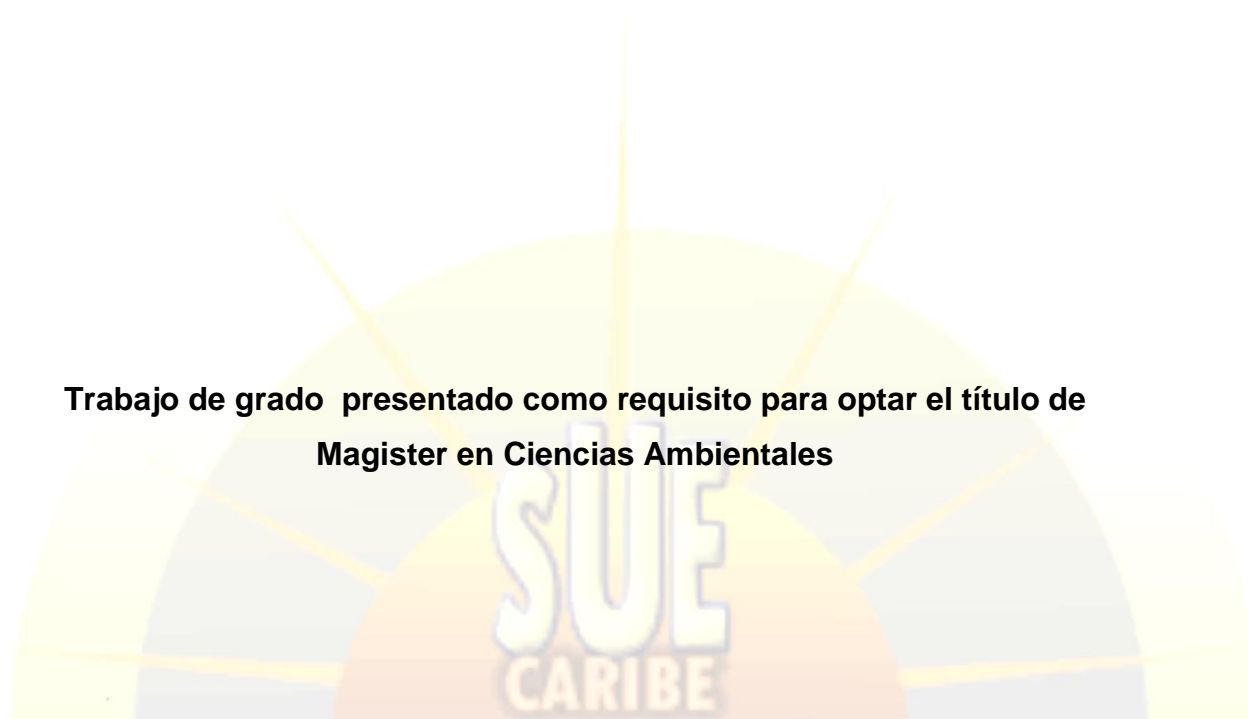


**INTEGRIDAD HISTOLÓGICA DE LA IGUANA VERDE (*Iguana iguana*) PROVENIENTE  
DE ZONAS MINERAS DE CARBÓN EN EL DEPARTAMENTO DEL CESAR**

**BERTHA IRINA GASTELBONDO PASTRANA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Magister en Ciencias Ambientales**



**Sistema Universitario Estatal del Caribe Colombiano**

**SUE-CARIBE**

**Maestría en Ciencias Ambientales**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
Cartagena, abril de 2014**

**INTEGRIDAD HISTOLÓGICA DE LA IGUANA VERDE (*Iguana iguana*) PROVENIENTE  
DE ZONAS MINERAS DE CARBÓN EN EL DEPARTAMENTO DEL CESAR**

**BERTHA IRINA GASTELBONDO PASTRANA**

**Prof. JESÚS OLIVERO VERBEL. Ph.D.  
Director**

**Prof. MARIA CECILIA GARCIA ESPÍNEIRA. Esp.  
Co-Directora**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Magister en Ciencias Ambientales**

**Sistema Universitario Estatal del Caribe Colombiano**

**SUE-CARIBE**

**Maestría en Ciencias Ambientales**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
Cartagena, abril de 2014**

Nota de Aprobación del Jurado

---

---

---

---

Jurado

---

Jurado

CARTAGENA DE INDIAS, 2014.

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo

CARTAGENA DE INDIAS, 2014.

## ABSTRACT

Colombia is the second South American country to have the greatest coal reserves and the Caribbean coast the main production area of the country. Nevertheless, coal is thought to be the most contaminating energy source, with negative effects on environment and human health. The goal of this research was to assess the histopathological integrity of green iguana (*Iguana iguana*) from La Loma, Cesar; a town with a vast zone of coal mining. To achieve this, 20 iguanas were collected, 10 coming from La Loma and 10 belonging to Valledupar (reference site). The specimens were euthanized and organs such as lung, heart, liver, spleen and kidney isolated to evaluate histological findings using hematoxylin-eosin (H-E) stain to assess morphology and Fontana Masson stain to identify and characterize melanin. Results showed that iguanas living around the coal mines presented alterations in spleen and liver. In this last organ was observed a higher presence of melanin-loaded macrophages compared to the reference site. The iguanas exposed show increased melanin deposits, reflecting the degree of oxidative stress. Since melanin is considered a biopolymer with hepatic antioxidant properties, these findings support the conclusion that exposure to coal may be responsible for damage to the tissue level. Additionally, in spleen there was evidence some unusual characteristics, perhaps in response to rare antigens or as an effect of a possible immunotoxicity. In conclusion, the histological alterations found in Green iguanas showed plausible target organs of this species and the sensibility to pollutants generated by the coal mining. According to this research, *I. iguana* could be useful as a bioindicator of environmental contamination in this type of activities.

**Keywords:** *Iguana iguana*; Coal mining; Cesar, Colombia; Melanin.

## RESUMEN DEL PROYECTO

Colombia es el segundo país suramericano con las mayores reservas de carbón, siendo la región Caribe la principal productora de carbón en el país. Sin embargo, el carbón es considerado la fuente de energía más contaminante, con efectos negativos sobre el ambiente y la salud humana. El objetivo de esta investigación fue valorar la integridad histopatológica de la Iguana verde (*Iguana iguana*) proveniente de La Loma, Cesar, corregimiento con una amplia zona de minería carbonífera. Para tal fin fueron colectadas 20 iguanas, de las cuales 10 provenían de La Loma y 10 pertenecían a Valledupar (sitio de referencia). Después de la inducción de anestesia, los especímenes fueron diseccionados y obtenidas muestras de pulmón, hígado, riñón y bazo para análisis histopatológico mediante tinción con HE (Hematoxilina-Eosina). La morfología y la presencia de melanina en los cortes de los tejidos fueron evaluadas mediante FM (Fontana Masson). Los resultados mostraron que las iguanas que habitaban alrededor de las minas de carbón presentaron alteraciones a nivel de bazo e hígado, en este último órgano fue observada una mayor presencia de macrófagos cargados de Melanina, en comparación con el sitio de referencia. Adicionalmente, en el bazo fue posible evidenciar algunas características inusuales, tal vez como respuesta al antígeno o como efecto relacionado con una posible inmunotoxicidad. Para efectos de caracterizar los depósitos pardos en el hígado, fue realizada la técnica FM con la cual se confirmó que la sustancia que recubría los macrófagos del hígado era melanina. En conclusión, las alteraciones histológicas encontradas en la iguana verde demostraron la sensibilidad de esta especie a contaminantes generados por la minería del carbón, por lo que la *I. iguana* podría ser útil como bioindicador de contaminación ambiental para este tipo de actividades.

**Palabras Clave:** *Iguana iguana*, Minería de carbón, Cesar; Colombia; Melanina.

## INTRODUCCIÒN

El carbón es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza y su alto grado de combustible fósil le permite ser usado para la generación de energía (Chen et al, 2005). Según el ministerio de minas y energía, Guajira, Cesar y Córdoba, registran las mayores reservas de Carbón térmico de Colombia (Ministerio de Minas y Energía, 2006). Sin embargo, el carbón es considerado la fuente de energía más contaminante (Silva et al., 2009), con efectos negativos medioambientales en todas las etapas de su proceso productivo (minería, transporte, almacenamiento, preparación o transformación) y durante su consumo o utilización (José et al., 2010; León-Mejía et al., 2011, Silva et al., 2009). En algunas áreas cercanas a las minas, existen problemas ecológicos como resultado de los procesos de minería (Geras'kin et al., 2011).

Desde su exploración, la minería del carbón provoca grandes cambios físicos, químicos y biológicos en los ecosistemas locales. El agua, el suelo y la biota resultan directamente comprometidas (Wayland et al., 2006). Son variadas las causas de problemas de contaminación ambiental derivados de la minería del carbón, las que han sido evidenciadas a través del tiempo y las que han llevado a que este compuesto sea asociado con procesos de desintegridad ecológica y alta mortalidad por cáncer (Silva et al., 2009). Adicionalmente, elevados niveles de compuestos derivados de la minería, como los metales pesados, han sido reportados en el agua y la biota acuática de ecosistemas ubicados en territorios cercanos a minas de carbón (Mamurekli, 2010), haciendo necesario el biomonitoreo o evaluación del riesgo ecológico y ambiental provocado por esta actividad en determinada zona minera de nuestro país.

Es importante reconocer que muchos efectos de los tóxicos ambientales están asociados con mecanismos de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, que en condiciones de exposición crónica pueden desencadenar severas alteraciones histopatológicas, permitiendo demostrar la relación entre lesiones tisulares y el

impacto ambiental de los contaminantes (Liu et al., 2000; Au, 2004; D'Agostini et al., 2008; Costa y Costa, 2008; Bornman et al., 2010; Pekmez et al., 2010; Kimura et al., 2010; Nunes et al., 2011).

Además de utilizar los análisis químicos para evaluar los impactos de estos contaminantes en el medio ambiente, resulta muchas veces necesario el uso de bioindicadores, los cuales son empleados con frecuencia para evaluar la condición de un organismo como resultado de la exposición a contaminantes presentes en el medio ambiente (Martin y Black, 1998). Haciendo pertinente, la valoración de tejidos vitales en la especie a evaluar, para con ello, asociar los posibles trastornos encontrados con la presencia y exposición a contaminantes derivados de la minería del carbón.

Por otra parte, el uso de especies reptiles como bioindicadores de contaminación ambiental, ha sido reportado en ciertos estudios, resaltando capacidades como persistencia en una variedad de hábitats, distribución geográfica amplia, longevidad y en muchos casos, la fidelidad al sitio (Sciarrillo et al., 2008). En adición a esto, los reptiles exhiben una sensibilidad a los contaminantes similar a la reportada para pájaros y mamíferos y ellos bioacumulan y biomagnifican los contaminantes a niveles iguales o mayores de los que han sido reportados para las especies antes mencionadas (Campbell y Campbell, 2000). De esta manera, el análisis de alteraciones histopatológicas ocasionadas por la minería del carbón en la especie reptil colombiana, *Iguana iguana* es de carácter relevante en la zona de estudio, debido a que este reptil, endémicamente está ubicado en zonas cercanas a las minas del carbón en el departamento del César (Chamorro-Rengifo y Cubillos-Rodríguez, 2007). Además la información bibliográfica en las diferentes bases de datos virtuales, sobre esta temática “Evaluación toxicológica por efectos a contaminantes ambientales en *I. iguana*”, es nula. Estos aspectos, hacen necesario el biomonitoreo de los efectos de la minería, a través de esta especie.

El presente estudio, fue llevado a cabo tomando como base, la hipótesis de que las iguanas verdes (*I. iguana*), provenientes de zonas impactadas por la minería carbonífera poseen alteraciones histopatológicas que no están presentes en las iguanas de aquellas zonas sin dicha actividad. El objetivo general del trabajo fue valorar la integridad histológica de la iguana verde (*Iguana iguana*) proveniente de zonas impactadas por la minería de carbón. Para lograrlo, fue necesario cumplir con los objetivos específicos: evaluar el estado de salud de las iguanas a través del estudio histológico de algunos de sus órganos; analizar el porcentaje de prevalencia de las afecciones histológicas observadas en las iguanas de las zonas de muestreo; examinar la presencia de melanina en las muestras de hígado de las iguanas recolectadas y determinar las diferencias significativas entre el tamaño de los depósitos de melanina presentes en las muestras de hígado obtenidas en ambas zonas de estudio.



## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>15</b>
<b>1.1. LA MINERÍA DE CARBÓN: GENERALIDADES</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1. Carbón</b>	<b>15</b>
<b>1.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS RESERVAS DE CARBÓN.</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1. Distribución del carbón a nivel mundial y en las Américas.</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2. Distribución del carbón en Colombia</b>	<b>18</b>
<b>1.2.3. Distribución del carbón en la Costa Atlántica</b>	<b>18</b>
<b>1.3. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARBÓN: MODELOS MOLECULARES</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1. Características de los compuestos asociados</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.2. Metales pesados</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1.3. Material particulado (MP)</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1.4. Flúor</b>	<b>21</b>
<b>2. IMPACTOS GENERADOS POR LA MINERÍA DEL CARBÓN.</b>	<b>21</b>

<b>2.1.</b>	<b>AMBIENTALES</b>	<b>22</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Efectos Moleculares del Carbón</b>	<b>22</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Celulares</b>	<b>23</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Tisulares</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>VALORACIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE CONTAMINANTES ASOCIADOS A LA MINERÍA DEL CARBÓN.</b>	<b>25</b>
<b>3.1.</b>	<b>BIOMARCADORES</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Importancia</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Tipos de biomarcadores de efectos</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Biomarcadores bioquímicos</b>	<b>26</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>Biomarcadores genotóxicos</b>	<b>27</b>
<b>3.1.5.</b>	<b>Biomarcadores hematológicos</b>	<b>28</b>
<b>3.1.6.</b>	<b>Biomarcadores inmunológicos</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7.</b>	<b>Biomarcadores histopatológicos</b>	<b>30</b>
<b>3.2.</b>	<b>BIONDICADORES</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Importancia</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>Características</b>	<b>34</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>Organismos biondicadores</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>REPTILES COMO BIONDICADORES</b>	<b>34</b>
<b>4.1.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>34</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Iguana verde</b>	<b>35</b>
<b>4.2.</b>	<b>BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS EN LA MINERÍA DEL CARBÓN</b>	<b>37</b>

4.2.1.	Análisis histopatológico en cortes de tejido	37
4.2.2.	Melanina hepática	38
5.	METODOLOGÍA	40
5.1.	AREA DE ESTUDIO	40
5.2.	PROCESO DE CAPTURA DE ESPECIES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS TISULARES	41
5.3.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	44
5.3.1.	Enfoque descriptivo	44
5.3.2.	Enfoque semi-cuantitativo	46
5.3.3.	Enfoque cuantitativo	47
5.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
6.	ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	47
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1.	ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVOS	48
7.1.1.	Prevalencia de alteraciones histológicas	48
7.2.	CARACTERIZACIÓN DE DEPÓSITOS DE MELANINA	58
7.3.	ÁREA DE DEPÓSITOS DE MELANINA	58
8.	CONCLUSIONES	62
9.	RECOMENDACIONES	62
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación del carbón según sus propiedades energéticas	16
<b>Tabla 2.</b> Características de Iguanas obtenidas en los sitios de muestreo	36
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de prevalencia de alteraciones histopatológicas identificadas en diferentes muestras tisulares de I. iguana para cada sitio de muestreo caracterizados de acuerdo a la escala de clasificación	43
<b>Tabla 4.</b> Evaluación semi-cuantitativa del tamaño de los depósitos de Melanina presentes en Iguanas de zonas control (Valledupar) y expuesta (La Loma)	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Proceso de formación del carbón	16
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del orden secuencial de las respuestas a estrés por contaminantes dentro de un sistema biológico	27
<b>Figura 3.</b> Iguana verde colombiana ( <i>Iguana iguana</i> )	31
<b>Figura 4.</b> Ubicación de áreas de estudio en el departamento del Cesar	35
<b>Figura 5.</b> Proceso de muestreo mediante búsqueda activa del animal	36
<b>Figura 6.</b> Proceso de anestesia y obtención de muestras de órganos.	38
<b>Figura 7.</b> Procedimiento coloraciones histopatológicas	39
<b>Figura 8.</b> Principales alteraciones en bazo de <i>I. iguana</i> proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar)	45
<b>Figura 9.</b> Corte histológico de bazo de <i>Iguana iguana</i>	46
<b>Figura 10.</b> Principales alteraciones en hígado de <i>I. iguana</i> proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y el sitio de referencia (Valledupar)	47
<b>Figura 11.</b> Principal alteración a nivel de hígado de <i>I. iguana</i> proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma)	48
<b>Figura 12.</b> Corte histológico de hígado de <i>Iguana iguana</i>	48
<b>Figura 13.</b> Principales alteraciones en Riñón de <i>I. iguana</i> proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar)	49
<b>Figura 14.</b> Alteración principal en Pulmón de <i>I. iguana</i> proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar)	50

**Figura 15.** Caracterización del Tamaño de depósitos de Melanina presentes en tejido hepático de iguanas del área de referencia (Valledupar) y el área expuesta (La Loma), ambas en el departamento del Cesar 51

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO 1.** PERMISO DE CORPOCESAR PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES.

## **1. MARCO TEÓRICO:**

### **1.1. LA MINERÍA DE CARBÓN: GENERALIDADES.**

**1.1.1. Carbón:** es una roca sedimentaria que contiene, en peso, más materia orgánica que inorgánica. Es originado a través de transformaciones físicas y químicas de grandes acumulaciones vegetales depositadas en ambientes palustres (pantanos), lagunares o deltaicos (Van, 1993; IEA, 2001; Miller, 2005). El carbón fue generado a partir de restos vegetales prehistóricos de los yacimientos, durante el período carbonífero iniciado hace 360 millones de años. Lignina y celulosa son las principales biomoléculas de origen vegetal involucradas en la formación del carbón, mediante el proceso denominado carbonificación. Este proceso presenta dos estadios, diagénesis y metamorfismo, que incluye las transformaciones del carbón desde la Turba hasta la Antracita (Figura 1), además de acuerdo a esta clasificación según el origen, el carbón también puede llegar a tipificarse basándose en los usos de este, como lo es detallado en el cuadro 1 (Ministerio de Minas y Energía, 2005; Elard y Leon, 2006).

Una de las clasificaciones más aceptadas para el carbón corresponde a la *American Society for Testing and Materials (ASTMD-388-777)*, mostrada en la Tabla 1, que lo divide en cuatro clases según las propiedades referidas a la composición de los vegetales y, las condiciones de presión y temperatura (grado de metamorfismo) a la que fueron sometidos durante su formación (Ministerio de Minas y Energía, 2005).

### Cuadro 1. Tipos de carbón y sus usos (Ministerio de Minas y Energía, 2005).

- ❖ **Antracita:** también llamado carbón duro. Usado como combustible en generación de calor o vapor en la industria térmica y siderúrgica, también se usa en la fabricación de goma sintética, colorantes y purificación de agua para consumo humano (filtros).
- ❖ **Hulla bituminosa:** este tipo de carbón posee un menor contenido de carbono y menor poder calorífico que los carbones antracíticos. Por su forma de uso se conocen como carbones coquizables, usados en procesos de obtención del acero, y carbones térmicos, usados en la producción de vapor para generación de energía.
- ❖ **Hulla sub-bituminosa:** con menor poder calorífico que los carbones bituminosos, tiene un elevado contenido de material volátil, algunos con poder coquizable. Es empleado en la generación de energía eléctrica y en procesos industriales.
- ❖ **Lignito y turba:** son carbones con alta humedad y alto contenido de ceniza y de material volátil, lo cual hace que posean un bajo poder calorífico. Es empleado para la generación de calórica (calefacción), energía eléctrica, para algunos procesos industriales en donde se requiere generar vapor y más recientemente se han fabricado briquetas de turba y lignito para quemarlas en hornos.

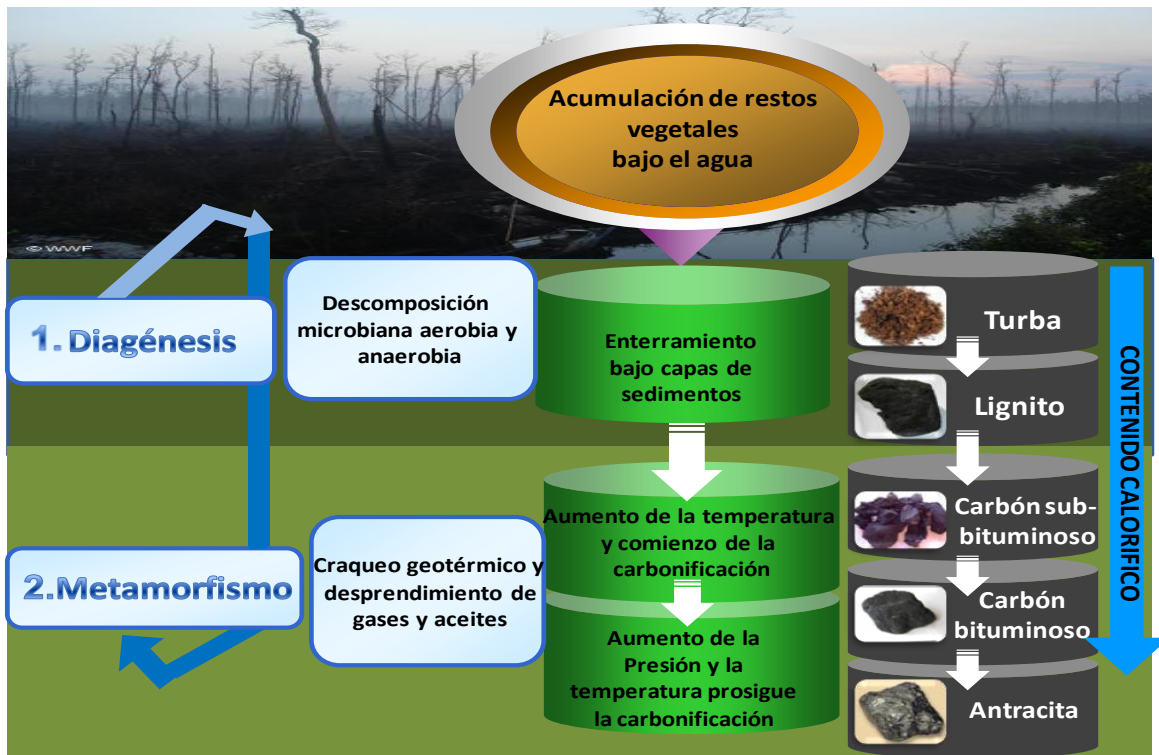


Figura 1. Proceso de formación del carbón. Etapa 1: Diagénesis, Etapa 2: Metamorfismo.



**Tabla 1.** Clasificación del carbón según sus propiedades energéticas.

Tipo	Carbono Fijo (%)	Material Volátil (%)	Contenido Humedad (%)	Poder Calorífico (Btu/lb)	Poder Calorífico (MJ/Kg)	Poder Calorífico Kcal/Kg
Antracita	86 - 98	1	< 15	>14.000	>32.6	>7.780
Bituminoso	45 - 86	32	15 - 20	10.500-14.000	24.5 - 32.6	5.800-7.780
Sub-bituminoso	35 - 45	50	20 - 30	7.800 - 10.500	18.2 - 24.5	4.300- 7.780
Lignito y Turba	25 - 35	96	> 30	4.000 - 7.800	9.3-18.2	2.200 - 4.300

Fuente: American Society for Testing and Materials (ASTMD-388-777). Cálculos (MJ/kg y kcal/kg) UPME 2005.

## 1.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS RESERVAS DE CARBÓN

**1.2.1. Distribución del carbón a nivel mundial y en las Américas.** El carbón es el combustible fósil más abundante en la naturaleza con 984.453 Mt (Millones de toneladas) en reservas mundiales medidas a finales del 2003, de los cuales 52,7% son carbones antracíticos y bituminosos y el 47,3% sub-bituminosos y lignitos (World Energy Council, 2003). El 96% de estas reservas se concentran en quince países con la mayor cantidad en Norte América y Asia. Los principales productores de carbón son: China, Estados Unidos (EEUU), India, Australia, Rusia y Sudáfrica los cuales aportan cerca del 82% de la producción mundial (Ministerio de Minas y Energía, 2005).

De acuerdo con los niveles de producción y consumo actuales, las mayores reservas mundiales de carbón serán suficientes para satisfacer la demanda del mismo durante los próximos 200 años. En Suramérica, se ubican el 1.9% de las reservas mundiales siendo Brasil y Colombia los principales países con zonas carboníferas recuperables (IEA, 2010).

**1.2.2. Distribución del carbón en Colombia.** Colombia cuenta con recursos potenciales de 16.992 Millones de toneladas (Mt) de los cuales 7.063 son medidas, 4.571 son indicadas, 4.237 son inferidas y 1.119 Mt son recursos hipotéticos. Por otra parte, es el sexto exportador de carbón del mundo, con una participación de 6,3% equivalentes a 50Mt anuales de carbón. Con la tasa de explotación actual, las reservas medidas de carbón en Colombia aseguran más de 120 años de producción, suficientes para participar a gran escala en el mercado internacional y abastecer la demanda interna (Sistema de Información Minero Colombiano – SIMCO, 2010).

El carbón, como fuente generadora de divisas y de empleo, concentra el 47% de la actividad minera nacional y representa el 1% del producto interno bruto colombiano con algo más de 3.4 billones de pesos. En los últimos años ha sido consolidado como el segundo producto de exportación nacional después del petróleo y bajo las condiciones de mercados actuales, entre el 2010 y 2015 podría llegar a superar las exportaciones de petróleo. El 95% de las reservas se ubica en los departamentos de La Guajira, Cesar, Córdoba, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Valle del Cauca y Cauca (Ministerio de Minas y Energía, 2005; IEA, 2010; Ministerio de Minas y Energía, 2006; Sistema de Información Minero Colombiano – SIMCO, 2010).

**1.2.3. Distribución del carbón en la Costa Atlántica.** Esta región, conformada entre otros, por los departamentos de La Guajira, Cesar y Córdoba, registra las mayores reservas de carbón térmico del país cuya exportación se facilita por encontrarse en zona costera. El tipo de carbón de esta región es bituminoso alto en volátiles, de buena calidad desde el punto de vista de su poder calorífico, con bajos contenidos de humedad, cenizas y azufre, que lo hacen competitivo en el mercado internacional para ser utilizado en la industria y en la generación de calor, vapor y electricidad (Ministerio de Minas y Energía, 2005).

### **1.3. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARBÓN: MODELOS MOLECULARES.**

En cuanto a su composición química, el carbón está conformado básicamente por elementos como carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. Al ampliar la estructura, puede observarse que este es una mezcla de variedad de productos químicos, especialmente hidrocarburos, entre los que son destacados los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Algunos de los HAPs encontrados en el carbón son benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, indeno, pireno y benzoperileno. Además de hidrocarburos, el carbón contiene altas concentraciones de varios metales pesados, tales como cobre (Cu), plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni), vanadio (V) y zinc (Zn), así como otros elementos tales como el flúor (Van Krevelen, 1993).

