes in livers of frog tadpoles (*Hoplobatrachus rugulosus*) exposed to bioinsecticides derived from *Azadirachta indica* A. Juss.,

- Stemona curtisii* Hook.F., and *Mammea siamensis*. *Comp Clin Pathol* 27, 939–946 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2685-6>
- Saikat Mitra, Arka Jyoti Chakraborty, Abu Montakim Tareq, Talha Bin Emran, Firzan Nainu, Ameer Khusro, Abubakr M. Idris, Mayeen Uddin Khandaker, Hamid Osman, Fahad A. Alhumaydhi, Jesus Simal-Gandara. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science* 34, 3.
- Savale, S.K. (2018). Genotoxicity of drugs: Introduction, prediction and evaluation. *Asian Journal of Biomaterial Research* 4 (6): 1- 29.
- Sastre, G. & Ruiz, J. (2017). Identificada una nueva vía de regulación en la reparación de roturas de doble cadena en el ADN de células humanas. *Genética Médica News*. Disponible en: [https://genotipia.com/genetica_medica_news/roturas-de-doble-cadena/#:~:text=Las%20roturas%20de%20doble%20cadena%20en%20el%20ADN%20\(DSBs%2C%20del,o%20contribuyan%20al%20desarrollo%20tumoral.](https://genotipia.com/genetica_medica_news/roturas-de-doble-cadena/#:~:text=Las%20roturas%20de%20doble%20cadena%20en%20el%20ADN%20(DSBs%2C%20del,o%20contribuyan%20al%20desarrollo%20tumoral.)
- Sánchez-Alarcón J, Milić M, Bustamante-Montes LP, Isaac-Olivé K, Valencia-Quintana R, Ramírez-Durán N. Genotoxicity of Mercury and Its Derivatives Demonstrated In Vitro and In Vivo in Human Populations Studies. Systematic Review. *Toxics*. 2021 Dec 1;9(12):326. doi: 10.3390/toxics9120326. PMID: 34941760; PMCID: PMC8704886.
- Santana, L., Sarkis,J., Azevedo, J., Ulrich,J. & Hortellani, M. (2011). Estimate of uncertainty of measurement in the determination on Zn, Cu, Hg and Pb in fish muscle. International nuclear atlantic conference INAC Belo Horizonte, Brazil.
- Santovito, A., Audisio, M. & Bonelli, S. (2020). A micronucleus assay detects genotoxic effects of herbicide exposure in a protected butterfly species. *Ecotoxicology* 29, 1390–1398. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02276-3>.
- Stefansson, E., Heyes, A. & Rowe, C. (2013). Accumulation of dietary methylmercury and effects on growth and survival in two estuarine forage fish: *Cyprinodon variegatus* and *Menidia beryllina*. *Environmental toxicology and Chemistry*, 32(4), 848-856.

- Sagahieh, A., Hedayati, A., Savari, A., Movahedinia, A. (2011). Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. *Toxicology and industrial health*, 28 (7): 583 – 592.
- Shandilya, A.; Mehan, S.; Kumar, S.; Sethi, P.; Narula, A.S.; Alshammari, A.; Alharbi, M.; Alasmari, A.F. (2022). Activation of IGF-1/GLP-1 Signalling via 4-Hydroxyisoleucine Prevents Motor Neuron Impairments in Experimental ALS-Rats Exposed to Methylmercury-Induced Neurotoxicity. *Molecules* 2022, 27, 3878. <https://doi.org/10.3390/molecules27123878>
- Semionov, A. (2018) Minamata Disease—Review. *World Journal of Neuroscience*, 8, 178-184. <https://doi.org/10.4236/wjns.2018.82016>
- Shi, Q., Sun, N., Kou, H., Wang, H. & Zhao, H. (2018). Chronic effects of mercury on *Bufo gargarizans* larvae: Thyroid disruption, liver damage, oxidative stress and lipid metabolism disorder. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164 (2018) 500–509
- Silva, M., Fraga, R., Nishiyama, P., Costa, N., Silva, I., Brandão, A., Queiroz, T., Rocha, M. & Juncá, F. (2021). In situ assessment of genotoxicity in tadpoles (Amphibia: Anura) in impacted and protected areas of Chapada Diamantina, Brazil. *Scientia Plena*, 17(2): 021701.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Srivastava, R., Mishra, N., Singh, U. & Srivastava, R. (2016). Genotoxicity: mechanisms and its impact on human diseases. *Octa Journal of Biosciences*, 4 (2): 67-70.
- Soe, P.S.; Kyaw, W.T.; Arizono, K.; Ishibashi, Y.; Agusa, T. Mercury Pollution from Artisanal and Small-Scale Gold Mining in Myanmar and Other Southeast Asian Countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 6290. <https://doi.org/10.3390/ijerph19106290>
- Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 24; 21(4):1534. doi: 10.3390/ijms21041534. PMID: 32102335; PMCID: PMC7073234.