La estructura química del carbón es bastante compleja, aunque existen varios modelos moleculares como el de Wiser (1975), Solomon (1981) y Shinn (1984). En general, el carbón está constituido por una gran estructura policíclica, derivada de la condensación de numerosos anillos aromáticos, cicloalcanos, cadenas laterales alquilo y sustituyentes carbonilo, entre otros (Da Silva et al., 2000).

### **1.3.1. Características de los compuestos asociados.**

**1.3.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).** Los HAPs son un grupo de hidrocarburos conformados por dos o más anillos aromáticos unidos en forma de racimos, lineal o angular, caracterizados por su baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos. La presencia de HAPs en el carbón se relaciona con su biogénesis generadora de la estructura policíclica aromática característica de esta roca sedimentaria. Estudios realizados en países como Alemania, Canadá, Estados Unidos, Francia, Japón, China y Brasil han reportado la presencia de HAPs en el carbón (Stout y Emsbo-Mattingly, 2008; Pies et al., 2008; Achten y Hofmann, 2009). Entre los HAPs detectados son incluidos los 16-EPA-HPA, contaminantes prioritarios establecidos por US-EPA (Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos). El naftaleno corresponde a la molécula más pequeña perteneciente a este grupo, la cual ha sido incluida con

otros 15 HAPs, en el listado de los 126 contaminantes prioritarios establecidos por la US-EPA. La combustión incompleta de diferentes tipos de biomasa son consideradas como principales fuentes de HAPs (Hu et al., 2011).

**1.3.1.2. Metales Pesados.** El término “Metales pesados” es empleado para agrupar de forma general elementos metálicos y metaloides con densidad atómica alta ( $>4 \text{ g/cm}^3$  o más de 5 veces mayor que la del agua) y se caracterizan porque a bajas concentraciones generan efectos tóxicos o de envenenamiento. El carbón, como roca sedimentaria, ha sido reportado como fuente natural y antropogénica de metales pesados. Los metales arsénico(As), berilio (Be), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), plomo (Pb), antimonio(Sb), níquel (Ni) hierro(Fe) y vanadio (Va), son los que están principalmente asociados al carbón (Bradl, 2005; Cui et al., 2010; Wang, 2010). Cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg) y selenio (Se), son algunos ejemplos de metales pesados con mayor significancia ambiental y riesgo sobre la salud, estos pueden estar en parte asociados con materia orgánica e inorgánica (Dalway, 1998).

**1.3.1.3. Material particulado (MP):** Polvillo de carbón. El MP es un fragmento sólido pequeño constituido por una mezcla compleja de varios materiales tales como metales, hollín, tierra, polvo o una combinación de estos. Por lo tanto, cuando se consideran los posibles efectos tóxicos del polvillo de carbón, se está considerando la toxicidad de los minerales y otros contaminantes ambientales que pueden ser absorbidos y están asociados en el polvillo de carbón (Jones y Bérubé, 2006). Las dos principales clases de MP son,  $\text{MP}_{10}$  ( $>10 \mu\text{m}$ ) y  $\text{MP}_{2.5}$  ( $2.5 \mu\text{m}$ ). Los niveles de  $\text{MP}_{10}$  o  $\text{MP}_{2.5}$  en la atmósfera son reportados en microgramos de partículas por metro cúbico ( $\mu\text{g/m}^3$ ) y organizaciones como la EPA y la Unión Europea (EU) establecen los valores estándares permisibles de estos contaminantes del aire, basándose en la evidencia sobre su gran impacto en la salud tras su inhalación (EPA, 2010; EU-Commission Environmental, 2010).

En primer lugar, las partículas de carbón aunque de tamaño pequeño por su propia naturaleza química y área de superficie porosa, pueden ser tóxicas, al

contener Pb, Cd, Ni, Hg, As o radionúcleos. Adicionalmente, estas características permiten que compuestos aromáticos presentes en la atmósfera de minas tales como el benceno, metileno, fenol y fenantreno, puedan ser absorbidos por el polvo de carbón y ejercer así un efecto biológico lesivo (Dwivedi et al., 2012). En general, el carbón de tipo antracita ha sido asociado con las tasas más altas, por lo que es considerado de alta citotoxicidad y patogenicidad (Ming-Ho, 2005b; Vidic et al., 2010).

**1.3.1.4. Flúor.** El flúor es un elemento químico abundante en la superficie de la tierra, está presente naturalmente en la corteza terrestre y puede encontrarse en las rocas, el carbón y la arcilla, por lo que puede estar presente en pequeñas cantidades en el agua, aire, plantas y animales. Por lo tanto, los seres humanos están expuestos al flúor a través de alimentos, agua potable y en el aire que respiran (Gutiérrez-Salinas et al., 2010). El ion fluoruro proviene del elemento flúor, un gas que nunca se encuentra en estado libre en la naturaleza. El fluoruro es abundante en el medio ambiente y existe solo en combinación con otros elementos como los compuestos de flúor que son constituyentes de los minerales en las rocas y el suelo (Barbier et al., 2010).

## **2. IMPACTOS GENERADOS POR LA MINERÍA DEL CARBÓN.**

La minería del carbón es una actividad con un alto potencial de contaminación al medio ambiente. El carbón ha sido descrito como el contaminante más importante de todos los combustibles fósiles, porque contiene una mezcla heterogénea de compuestos mutagénicos y carcinogénicos entre los que se han identificado HAPs, metales pesados, material particulado y flúor (Miller, 2005), productoras de especies reactivas de oxígeno (EROs), que pueden llegar a provocar daños en el ADN. La exposición al carbón conduce a cambios profundos en las células, tejidos, poblaciones y ecosistemas (da Silva et al., 2005; Leffa et al., 2010).

Para el caso específico de los metales pesados, existen efectos tanto ambientales como en la salud humana, que persisten inclusive mucho tiempo después de que

las actividades mineras han cesado, debido a que la emisión de metales al ambiente continúa (Davidson et al., 2007; Nagajyoti et al., 2010; Moulis, 2010). Adicionalmente, el flúor es reconocido como un elemento que puede producir cambios agudos y/o crónicos en los seres humanos cuando están expuestos a éste. (Barbier et al., 2010).

## **2.1. AMBIENTALES.**

La combustión del carbón puede ocurrir de forma espontánea en zonas de actividad minera, así como también puede producirse la liberación de compuestos asociados, causando efectos perjudiciales al medio ambiente (León et al., 2007). Gran parte de la contaminación generada por cierto tipo de metales pesados e hidrocarburos aromáticos, es derivada principalmente de las plantas eléctricas de carbón, las cuales son fuentes puntuales de liberación de estos compuestos a la atmósfera (Vucetich et al., 2009; Sackett et al., 2010). Por otra parte, el MP generado durante los procesos de exploración y transporte del material, es una fuente de contaminación que genera una descarga masiva de partículas finas a partir del material estéril y del carbón removido, causando polución en aire y suelo (Orem y Finkelman, 2004; Ghose y Majee, 2007).

En cuanto a las vías de riesgo ambiental relacionadas con la minería del carbón, pueden mencionarse, las rutas aéreas, es decir, la resuspensión del polvillo, la emanación de radiactividad, la descarga de efluentes y volatilización de compuestos. Todos estos procesos producen efectos sobre el ecosistema, entre los cuales están la fitoacumulación, percolación de cuerpos de agua, suspensión de sólidos, pH desfavorable y altas concentraciones de contaminantes en el ambiente (Dellantonio et al., 2010).

Puede decirse que la minería del carbón tiene gran impacto en los ecosistemas cercanos, debido a la contribución de los drenajes líquidos provenientes de las zonas de explotación, así como por la exposición a un aire cargado con altas concentraciones de partículas potencialmente tóxicas y que son emitidas

continuamente durante las diversas etapas del proceso minero (Palmer et al., 2010).

**2.1.1. Efectos Moleculares del Carbón.** A nivel molecular, el impacto de la minería está enmarcado principalmente en la inducción de efectos subletales, como son el estrés oxidativo, alteraciones en la defensa antioxidante y roturas en el ADN de cadena sencilla (Kuzmick et al., 2007). En lo relacionado con la exposición a metales cancerígenos, tales como el arsénico trivalente [As (III)] y el cromo hexavalente [Cr (VI)], aparte de la inducción de estrés oxidativo, éstos poseen dos mecanismos moleculares más, implicados en la inducción de cáncer y genotoxicidad, como son el bloqueo de los procesos de reparación del DNA y la alteración en la regulación de la proliferación celular (Beyersmann y Hartwig, 2008; Wang et al., 2012).

De igual forma HAPs como el Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, son ejemplos de contaminantes asociados con cáncer (Walker, 2001; Moldoveanu, 2010). Las propiedades carcinogénicas de los HAPs están asociadas con su habilidad para lesionar el ADN e inducir mutaciones por medio de la inducción de estrés oxidativo (Walker, 2001; Costa et al., 2010). Park y col., (2009) reportaron que la unión del Receptor de hidrocarburos Aromáticos (AhR) a los HAPs media el daño oxidativo del ADN (formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina) por la translocación del ligando formado al núcleo. Mientras que, los efectos del fluoruro incluyen, inhibición de secreción de proteínas y/o síntesis, alteración de distintas vías de señalización implicadas en la proliferación y apoptosis, incluyendo las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), p53, de la proteína activadora-1 (AP-1) y del coeficiente kappa B de energía nuclear (NF- $\kappa$ B) (Barbier et al., 2010).

**2.1.2. Celulares.** En el ámbito celular, los contaminantes asociados al carbón confluyen en su mayoría por su capacidad para activar factores de transcripción nucleares que propician la secreción de factores de crecimiento, inducen la expresión de oncogenes y causan mutaciones de genes supresores de tumores

(Vallyathan et al., 1998;Schins y Borm, 1999;Beyersmann y Hartwig, 2008;McCunney et al., 2009).

La partícula de carbón ha sido catalogada como una fuente de contaminación por producir efectos inflamatorios y daño oxidativo, a través de reacciones mediadas por especies reactivas de oxígeno (EROs), en el tejido parenquimatoso pulmonar, estos efectos están caracterizados por la activación de la enzima superóxidodismutasa (SOD), aumento de marcadores de peroxidación lipídica y disminución de la defensa antioxidante (Pinho et al., 2004). Las alteraciones logradas por la partícula de carbón han sido indicadas por fenómenos como fuga de enzimas intracelulares, desbalance en el sistema de defensa antioxidante y alteraciones en el perfil lipídico y otros marcadores bioquímicos (Tuluce et al., 2010). Dentro del grupo de los HAPs, el Benzo(a)pireno (BP) ha sido estudiado como modelo a fin de comprender los mecanismos intracelulares de la genotoxicidad, carcinogénesis y mutagénesis de los HAPs (Walker, 2001). En adición a esto, el benzopireno altera la composición de la membrana plasmática de microestructuras a través del AhR, un proceso mediado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual induce eventos apoptóticos tempranos tales como la remodelación de la membrana que origina a su vez, alcalinización intracelular (Tekpli et al., 2010). La supresión inmune, entre otros procesos inmunotóxicos, es otro efecto celular de los HAPs, también mediado por la unión al AhR, contribuyendo, como todas las uniones HAP-AhR, a la formación de metabolitos procarcinógenos (Iwano et al., 2010).

Por otra parte, el flúor a nivel celular logra interaccionar con ciertas enzimas. En la mayoría de los casos, este actúa como inhibidor, pero en otras ocasiones puede estimular la actividad de la enzima. Los mecanismos dependen del tipo de enzima que suela verse afectada. A niveles micromolares es considerado como un agente anabólico eficaz, ya que promueve la proliferación celular, mientras que a concentraciones milimolares inhibe varias enzimas, incluyendo las fosfatasa tanto *in vivo* como *in vitro* (Barbier et al., 2010). Por estas razones el flúor ha sido asociado con la producción de diversas alteraciones metabólicas, como inhibición



de la glucólisis, cambios en los receptores de membrana, alteración en el balance energético total, roturas en el ADN y la inducción de apoptosis (Gutiérrez-Salinas et al., 2010).

**2.1.3. Tisulares.** Nuevas evidencias dan por hecho una importante contribución a la toxicidad tisular por parte de emisiones de combustión, la vasculatura sistémica principalmente ha sido objetivo de contaminantes asociados al carbón como los hidrocarburos (Campen et al., 2010). Además, otros contaminantes asociados al carbón, como el flúor, han sido relacionados con dañosa diferentes tipos de tejidos, a nivel de riñones, huesos, nervios y músculos (Gutiérrez-Salinas et al., 2010). La ingesta excesiva de flúor durante un largo periodo de tiempo puede dar lugar a una fluorosis, considerada un grave problema actual de salud pública, el cual es caracterizado por manchas dentales y manifestaciones esqueléticas tales como deformidad paralizante, osteoporosis y otros trastornos óseos (Gutiérrez-Salinas et al., 2010; Barbier et al., 2010). Por otra parte, han sido reportados daños metabólicos, funcionales y estructurales en muchos tejidos causados por fluorosis de tipo crónico (Barbier et al., 2010).

### **3. VALORACIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE CONTAMINANTES ASOCIADOS A LA MINERÍA DEL CARBÓN.**

A lo largo de los últimos años, han surgido técnicas que pueden ser usadas para monitorear la salud de los organismos expuestos crónicamente a los contaminantes. La vigilancia del medio ambiente por medio de sistemas de pruebas biológicas, llamados bioindicadores y biomarcadores, ofrece posibilidades prometedoras para identificar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente (da Silva et al., 2000).