- Trivedi, S., Singh, S., Trivedi, A. & Kuma, M. (2022). Mercuric chloride-induced oxidative stress, genotoxicity, haematological changes and histopathological alterations in fish *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Journal of Fish Biology*, 100 (4): 868 - 883.
- Tirichen, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R. & Li, Y. (2021). Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Frontiers in physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.627837>
- Tibau, V, Grube, B. (2019). Mercury Contamination from Dental Amalgam. *Journal of health and pollution*. 4; 9(22):190612. doi: 10.5696/2156-9614-9.22.190612. PMID: 31259088; PMCID: PMC6555253.
- Tolosa, Y., Molina, C., Restrepo, A. & Daza, J. (2014). Sexual maturity and sexual dimorphism in a population of the rocket frog *Colostethus aff. fraterdanieli* (Anura: Dendrobatidae) on the northeastern Cordillera Central of Colombia. *Actualidades biológicas*, 37(102), 287- 294.
- Toro, L. (2013). Mercurio total en heces de nutria (*Lontra longicaudis*) en los embalses Porce II y Porce III. Maestría en medio ambiente y desarrollo. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A. & Sutton, D. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS*, 101, 133-164.
- Tumanyan, A.F., Seliverstova, A.P. & Zaitseva, N.A. Effect of Heavy Metals on Ecosystems. *Chem Technol Fuels Oils* 56, 390–394 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10553-020-01149-z>
- Umbreit, N., Zhang, C., Lynch, L., Blaine, L., Cheng, A., Tourdot, R., Sun, L., Almubarak, H., Judge, K., Mitchell, T., Spektor, A. & Pellman, D. (2020). Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error. *Science*, 368 (6488).
- UN Environment, 2019. Global Mercury Assessment 2018. UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland ISBN: 978-92-807-3744-8
- Valbuena, S & Navarro, M. (2021). Mercurio total en bagre rayado y bocachico del río Meta, Colombia. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 24(2):e1880.

<http://doi.org/10.31910/rudca.v24.n2.2021.1880>

- Vargas, S. & Marrugo, J. (2019). Mercurio, metilmercurio y otros metales pesados en peces de Colombia: Riesgo por ingesta. *Acta Biológica Colombiana*; 24(2): 232-242.
- Valko M, Rhodes CJ, Monocol J, Izakovic-Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interac*, 160, 1–40.
- Vásquez, A. (2001). Evaluación por espectrometría de absorción atómica de mercurio en aguas del tramo sur del río Cauca. Santiago de Cali, Valle del Cauca. Colombia.
- Vergara, A. (2014). Evaluación del efecto genotóxico y la susceptibilidad individual por exposición a plomo ambiental en la vereda la Bonga, Atlántico, Colombia. Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Maestría en Toxicología, Facultad de medicina. Universidad Nacional de Colombia.
- Vera, J., Natale, G., Soloneski, S., Ronco, A. & Larramendy, M. (2010). Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere*, 78(3): 249 – 255.
- Vighi, M. & Villa, S. (2013). Ecotoxicology: The challenges for the 21st Century. *Toxics*, 1; 18-35.
- Wallin C, Friedemann M, Sholts SB, Noormägi A, Svantesson T, Jarvet J, Roos PM, Palumaa P, Gräslund A, Wärmländer SKTS. (2019). Mercury and Alzheimer's Disease: Hg (II) Ions Display Specific Binding to the Amyloid- β Peptide and Hinder Its Fibrillization. *Biomolecules*. 2019 Dec 27; 10(1):44. doi: 10.3390/biom10010044. PMID: 31892131; PMCID: PMC7022868.
- Washabau, R., Day, M. (2013). Liver. *Canine and Feline Gastroenterology*, 849–957. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4>
- Wada, H., Bergeron, C., McNabb, F., Todd. & Hopkins, G. (2011). Dietary mercury has no observable effects on thyroid mediated processes and fitness related traits in Wood frogs. *Environmental Science Technology*. 45 (18): 7915-7922.
- Weinberg, J. (2013). Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. IPEN-International Pops Elimination Network.
- Wiechmann AF, Wirsig-Wiechmann CE. (2003) Color atlas of *Xenopus laevis* histology