### **3.1. BIOMARCADORES.**

Un biomarcador o indicador biológico de exposición, puede ser el propio compuesto, sus metabolitos característicos, los productos procedentes de reacciones de conjugación o de sus metabolitos, aductos formados por reacción del compuesto o por los metabolitos con macromoléculas, interferencias bioquímicas o enzimáticas medibles (Silberged y Davis, 1994; Periago, 2003; Barrett, 1997).

**3.1.1. Importancia.** Los biomarcadores son considerados una medida funcional de exposición a estresores ambientales, estos permiten prevenir la contaminación ambiental y la degradación de los recursos de los ecosistemas, puesto que antes de que los daños ambientales sean evidentes, la exposición a contaminantes, puede conducir a disminución de las tasas de crecimiento, niveles elevados de infecciones y enfermedades entre las especies, y disminución de las tasas de reproducción (Saito et al., 1996). Dependiendo del propósito se pueden definir en biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto. Los primeros son respuestas que indican la exposición a químicos, pero no proveen conocimiento de los efectos adversos en algún nivel del organismo, por ejemplo mediciones de citocromo P450 monooxigenasa, una gran familia de enzimas encontradas en todos los organismos, que indican exposición a xenobióticos; y los segundos, son los que permiten valorar efectos provocados por determinado xenobiótico o mezclas de estos, estos son detallados a continuación (Sánchez-Chardi et al., 2008).

**3.1.2. Tipos de biomarcadores de efectos.** Los biomarcadores de efectos, pueden determinarse de acuerdo con el sistema afectado, por ejemplo, bioquímicos, genotóxicos, hematológicos, inmunológicos e histopatológicos (Sánchez-Chardi et al., 2008).

**3.1.3. Biomarcadores bioquímicos.** La fuga de enzimas intracelulares, desbalance en el sistema de defensa antioxidante y alteraciones en el perfil

lipídico, entre otros, han permitido la inclusión de marcadores bioquímicos para la valoración de efectos producidos por los contaminantes al ecosistema y al medio ambiente en general (Tuluze et al., 2010).

La acetilcolinesterasa (AChE), lactato deshidrogenasa (LDH) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH) son inducidas por una variedad de compuestos naturales y sintéticos y juegan un papel importante en funciones fisiológicas específicas. Estudios recientes relacionan el rendimiento de este tipo de biomarcadores puesto que participan en importantes respuestas fisiológicas, tales como la neurotransmisión y el metabolismo energético (Oliva et al., 2012). En cuanto a la lesión hepática, antes de ésta ser aguda, puede diagnosticarse o excluirse con seguridad, utilizando ensayos en sangre, tales como alanina amino-transferasa (ALT) y aspartato amino-transferasa (AST), catalogadas como excelentes marcadores de hepatotoxicidad e injuria celular hepática (Antoine et al., 2013).

Las condiciones fisiológicas atípicas, provocadas por los xenobióticos, afectan también la actividad enzimática en sistemas de desintoxicación, enzimas como glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y Glutatión S-transferasa (GST) catalizan la conjugación de diversas sustancias con el glutatión, el cual juega un papel importante en el proceso de detoxificación contra el estrés oxidativo. Por esta razón, en gran variedad de estudios estas enzimas han sido consideradas marcadores bioquímicos (Sánchez-Chardi et al., 2008).

**3.1.4. Biomarcadores genotóxicos.** Existen pruebas que han sido determinadas como biomarcadores para evaluar riesgos potenciales de exposición ambiental a químicos cancerígenos y así detectar daño genotóxico (da Silva et al., 2000). Entre los diferentes biomarcadores relacionados con el proceso de carcinogénesis están: aductos de hemoglobina y albúmina (evaluación de la dosis biológicamente efectiva), aberraciones cromosómicas (CA), intercambio de cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN). Para la valoración directa de ADN, pruebas para determinar la fragmentación de ADN; el análisis de ADN de cadena sencilla puede

servir como un biomarcador útil de exposición, mediante el ensayo cometa (evaluación de efectos biológicos tempranos) y ensayos para detectar frecuencia de mutaciones como hipoxantina-guanina fosforribosil (HPRT) y glicoforina A (GPA), que permiten la evaluación de la respuesta biológica temprana (da Silva et al., 2000; Neri et al., 2005; Kuzmick et al., 2007).

Un método óptimo para determinar el daño genotóxico en organismos centinelas debe ser capaz de detectar muchas clases de daños en una variedad de tipos de células a partir de una variedad de organismos, proporcionar los datos relativos a la célula individual, y ser sensible y rápido. Actualmente, estos marcadores genotóxicos, son técnicas rápidas que permiten cuantificar las lesiones provocadas por los contaminantes en el ADN, convirtiéndose de esta manera en ensayos útiles para el biomonitorio ambiental (da Silva et al., 2000).

**3.1.5 Biomarcadores hematológicos.** Los biomarcadores hematológicos muestran las afecciones en número y morfología en los eritrocitos, encargados del transporte de oxígeno, como respuesta a la exposición crónica a la contaminación ambiental (Nunes et al., 2001). Son considerados marcadores hematológicos parámetros como el recuento de leucocitos, eritrocitos, la concentración de hemoglobina, el hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media (Sánchez-Chardi et al., 2008).

El aumento o disminución de éstos, dependiendo del parámetro, puede estar reflejando diversas causas, entre las que están relacionadas enfermedades de tipo pulmonar y hepático. Por ende, aunque éstos son biomarcadores hematológicos de contaminación, deben ser usados en correlación con otros de tipo genético o histopatológico (Nunes et al., 2001).

**3.1.6. Biomarcadores inmunológicos.** Los biomarcadores inmunológicos son determinados como los analitos que pueden medirse al efectuarse una respuesta inmune mediada por funciones del mecanismo de defensa humoral y/o celular en

respuesta a sustancias extrañas (Burnett, 2005). Los contaminantes ambientales, tales como metales, pesticidas y compuestos orgánicos pueden inducir, potencialmente, consecuencias adversas para la salud a través de su interacción con el sistema inmune en diferentes vías de señalización. Por lo tanto, alteraciones inmunes pueden dar lugar por un lado a una sobreactivación inmunológica, lo que finalmente podría conducir a enfermedad autoinmune, hipersensibilidad o alergia, y por otra parte a la supresión inmune, que podría llevar a una mayor incidencia de enfermedad infecciosa o incluso a una transformación neoplásica (Hadnagy et al., 1996; Burnett, 2005).

Como parámetros inmunológicos, en cuanto a la defensa inmune humoral están los de la respuesta humoral específica, inmunoglobulinas de clases IgA, IgM e IgG, y los de la defensa humoral no específica, componente C3c del complemento y la proteína de fase aguda C -proteína C reactiva (PCR). Además de la IgE que es determinada para el tamizaje de posibles enfermedades atípicas mediadas por IgE. En cuanto a los parámetros de la defensa inmune celular esta la neopterina que es un intermediario de la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, un cofactor esencial para mono-oxigenasas de aminoácidos aromáticos, ésta es exclusivamente liberada por macrófagos activados y es detectable en fluidos corporales (Herberth et al., 2009). Ciertos contaminantes pueden desencadenar también respuestas inmunológicas acompañadas de reacciones inflamatorias, procesos en los cuales resultan de gran valor la determinación de moléculas como las interleuquinas, que se encargan de iniciar la respuesta inflamatoria y de definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. Entre los marcadores inflamatorios pueden mencionarse por ser de gran interés, IL-8, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa, MCP-1 e IL-10 (Hadnagy et al., 1996).

En relación con la contaminación del aire derivada de la industria minera de carbón, la determinación de niveles séricos altos de inmunoglobulinas de tipo IgA y IgM, así como el componente del complemento C3c, indican una mayor estimulación de reactantes de fase aguda, en combinación con una respuesta inmune policlonal (reconocimiento de varios antígenos) (Burnett, 2005).

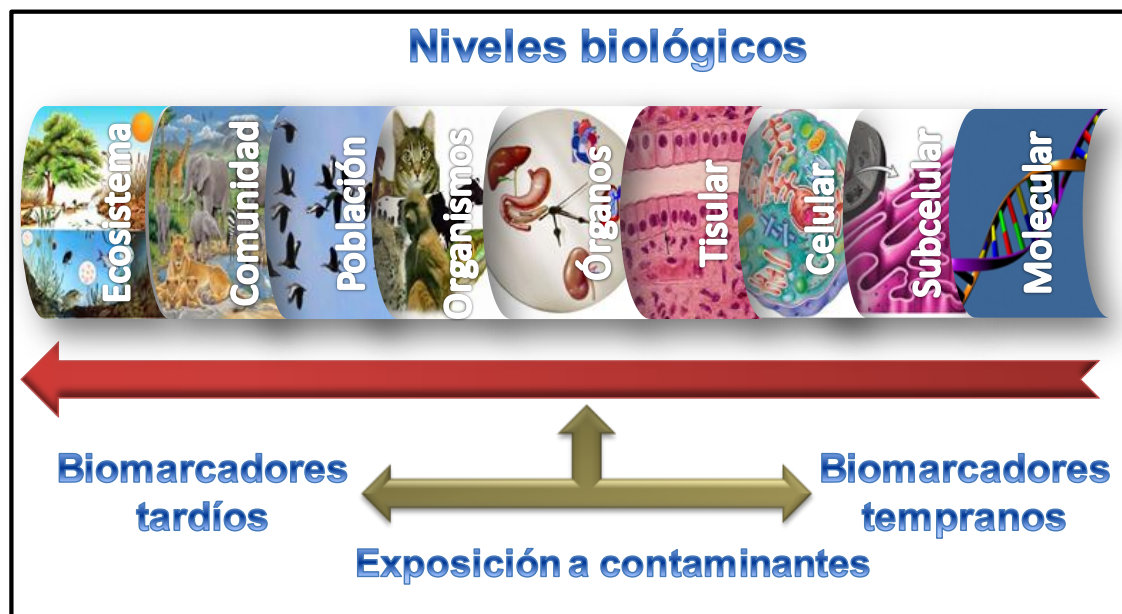
**3.1.7. Biomarcadores histopatológicos.** Las mediciones de parámetros directamente en células o tejidos indican la magnitud del daño provocado por sustancias tóxicas, o de la respuesta del huésped (Teh et al., 1997). El orden secuencial de las respuestas al estrés de contaminantes dentro de un sistema biológico puede visualizarse en la Figura 6. Tales escenarios han sido determinados gracias a las diversas investigaciones generadas en el campo de la toxicología, para establecer señales que van desencadenándose desde la alerta temprana o marcadores que reflejan las respuestas biológicas adversas provocadas por los tóxicos ambientales antropogénicos; es así como la medición real de las respuestas adversas o de las consecuencias de dichas respuestas, pueden también ser utilizadas como biomarcadores. Los efectos adversos de tipo histopatológico, son corroborados como biomarcadores al suministrar información acerca de lesiones, alteraciones o formación de tumores (neoplasias) en los tejidos de los organismos (Bucheli y Fent, 1995).

La histopatología es la rama de la patología que estudia las alteraciones y los cambios que ocurren a nivel morfológico, macro y microscópico en las células, tejidos y órganos, con el fin de identificar las causas, mecanismos y consecuencias de una enfermedad (Hemrajani, 2005). En los últimos años, los esfuerzos se han focalizado en el desarrollo de técnicas que puedan ser utilizadas para vigilar la salud de los organismos expuestos crónicamente a los contaminantes (Hopkins et al., 1999; Da Silva et al., 2000). La valoración histopatológica de los tejidos diana es un biomarcador adecuado, ya que proporciona importante información cualitativa y cuantitativa acerca de los efectos agudos o crónicos de compuestos tóxicos, a veces no tan confiablemente predichos por otros parámetros (Myers et al., 1998).

El hecho de que los parámetros histológicos y morfológicos estén afectados, es generalmente indicativo de la presencia de daño irreversible o enfermedad (Myers et al., 1998; Sánchez-Chardi et al., 2008). El método ideal para detectar el daño

debería permitir la detección de diversas clases de daños en diferentes tipos celulares de un rango de organismos, proporcionar datos sobre la célula individual, y ser sensible (Çelik et al., 2005). Lo anteriormente expuesto, orienta a la utilización de ensayos a corto plazo, los cuales informan en poco tiempo efectos provocados por los compuestos químicos y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre (Arencibia y Rosario, 2003).

Los cambios agudos son observados cuando los niveles de contaminantes son lo suficientemente altos, mientras que la exposición crónica es requerida para determinar los aspectos subletales del cambio, sin embargo muchas alteraciones persisten incluso después de que la exposición al tóxico ha cesado. Las alteraciones histológicas, en general, sólo son producidas cuando concentraciones sustanciales de los contaminantes están presentes en los organismos (Sánchez-Chardi et al., 2008).



**Figura 2.** Representación esquemática del orden secuencial de las respuestas a estrés por contaminantes dentro de un sistema biológico. Modificado de Myers et al., 1998.

Los parámetros morfológicos, revelados a través de la histopatología, a diferencia de la mayoría de los bioquímicos, son respuestas a los xenobióticos a mayores

niveles, demostrando una amplificación de la interacción celular, generada por el compuesto que además, son generalmente indicativos de daño irreversible (Handy et al., 2002). Estos reflejan la salud de los organismos de una manera más realista que los biomarcadores bioquímicos y por lo tanto los efectos tóxicos pueden ser mejor extrapolados a niveles de comunidad y de ecosistemas (Hinton et al., 1992; Handy et al., 2002; Wester et al., 2002; Stentiford et al., 2003).

La factibilidad de usar parámetros histopatológicos como biomarcadores de contaminación ha sido valorada debido a que muchos científicos llegaron a la conclusión de que, a una mayor escala, los ejemplos más convincentes de una relación causal entre las enfermedades y la contaminación solo eran proporcionados por estudios intensivos y detallados sobre patología (Myers et al., 1998; Costa et al., 2009). La mayoría de estudios han utilizado el hígado como órgano diana principal para la evaluación de alteraciones histopatológicas provocadas por xenobióticos (Sánchez-Chardi et al., 2008). Inicialmente fueron descubiertos métodos cuantitativos y semicuantitativos para estudiar su ultraestructura utilizando microscopía electrónica (Myers et al., 1998).

A lo largo del tiempo, al realizar estudios en determinadas especies fueron determinándose órganos diana y ciertas lesiones típicas que fueron clasificadas como marcadores biológicos de xenobióticos (Spies et al., 1996). En general, los biomarcadores histopatológicos son valiosas herramientas para el monitoreo de la salud general, permitiendo observar la amplificación de los efectos de la exposición a una variedad de contaminantes antropogénicos (Hinton et al., 1992; Handy et al., 2002; Wester et al., 2002; Stentiford et al., 2003).

Los enfoques histopatológicos clásicos, esencialmente cualitativos, proporcionan información vital sobre la descripción de lesiones histológicas y alteraciones en las especies animales, sin embargo, la ausencia de datos numéricos hace que sea difícil establecer relaciones causa-efecto entre la patología y las modalidades de contaminación, con el fin de evaluar la significación de diferencias entre los



grupos estudiados (Costa et al., 2009). Por tal razón, las investigaciones actuales sobre las características histopatológicas de los animales expuestos, son centradas en índices histopatológicos para obtener datos numéricos basados en enfoques semi-cuantitativos (Riba et al., 2004). Algunos de estos enfoques han empleado con éxito estadística multivariante utilizando índices de frecuencia de lesiones para comparar sitios contaminados en estudios de biomonitoreo. Adicionalmente, los parámetros histopatológicos son relativamente fáciles de determinar y valiosos para evaluar la importancia ecotoxicológica de otros biomarcadores. En cuanto a las ventajas de las variantes histopatológicas, la detección inmunohistoquímica de anomalías celulares y de tejidos relacionados, es lograda a través del examen histopatológico inicial de muestras de tejidos normales y patológicos, el cual ofrece señales tempranas de advertencia (Myers et al., 1998; Costa et al., 2009).

### **3.2. BIOINDICADORES.**

**3.2.1. Definición.** El término “Bioindicador”, deriva del uso de algunas especies de la biota para evaluar los índices de contaminación a fin de determinar, la distribución y efectos de los contaminantes en las especies y en el ecosistema. Las especies bioindicadoras, nos informan finalmente sobre el estado del medio ambiente y los factores susceptibles de afectar a los seres humanos, además de proporcionar una base de datos de referencia para fines de seguimiento en el futuro (Saito et al., 1996; Essumanget al., 2010; Nakayama et al., 2011; Klimentidis et al., 2011).

**3.2.2. Importancia.** Al igual que los seres humanos, los animales están sujetos a contaminantes en aire, suelo, agua y alimentos, pudiendo llegar a sufrir efectos agudos y crónicos en su salud derivados de tales interacciones (Klimentidis et al., 2011). El uso de bioindicadores en estudios de biomonitoreo es aplicado comúnmente a fin de dilucidar la presencia y efectos de los contaminantes en el medio ambiente y en algunos casos para identificar ciertas sustancias presentes a

bajas concentraciones (Oliva et al., 2012). Las especies animales, demuestran las huellas de la contaminación en ellas, ya que indirectamente son afectadas por contaminantes antropogénicos, industriales u otros que a su vez son derivados de la alimentación (Perez y Fontanetti, 2010).

**3.2.3. Características.** La capacidad para ser considerado “bioindicador”, depende de ciertas características según la especie, aunque las principales características son, el grado de bioconcentración y bioacumulación de la especie a analizar, es decir su gran facilidad para acumular los contaminantes presentes en el hábitat (Essumang et al., 2010; Perez y Fontanetti, 2010; Hédouin et al., 2010; Nakayama et al., 2011). La selección de especies indicadoras debe estar ligada, al menos en cierta medida, a que esta sea específica del sitio de estudio. Además, en lugar de investigar las mismas respuestas en miles de especies de animales, deben efectuarse en la selección de varias especies, con características óptimas para ser bioindicadoras (Guillette y Guillette, 1996).

**3.2.4. Organismos biondicadores.** Diferentes tipos de biota terrestre, tales como hongos, plantas, lombrices, caracoles, cangrejos, insectos, anfibios, reptiles, y murciélagos han sido utilizadas como especies bioindicadoras. Además de peces, bivalvos, y aves acuáticas y sus huevos, que han sido de gran utilidad para investigar el estado de salud de los ecosistemas, debido a que viven o comparten hábitats con el hombre (da Silva et al., 2000; Hsu et al., 2006; Hart et al, 2008; Champoux et al., 2010).

## **4. REPTILES COMO BIONDICADORES.**

### **4.1. CARACTERÍSTICAS.**

Los reptiles son más sensibles a los efectos de los contaminantes en comparación con aves y mamíferos, puesto que ellos son animales ectotérmicos, y por ello tienen baja tasa metabólica y sistemas de enzimas relativamente simples (Campbell y Campbell, 2000). En cuanto a la bioacumulación, almacenan

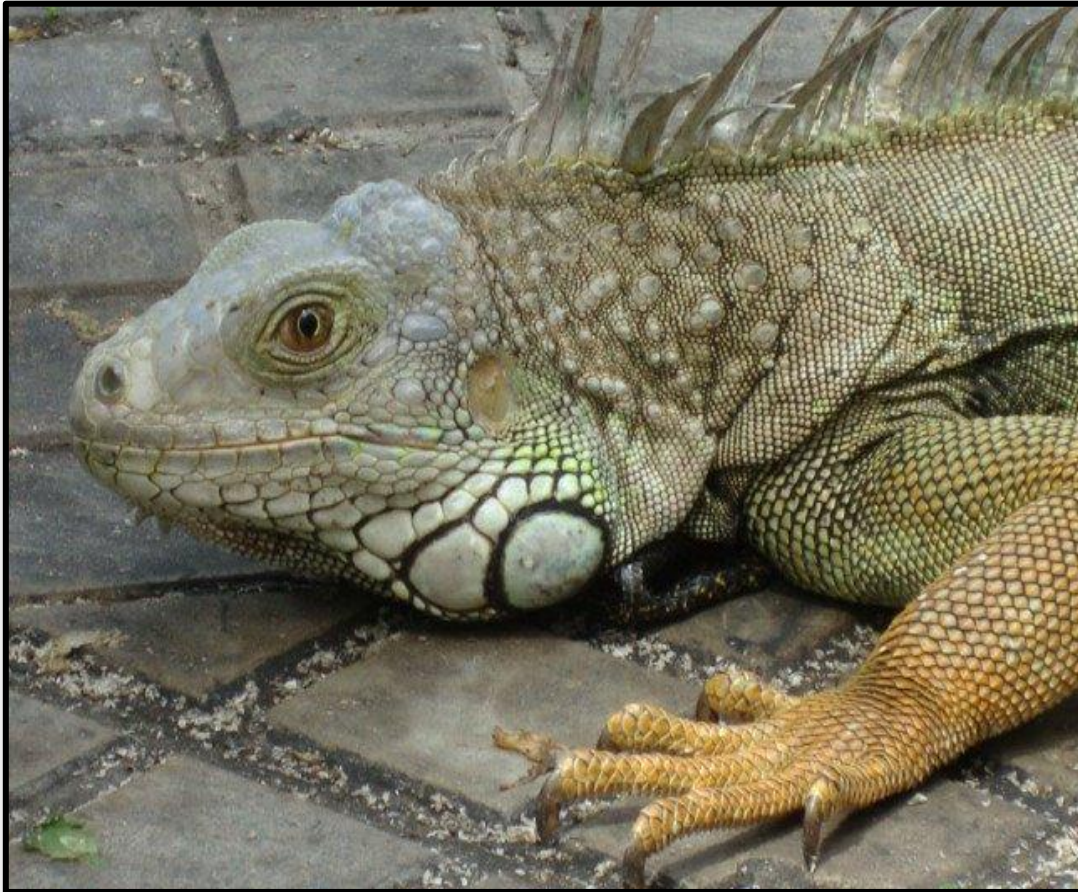
contaminantes de forma diferente en función de su ubicación, por lo que pueden ser útiles como bioindicadores de exposición. Por otra parte, debido a su amplia distribución geográfica y el uso de diferentes compartimentos tróficos, este género puede ser útil para las comparaciones entre sitios (Burger et al., 2007).

Los reptiles son componentes importantes y representan un gran porcentaje de la biomasa de animales en muchos ecosistemas terrestres y acuáticos. Son depredadores y pueden ser presa fácil de otros vertebrados e invertebrados siendo parte importante en las diversas redes alimentarias. En particular, los reptiles son relativamente de larga vida, pueden ubicarse en diferentes niveles tróficos, y a la vez pertenecen a la parte superior de la cadena alimenticia (Guillette y Guillette, 1996). Adicionalmente, estos son especialmente adecuados como bioindicadores de contaminantes debido a su persistencia en variedad de hábitats, su amplia distribución geográfica, la longevidad y en muchos casos, la fidelidad al sitio (Sciarrillo et al., 2008).

**4.1.1. Antecedentes.** Históricamente los reptiles han sido utilizados como bioindicadores de contaminación ambiental, actualmente, tienen el potencial para dilucidar los mecanismos de un controversial grupo de contaminantes ambientales, los disruptores endocrinos (Campbell y Campbell, 2000). Son buenos modelos para el estudio de la alteración endocrina de compuestos volátiles, debido al hecho de que diferentes especies de reptiles tienen variados modos de determinación de género (la determinación del sexo genotípico o dependientes de la temperatura) y los modos de paridad (oviparidad o viviparidad) (Crain y Guillette, 1998).

**4.1.2. Iguana verde.** La iguana verde (*Iguana iguana*), es un gran lagarto arbóreo de la familia *Iguanidae* que se distribuye en América Central y América del Sur (Figura 3). Son animales descritos como arbóreos, ya que vive gran parte del tiempo en árboles altos. En su hábitat natural, especialmente durante el primer período de vida, son omnívoros, por lo que comen plantas e insectos. En su forma

característica de alimentación, y en la cadena alimenticia, la función fundamental está representada por la captura de presas, y la mayor parte de este rol es llevado a cabo por la lengua (Tucker, 1966; Abbate et al., 2008; Sartori et al., 2012).



**Figura 3.** Iguana verde colombiana (*Iguana iguana*).

En Colombia existen 730 especies de anfibios y 520 de reptiles, ocupando respectivamente el primer y quinto lugar a nivel global con respecto al número de especies (Sánchez-C et al., 1995; Acosta-Gálvis 2000). *Iguana iguana* presente en selvas y a orillas de los ríos y arroyos, actualmente está presentando reducción numérica debido a muchos factores que han interferido en el deterioro de su hábitat natural (Acosta-Gálvis, 2000).

Efectos negativos, como, la destrucción desahogada de su hábitat natural, van en aumento debido a factores como la deforestación, la actividad minera, la urbanización, el sobrepastoreo, la erosión y la sedimentación. Por ser reptil y cumplir con las características bioindicadoras de los reptiles en general, esta especie perteneciente a la fauna predominante alrededor de las zonas de explotación minera en Colombia, puede ser catalogada como un bioindicador útil para valorar los efectos provocados por la minería del carbón (Munoz et al., 2003; Acosta-Gálvis, 2000).

Por otra parte, el uso de esta clase de reptiles como bioindicadores de contaminación no está bien documentado. En general, existen pocos estudios toxicológicos en *I. iguana*, lo cual es evidenciado por la falta de información respecto a los valores de referencia en sangre y de alteraciones tisulares en este reptil (Burns y Paul-Murphy, 2009).

## **4.2. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS EN LA MINERÍA DEL CARBÓN.**

### **4.2.1. Análisis histopatológico en cortes de tejido.**

Los estudios histopatológicos han permitido demostrar que la afección de órganos vitales en poblaciones expuestas a tóxicos, está relacionada con su acumulación y presencia en el ambiente (Armutcu et al., 2007; Poleksic et al., 2010). De hecho, el análisis histopatológico de muestras extraídas de animales expuestos a sustancias químicas en su hábitat natural, permite no sólo obtener información sobre los efectos de estos agentes, sino evaluar los posibles riesgos de la exposición para la salud humana y la biota en general (Pereira et al., 2006).

En términos generales, muchos efectos de los tóxicos ambientales están asociados con mecanismos de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, que en condiciones de exposición crónica pueden desencadenar severas alteraciones histopatológicas (Liu et al., 2000), permitiendo demostrar la relación entre las

lesiones tisulares observadas y el impacto ambiental de estos contaminantes (Au, 2004; Costa y Costa, 2008; D'Agostini et al., 2008; Bornman et al., 2010; Pekmez et al., 2010; Kimura et al., 2010; Nunes et al., 2011).

Lesiones histopatológicas producidas por sustancias tóxicas presentes en la atmósfera, como aquellas derivadas de la explotación del carbón, también son visibles en cortes histológicos (Armutcu et al., 2007). El mecanismo histopatológico más estudiado es la inducción de lesiones pulmonares, mediadas por el reclutamiento y activación de macrófagos y células polimorfonucleares que inducen la liberación de mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno (EROs) (Dalal et al., 1995). Aunque el carbón no es un agente fibrogénico, existen otros minerales presentes durante su extracción, principalmente la sílice, capaces de alterar la morfología del pulmón (Pinho et al., 2004).