(Vol. 1). Springer Science & Business Media.

- Woolley, A. (2008). A guide to practical toxicology. Evaluation, prediction, and risk. 2^{da} edición. New York.
- Wyatt, L. H., Luz, A. L., Cao, X., Maurer, L. L., Blawas, A. M., Aballay, A., Pan, W. K., & Meyer, J. N. (2017). Effects of methyl and inorganic mercury exposure on genome homeostasis and mitochondrial function in *Caenorhabditis elegans*. *DNA repair*, 52, 31–48. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.02.005>
- Yansura, J. (2021). The rise in illicit gold. En: The Gold Standard: addressing illicit financial flows in the Colombian Gold sector through greater transparency. Global financial Integrity, Alliance for responsible mining y Cedetrabajo. Disponible en: https://gfintegrity.org/wp-content/uploads/2021/02/Colombia-Gold-EN_2.10.21.pdf
- Yard, E., Horton, J., Schier, J., Caldwell, K., Sanchez, C., Lewis, L. & Gastañaga, C. (2012). Mercury exposure among artisanal gold miners in Madre de Dios, Perú: A cross-sectional study. *Journal Medical toxicology*, 8, 441-448.
- Ye, C., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., Horne, S., Regan, S. & Heng, H. (2019). Micronuclei and Genome Chaos: Changing the System Inheritance. *Genes (Basel)*. May 13;10(5):366. doi: 10.3390/genes10050366. PMID: 31086101; PMCID: PMC656273.
- Yoshimura, A., Suemasu, K. & Veiga, M. (2021). Estimation of Mercury Losses and Gold Production by Artisanal and Small Scale Gold Mining (ASGM). *Journal of Sustainable Metallurgy*; <https://doi.org/10.1007/s40831-021-00394->
- Zamora, M. (2020). La inestabilidad genética asociada a un puente de anafase formado por un cromosoma dicéntrico: Aspectos teóricos y estudio preliminar de un caso práctico. Universidad de La Laguna. San Cristóbal de la Laguna. España.
- Zapata, L., Bock, B. & Palacio. (2014). Mercury concentrations in tissues of Colombian slider turtles, *Trachemys callirostris* from northern Colombia. *Bull Environ Contam Toxicol*.
- Zakrzewski, S. (2002). Environmental Toxicology, 3er Edition. Oxford University Press, 198 Madison Avenue, New York.
- Zhang, C., Xin, W., Du, J., Gu, Z. & Zhao, Y. (2020) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/advs.202002797>

- Zefferino, R., Piccoli, C., Ricciardi, N., Scrima, R. & Capitanio, N. (2017). Possible mechanism of mercury toxicity and cancer promotion: Involvement of gap junction intercellular communications and inflammatory cytokines. *Hindawi, Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017:1-6
- Zillioux, E J, Porcella, D B, B. J. M. (1993). Freshwater Wetland Ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 2245–2264.
- Zhu, W., Zhang, M., Chang, M., Zhu, W., Li, C., Xie, F., Zhang, H., Zhao, T. & Jiang, J. (2019). Characterizing the composition, metabolism and physiological functions of the fatty liver in *Rana omeimontis* tadpoles. *Frontiers in Zoology* 16 (42).