**4.2.2. Melanina hepática.** La evaluación de biomarcadores como un parámetro de vigilancia del medio ambiente, convierte ciertos parámetros en ventajas para proporcionar una respuesta cuantitativa de información valiosa en cuanto a pertinencia ecológica, así como también de los efectos adversos agudos y/o crónicos causados por cualquier tipo de contaminación (da Silva et al., 2000). Los residuos de compuestos tóxicos son encontrados en el agua, sedimentos y la biota acuática en general, representando, de esta manera un riesgo para los organismos, los depredadores y los seres humanos, lo cual es evidenciado en investigaciones que demuestran efectos visibles a nivel tisular en los organismos afectados (BijoyNandan y Nimila, 2012).

El hígado es el órgano principal de biotransformación de xenobióticos, juega un papel importante en el metabolismo de éstos, sus funciones básicas están ligadas fundamentalmente a la acumulación de muchos de ellos, involucrándose activamente en procesos como la biotransformación, excreción, degradación y bioactivación de estos orgánicos (Au, 2004). La evaluación de los cambios bioquímicos e histológicos a nivel hepático ha llegado a convertirse en una importante herramienta para controlar la exposición de contaminantes del medio

ambiente en determinados organismos a través de la realización de estudios experimentales (Au, 2004; El-Refaiy y Eissa, 2013). Dato evidenciado, puesto que, la exposición a contaminantes en los ecosistemas pueden contribuir con la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo cual induce el daño oxidativo a los sistemas biológicos, el cual puede verse reflejado a nivel tisular desencadenando diversas afecciones (Matos, 2007; El-Refaiy y Eissa, 2013).

En los vertebrados heterotérmicos, como la iguana, son evidenciados pigmentos como melanina, contenida de forma extracutánea, la cual puede hallarse en células de varios tejidos y órganos como el riñón, hígado, bazo, pulmón, entre otros. Las células que poseen este pigmento son denominadas melanosomas y presentan actividad melanosintética autónoma, tienen mayor predominio en el hígado con respecto a los otros órganos; y son localizadas principalmente en las paredes sinusoidales (Breathnach, 1988; Barni et al., 1999). Estas células pertenecen al sistema retículo histiocítico, derivan de las células de Kupffer (sistema mononuclear fagocítico), por lo que, también son definidas como melano-macrófagos, en función de su localización y capacidad fagocítica, a diferencia de las células del pigmento cutáneo que provienen de la cresta neural (Sichel, 1988; Breathnach, 1988; Barni et al., 1999).

Un estudio realizado por Sichel (1988) revela que los melanosomas hepáticos y cutáneos, muestran una gran diferencia en cuanto a su composición química, afirmando que las células del pigmento hepático de anfibios y reptiles deben ser clasificados como "células de pigmento extracutáneo de origen histiocítico". Los agregados de melano-macrófagos son denominados centros de melano-macrófagos, estos son agrupaciones distintivas de las células que contienen el pigmento melánico, en los tejidos de los vertebrados ectotérmicos (Sichel, 1988). En los peces normalmente están ubicados en el estroma del tejido hematopoyético, en el bazo y el riñón, aunque en los anfibios y reptiles, y algunos peces, también son localizados en el hígado (Gallone et al., 2002).

Adicionalmente, estas estructuras también pueden desarrollarse en asociación con lesiones inflamatorias crónicas en otros lugares del organismo, además de tener otras funciones catabólicas como la retención de los productos de degradación celular y materiales potencialmente tóxicos de los tejidos, tales como radicales libres y productos de degradación. Los centros de melano-macrófagos aumentan en tamaño y frecuencia en condiciones de estrés ambiental y han sido propuestos como marcadores biológicos fiables, entre otros, para evaluar la calidad del agua a través de su evaluación en peces (Agius y Roberts, 2003).

El papel de los macrófagos y de los centros de melano-macrófagos, y sus pigmentos, ha sido utilizado como fuente de biomarcadores por varios autores, pero la relación entre estas estructuras y los factores endógenos aún no ha llegado a explicarse claramente (Rabitto et al., 2005; Suresh, 2009). Adicionalmente, la acumulación de pigmentos tipo lipofuscina ha demostrado ser un índice adecuado tanto de la edad, como del estrés en algunos invertebrados (Vaschenko et al., 2012). Al parecer las melaninas hepáticas juegan un papel importante como molécula antioxidante, al limpiar las células de sustancias citotóxicas, como los radicales libres (Barni et al., 1999). Ante la presencia de dicho pigmento, la actividad de enzimas como la superóxidodismutasa (SOD) puede encontrarse enmascarada, indicando una relación inversa entre ambas (Sichel, 1988).

## **5. METODOLOGÍA.**

Para el desarrollo de éste proyecto, fueron realizadas la siguiente metodología.

### **5.1. ÀREA DE ESTUDIO.**

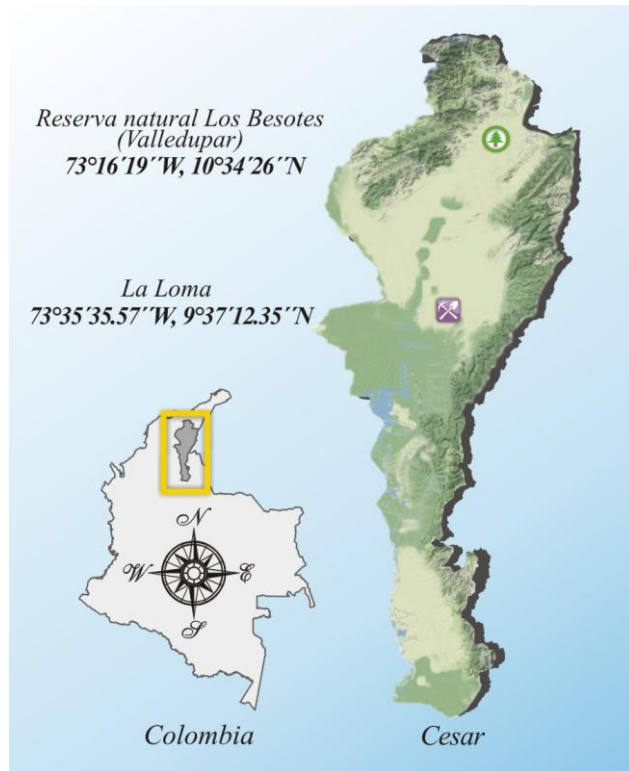
El presente estudio fue realizado en el departamento del Cesar en la costa norte de Colombia, América del sur (Figura 4). Los especímenes expuestos que se



incluyen en los datos fueron recolectados en territorio aledaño a las minas de carbón a cielo abierto de carbón, ubicadas en La Loma (10°23'58" N, 75°30'9" W), municipio del departamento del Cesar. Fue seleccionado un grupo de Diez individuos expuestos y un grupo de referencia (no expuesto), que consistió en Diez especímenes capturados en la reserva natural "Los Besotes" ubicada en el municipio de Valledupar (10°34'26"N, 73°16'19" W), este lugar fue valorado y posteriormente escogido como área de referencia por ser un área sin exposición conocida a agentes genotóxicos, incluyendo carbón, radiación, productos químicos o cigarrillos.

## **5.2. PROCESO DE CAPTURA DE ESPECIES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS TISULARES.**

El presente estudio de tipo descriptivo fue realizado en el departamento del Cesar, con el permiso de Corpocesar, agencia encargada de la protección ambiental para el departamento del Cesar (Resolución N° 739, del 22 de junio de 2010 (Anexo 1). Como unidad experimental, fueron recogidas 20 iguanas con peso entre 223 y 1814g. El muestreo, en ambas zonas de estudio, fue realizado en horas de la mañana mediante búsqueda activa del animal (Figura 5), en zonas expuestas o áreas de influencia de la mina (La Loma), y zona de referencia (Valledupar). Posteriormente, fue realizado el transporte al sitio de procesamiento, tomadas medidas morfométricas y pesaje de los animales (Tabla 2). Las iguanas fueron anestesiadas con Ketamina® (20mg/kg peso) hasta observarse el efecto anestésico en el animal (Figura 6A). Un proceso de asepsia fue empleado en la parte ventral, realizando un corte en H (Figura 6B). Una vez expuestos los órganos, fueron extraídos los órganos de interés (hígado, bazo y pulmón), para luego lavarlos con solución salina al 0,85% e introducirlos en 30 mL de formalina tamponada al 10%, a fin de fijar las muestras durante 24 horas (Figura 6C). Posteriormente, las muestras fueron preservadas en etanol al 70% (Avery, 1998; Ferreira et al., 2010).



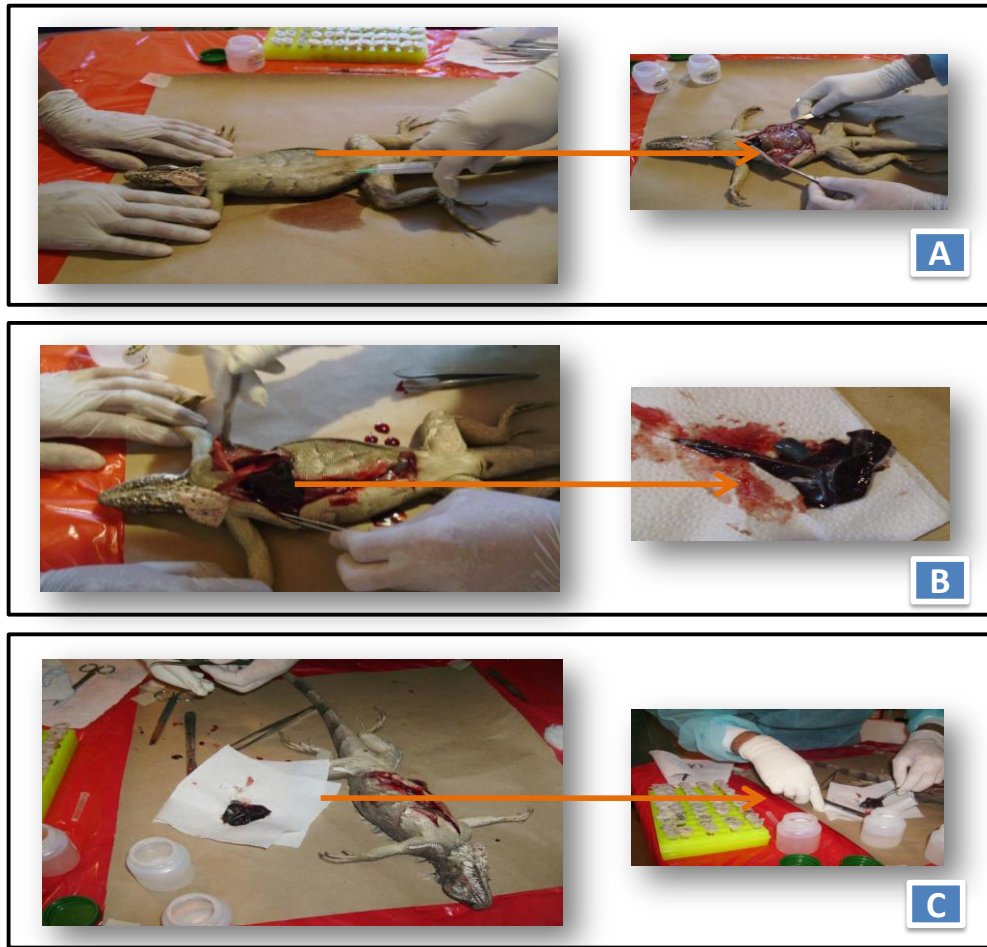
**Figura 4.** Ubicación de áreas de estudio en el departamento del Cesar. Zona de referencia o control localizada en Valledupar, y la zona impactada por la minería de carbón ubicada en La Loma.



**Figura 5.** Proceso de muestreo mediante búsqueda activa del animal.

**Tabla 2.** Características de las iguanas obtenidas en los sitios de muestreo.

<b>Área de estudio</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (gr)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Cabeza (cm)</b>	<b>Cola (cm)</b>
<b>Valledupar</b>	Hembra	453	105	7	81
	Hembra	453	95	7	68
	Hembra	453	102	7	87
	Hembra	453	101	4	71
	Hembra	453	98	4	70
	Hembra	453	98	6	69
	Hembra	226	84	4	63
	Macho	226	81	4	60
	Macho	470	106	8	73
	Macho	471	118	8	87
<b>Promedio</b>		<b>411.1</b>	<b>98.8</b>	<b>5.9</b>	<b>72.9</b>
<b>La Loma</b>	Hembra	453	113	8	81
	Hembra	453	103	8	70
	Hembra	453	117	8	85
	Macho	453	110	5.5	76
	Macho	226	81	4.0	60
	Macho	453	95	4.5	70
	Macho	1814	200	11	35
	Macho	223	82	8.5	55
	Macho	453	106	10	70
	Macho	453	110	8	79
<b>Promedio</b>		<b>543.4</b>	<b>111.7</b>	<b>8.8</b>	<b>68.1</b>



**Figura 6.** Proceso de anestesia y obtención de muestras de órganos. A. Anestesia. B. Extracción de órganos. C. Fijación de tejidos en formalina tamponada.

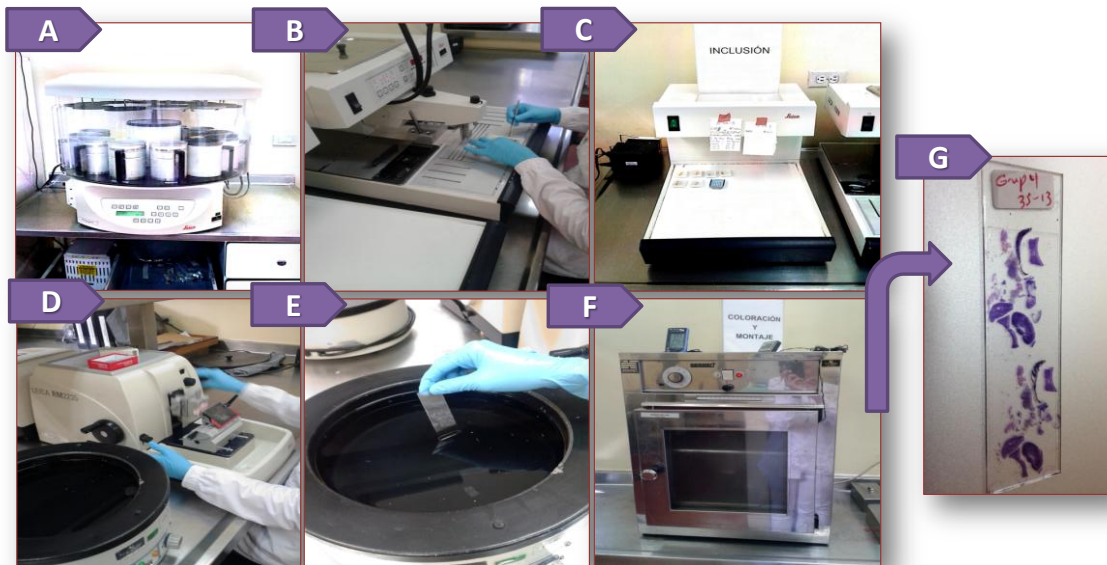
### 5.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Dos enfoques fueron utilizados con la finalidad de cumplir con los objetivos propuestos, el descriptivo y el analítico, a continuación son detallados cada uno de los procedimientos realizados en los enfoques respectivos.

#### 5.3.1. Enfoque descriptivo.

**5.3.1.1. Valoración con hematoxilina-eosina (H-E).** Inicialmente fue realizada la construcción de bloques de parafina, sumergiendo en éstos los cortes de los órganos después de haber sido deshidratados en alcohol etílico a concentraciones crecientes (70% - 96%). Posteriormente, cuando la parafina fue adicionada y los

órganos impregnados con la misma en sus respectivos moldes, estos fueron llevados al congelador por 30 minutos. Al cabo de este tiempo, fue realizado el corte de los bloques en el micrótopo, obteniéndose muestras de 5µm, que fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (H-E) (Prabu et al., 2011; Ferreira et al., 2010). Finalmente, la lámina teñida, fue examinada al microscopio con el fin de determinar alteraciones o lesiones tisulares (Figura 7). Las imágenes para el análisis descriptivo de los cortes de tejido de *Iguana iguana* fueron obtenidas con aumentos de 10X y 40X en microscopio óptico NIKON H600L empleando el software Nis-Elements F3.0.



**Figura 7.** Procedimiento para la realización de coloraciones histopatológicas. A. Procesador de tejidos (Deshidratación), B. Consola de inclusión (Inclusión en parafina), C. Formación del bloque o molde de parafina, D. Micrótopo (fase de corte), E. Montaje del corte en lámina, F. Coloración (H-E/FM), G. Lámina teñida.

**5.3.1.2. Determinación de Melanina.** Fontana Masson (FM). Una tinción histoquímica especializada llamada Fontana Masson fue realizada para la detección de melanina a nivel hepático. Para tal efecto, fue elegida una parte representativa del bloque de parafina para ser teñida (Figura 7). Inicialmente los bloques fueron lavados con agua destilada y tratados con solución de plata

amoniacal por un tiempo de 15 minutos. Posteriormente, fue realizado un nuevo lavado por 2 minutos con cloruro de oro para darle el tono a la tinción. Subsiguientemente, los tejidos fueron lavados y fijados con tiosulfato de sodio al 2% durante otros 2 minutos. Finalmente, luego de lavar fue realizada la contra-tinción con rojo neutro por 1 minuto para dar el último enjuague y rápidamente deshidratar en alcohol absoluto y proceder a aclarar y montar (Bishop et al., 2012). Las imágenes para el análisis de los cortes de tejido de *Iguana iguana* teñidos con FM fueron obtenidas con aumento de 10X y 40X en microscopio óptico NIKON H600L empleando el software Nis-Elements F3.0.

**5.3.2. Enfoque semi-cuantitativo.** Posterior a la caracterización de lesiones, fue determinado el porcentaje de prevalencia, valorando cada muestra en escalas de ausente, leve, moderado y abundante. El análisis fue realizado, teniendo en cuenta el total de especímenes por zona de estudio, determinándose de esta forma un porcentaje con base en medidas de ocurrencia, en este caso prevalencia, para cada alteración histológica hallada, en términos de las escalas mencionadas anteriormente, lo cual representó la ocurrencia de la alteración en el sitio de muestreo, a determinada magnitud.

Otro análisis semicuantitativo fue realizado a los depósitos de Melanina presentes en el hígado, puesto que estos fueron considerados uno de los hallazgos de mayor interés en este estudio. La valoración fue realizada en las iguanas de ambas zonas de estudio. La escala establecida incluyó los parámetros escaso (+), moderado (++) y abundante (+++). Esta clasificación fue determinada en relación con la magnitud de los depósitos de Melanina presentes. La observación de la escala escasa representó depósitos de menor tamaño, la moderada, depósitos de mediano tamaño y los de mayor tamaño fueron ubicados en la categoría abundante. Debido a la naturaleza subjetiva de la interpretación de esta escala semi-cuantitativa, las observaciones debieron abordar una medida más compleja de estos depósitos de melanina, por esta razón fue realizado un detallado análisis de los depósitos de melanina, teniendo en cuenta sus medidas.

### **5.3.3. Enfoque cuantitativo.**

**5.3.3.1. Análisis de imágenes.** Una imagen de cada lámina teñida con FM fue escogida para ambas zonas de estudio. Fueron seleccionadas 10 imágenes de la Loma y 10 de Valledupar. Para medir los depósitos de Melanina en cada imagen, fue delimitada un área de 12x12cm, para efectos de estandarización y establecimiento de un óptimo análisis. Este procedimiento fue realizado, haciendo uso de la cámara estereoscópica Optikam®Pro 5 y el software Optika Vision® para medición de imágenes (funciones: *Measure*, *Calibration* y *Caliper*). Para una completa medición, fueron tomadas dos medidas que conformaban el área total del depósito y de cuya suma fue obtenida la raíz cuadrada, para expresar en términos de micras o micrómetros, la medida del área cuadrática del depósito. Para facilitar la clasificación y análisis de las mediciones, los datos expresados en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) se agruparon en las siguientes gamas: 0.01-4.99; 5.00-9.99 y >10.

**5.4. Análisis estadístico.** Las estadísticas descriptivas fueron determinadas en forma de medias  $\pm$  error estándar. Los datos semicuantitativos de las valoraciones histopatológicas fueron representados en términos prevalencia porcentual. Las diferencias estadísticas entre los parámetros morfométricos de las áreas de estudio fueron valoradas, utilizando t-test a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , previa revisión de normalidad y homogeneidad de varianza. La normalidad de los datos fue comprobada mediante los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

## **6. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.**

Todos los procedimientos fueron practicados de acuerdo con los principios rectores para el cuidado y uso de Animales (Olert et al., 1993). Este estudio fue aprobado por Corpocesar, agencia de protección ambiental para el departamento del Cesar, y fue llevado a cabo según lo estipulado en la Resolución N<sup>o</sup> 739, del

22 de junio de 2010 (anexo 1), expedida por esta entidad, donde son establecidas las normas técnicas y científicas para el procesamiento de especímenes a evaluar.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

El presente estudio fue realizado para investigar los cambios histopatológicos (pulmón, hígado, riñón y bazo) de iguanas verdes provenientes de zonas mineras de carbón (La Loma) en el departamento del Cesar. La mayoría de los estudios reportados en la literatura han estado centrados en los efectos de la minería del carbón en mamíferos y peces. Hay pocas investigaciones sobre los efectos del carbón en reptiles y la información puede considerarse casi desierta en cuanto a parámetros de alteraciones histológicas provocadas por contaminantes ambientales en las especies reptiles (da Silva et al., 2000; Hsu et al., 2006; Hart et al., 2008; Champoux et al., 2010). La información histopatológica es una herramienta valiosa para ayudar a establecer el daño tisular como resultado de la contaminación ambiental (Au, 2004; Costa et al., 2009; Lang et al., 2006). La histopatología es determinada como una técnica básica que ayuda a identificar los órganos diana y el mecanismo de acción de determinado químico, puesto que tales efectos no logran ser detectados sin practicarse un estudio detallado de la morfología del tejido y el órgano en general. Estudios de toxicidad en grandes y pequeños peces, han demostrado que la aplicación de esta otra área de la toxicología, como lo es la histopatología, han resultado ser de gran utilidad (Wester et al., 2002).

### **7.1. ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVOS.**

**7.1.1. Prevalencia de alteraciones histológicas.** Posterior a la determinación de los parámetros ausente, leve, moderado y abundante, el porcentaje de prevalencia de estos fue determinado para las diferentes alteraciones identificadas en común en ambas zonas de estudio, este porcentaje es presentado en la Tabla 3. En el bazo fueron encontradas alteraciones tales como zonas hemorrágicas extensas



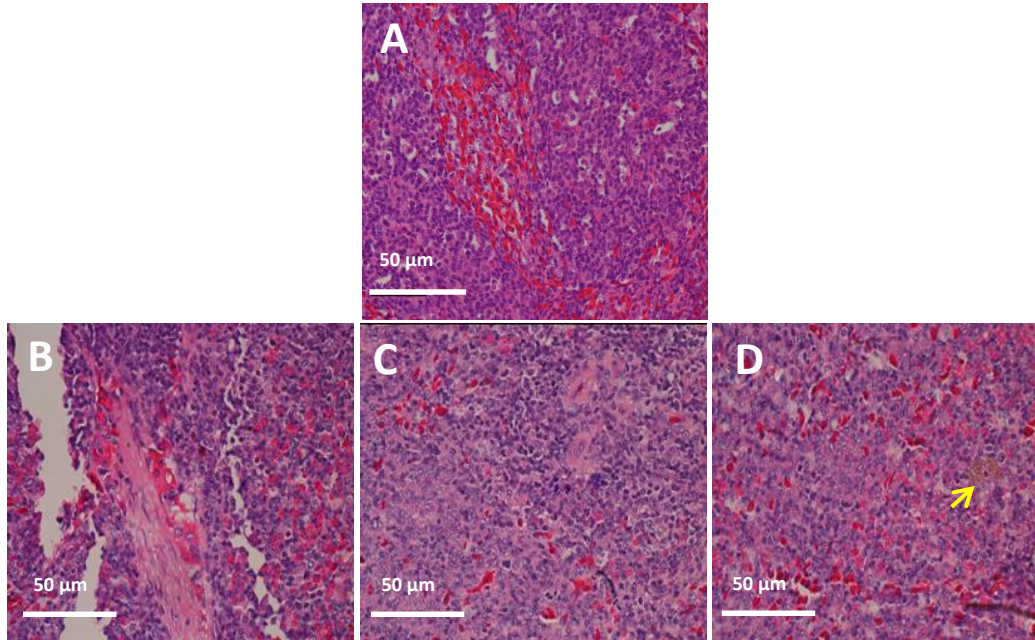
(Figura 8B), histiocitos cargados de pigmento pardo negruzco (Figura 8D), aumento de pulpa blanca (Figura 8C) y congestión vascular (Figura 8B). A nivel hepático, las alteraciones encontradas en común en ambas zonas fueron: infiltrado inflamatorio crónico (Figura 9F), vacuolización hepatocelular (Figura 9E), esteatosis microvesicular (Figura 9D), fibrosis, algunos cambios apoptóticos (Figura 9B), parénquimas con depósitos de pigmento negruzco (Figura 10B) y congestión vascular (Figura 9C). El análisis del riñón arrojó hallazgos como: inflamación perivascular e intersticial a nivel de corteza y medula (Figura 11B-C), edema, congestión vascular, fibrosis y cambios apoptóticos. Otro órgano analizado, no menos importante, el pulmón, mostro alteraciones aunque escasas, tales como congestión vascular (Figura 12B), inflamación crónica y aguda, además de fibrosis.

**Tabla 3.** Porcentaje de prevalencia de alteraciones histopatológicas identificadas en diferentes muestras tisulares de *I. iguana* para cada sitio de muestreo caracterizados de acuerdo a la escala de clasificación.

Órganos	Alteraciones	Prevalencia de parámetros (%)							
		Áreas de estudio							
		Valledupar				La Loma			
		Ausente	Leve	Moderado	Abundante	Ausente	Leve	Moderado	Abundante
Bazo	Zonas Hemorrágicas extensas	100.0	0.0	0.0	0.0	66.7	22.2	0.0	11.1
	Macrofágos cargados de pigmento parduzco	70.0	30.0	0.0	0.0	33.3	55.6	11.1	0.0
	Aumento de pulpa blanca	70.0	30.0	0.0	0.0	11.1	55.6	22.2	11.1
	Congestión vascular	90.0	10.0	0.0	0.0	44.4	55.6	0.0	0.0
Hígado	Infiltrado inflamatorio crónico	60.0	40.0	0.0	0.0	18.2	54.5	27.3	0.0
	Vacuolización hepatocelular	50.0	30.0	10.0	10.0	9.1	63.6	18.2	9.1
	Esteatosis microvesicular	70.0	20.0	0.0	10.0	54.5	9.1	9.1	27.3
	Fibrosis	100.0	0.0	0.0	0.0	63.6	18.2	18.2	0.0
	Cambios apoptóticos	50.0	30.0	20.0	0.0	9.1	63.6	27.3	0.0
	Parenquima con depósitos de pigmento pardo negruzco	0.0	90.0	10.0	0.0	0.0	0.0	81.8	18.2
	Congestión vascular	18.2	63.6	18.2	0.0	40.0	60.0	0.0	0.0
Riñón	Inflamación perivascular	100.0	0.0	0.0	0.0	85.7	14.3	0.0	0.0
	Inflamación intersticial	100.0	0.0	0.0	0.0	14.3	85.7	0.0	0.0
	Edema	100.0	0.0	0.0	0.0	28.6	57.1	0.0	14.3
	Congestión vascular	66.7	33.3	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	Fibrosis	100.0	0.0	0.0	0.0	42.9	28.6	28.6	0.0
	Cambios apoptóticos	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
Pulmón	Congestión vascular	50.0	50.0	0.0	0.0	0.0	90.9	9.1	0.0
	Inflamación crónica	100.0	0.0	0.0	0.0	81.8	18.2	0.0	0.0
	Inflamación aguda	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Fibrosis	100.0	0.0	0.0	0.0	18.2	81.8	0.0	0.0

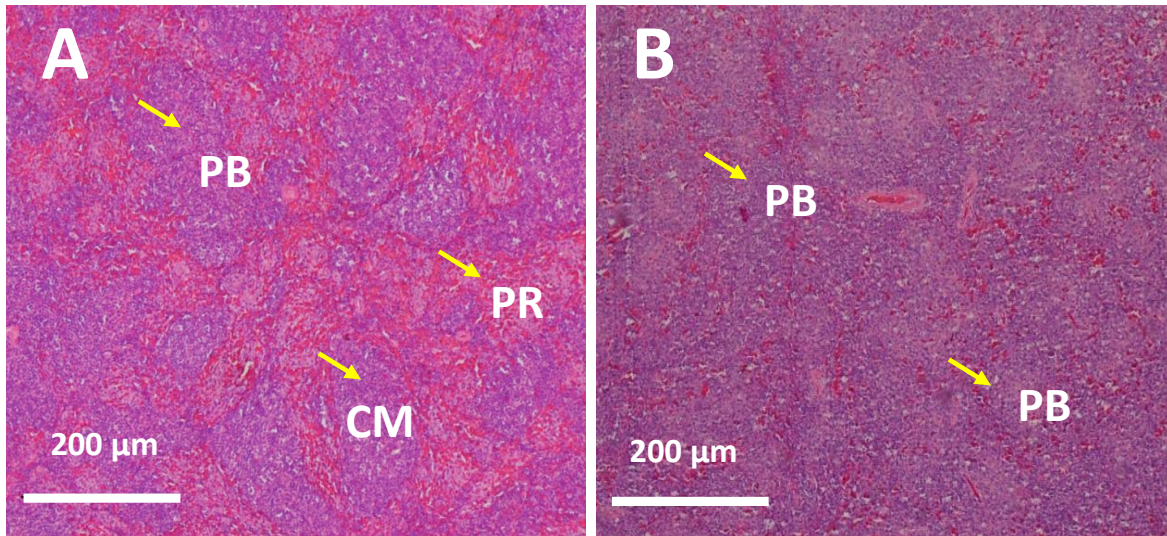
Al comparar los resultados obtenidos en la zona de minería carbonífera (La Loma) con los de la zona de referencia (Valledupar), pueden observarse cambios notables en los tejidos de las iguanas, encontrándose principales hallazgos a nivel de bazo e hígado. Luego de analizar los porcentajes de prevalencia, las alteraciones con menor proporción fueron halladas a nivel de pulmón y riñón y en cuanto a hígado y bazo, los hallazgos resultaron ser de mayor compromiso tisular. La histología del bazo mostró aumento de la pulpa blanca y de zonas hemorrágicas extensas, como hallazgos de mayor prevalencia en la escala abundante, mientras que en el hígado, la alteración más prevalente fueron los depósitos de pigmento pardo negruzco. Tanto en hígado como en bazo, las alteraciones fueron abundantes y prevalentes en la zona de exposición, por lo que le fue concedido mayor detalle investigativo a estos aspectos.

**7.1.1.1. Bazo.** Al iniciar con el análisis del bazo, pudo observarse que la presencia de zonas hemorrágicas extensas, tuvo mayor porcentaje de prevalencia en cuanto a la escala abundante en la Loma, obteniéndose un 11,1% contra un 0,0% de Valledupar; es importante añadir que en Valledupar el rango ausente obtuvo un 100%, demostrando que esta alteración no fue observada en ninguna de las muestras de esta zona de estudio. Los histiocitos cargados de pigmento pardo negruzco fueron hallados en ambas zonas, pero el porcentaje presentado para la escala leve en cuanto a la Loma fue mayor (55,6%) al ser comparado con la zona de referencia, la cual presentó uno más bajo (30,0%). El aumento de pulpa blanca, fue otro hallazgo relevante en la zona expuesta puesto que en la escala abundante solo fue observado en esta zona presentando un porcentaje de 11,1%. Adicionalmente, la congestión vascular fue determinada en ambas zonas, aunque no a grandes escalas, esta presentó un porcentaje de 55,6% en la zona de La Loma en la escala leve, siendo menor en el área de referencia con un valor de 10,0%.



**Figura 8.** Principales alteraciones en bazo de *I. iguana* proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar) (A) histología normal del bazo, (B) zonas hemorrágicas extensas y congestión vascular, (C) aumento de pulpa blanca, (D) histiocitos cargados de pigmento pardo negruzco (flecha). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) 40X (50µm).

En la mayoría de las muestras de la zona control pueden observarse detalladamente las regiones del bazo y sus corpúsculos de Malpighi ubicados en la pulpa blanca; mientras que en la zona expuesta, se observó un tejido que en su gran mayoría poseía pulpa blanca, lo que sugiere una mayor cantidad de nódulos linfáticos en su interior, comparación que puede detallarse en la Figura 9. Este aumento de linfocitos fue evidenciado en mayor proporción en los individuos capturados cerca al área de exposición. De esta manera, al comparar los individuos capturados en La Loma con los de Valledupar, es posible asociar una mayor producción de linfocitos B en el área de exposición, debido a la activación que sufre este tipo de células en el bazo, probablemente como respuesta a la presencia de un antígeno extraño. En muchos estudios el bazo ha sido utilizado como órgano indicador de contaminación ambiental, en diferentes especies animales (Sadiyappan et al., 2012).



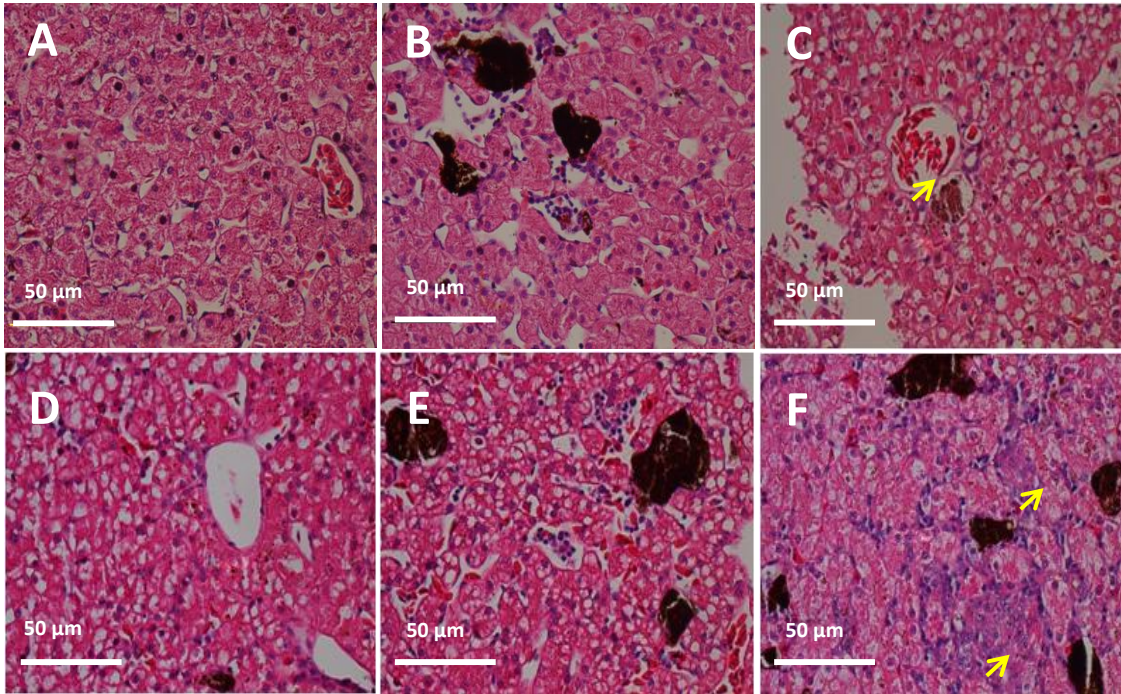
**Figura 9.** Corte histológico de bazo de *Iguana iguana*. Corpúsculos de Malpighi (CM), Pulpa Blanca (PB), Pulpa Roja (PR). A. Zona de referencia (Valledupar); B. Zona expuesta (La Loma). H-E, 10X (200µm).

Además, fue relevante la presencia de zonas hemorrágicas extensas con mayor prevalencia en las muestras de la zona expuesta, lo cual, puede deberse a una acumulación del compuesto original y/o de metabolitos tóxicos en este órgano, induciendo un mayor daño tisular. Este estudio demostró importantes alteraciones histológicas en el bazo, en adición a esto, las zonas hemorrágicas en el bazo pueden estar relacionadas con trastornos como hiperemia y congestión vascular. Estos resultados parecen ser similares a los efectos que se han descrito para los mamíferos donde un efecto tóxico de contaminantes es indicado por la presencia de alteraciones a nivel esplénico, relacionadas con congestión vascular, presentándose consecuentemente la formación de áreas hemorrágicas (Monteiro et al., 2006).

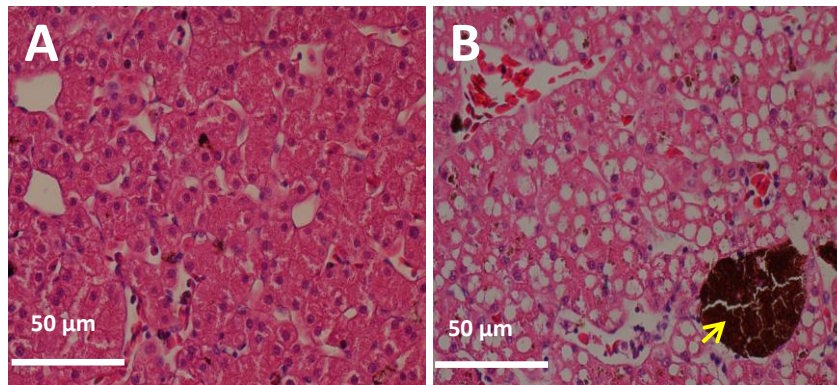
La hemorragia en el bazo puede asociarse entonces a una exagerada destrucción de los eritrocitos, secundaria a congestión vascular generada en la pulpa roja, lugar donde es realizado el secuestro y destrucción de éstas células. Otras investigaciones acerca de los efectos de herbicidas en bazo de *Oncorhynchus mykiss*, dan a conocer de forma parecida a este estudio, que luego de exposición

aguda el bazo presentó hipercelularidad e hiperemia de la pulpa roja. Adicionalmente, en un estudio de contaminación por antraceno, que es un hidrocarburo aromático policíclico (PAH), fueron observados cambios histológicos en el bazo de tilapia (*O. niloticus*), principalmente determinados como hiperemia e hipercelularidad; reflejando daño en la pulpa roja del bazo además de anemia hemolítica; trastornos estrechamente ligados a la presencia de áreas hemorrágicas y congestión vascular (Rezaee et al., 2012).

**7.1.1.2. Hígado.** Dentro de las alteraciones hepáticas, pudo observarse que la inflamación crónica a una escala moderada, presentó 0,0% para las muestras de la zona control, mientras que en la zona expuesta fue obtenido un porcentaje de prevalencia de 27,3%. La vacuolización hepatocelular fue un hallazgo presentado en ambas zonas de estudio, aunque en la zona control estuvo ausente en el 50,0% de las muestras, situación diferente a la zona expuesta donde estuvo ausente solo en un 9,1%. En cuanto a esteatosis microvesicular, resultó abundante en el 27,3% de las iguanas de la Loma, y en la zona de referencia solo un 10,0% de las muestras mostraron predominio de escala abundante. La fibrosis hepática fue prevalente de forma moderada en el 18,2% de las muestras de la zona expuesta, mientras que en la zona control no hubo muestras clasificadas en esa escala. Indicios de cambios apoptóticos también resultaron ser mayores en la zona expuesta, mostrando un 63,6% en escala leve, contra un 30,0% para la zona control. El parénquima de los especímenes de ambas zonas presento depósitos de pigmento pardo negruzco, aunque en la escala abundante sólo fueron ubicadas muestras de la zona expuesta, con un porcentaje de 18,2%. Cabe resaltar también que un 81,8% de las muestras obtenidas de la zonas impactadas por la minería resultaron clasificadas en moderadas con respecto a este hallazgo, determinándose menor porcentaje en esta escala, sólo un 10,0% para la zona control. Por último, la congestión vascular a nivel hepático fue un hallazgo de mayor relevancia sólo en la zona de referencia. A diferencia de los anteriores, los porcentajes de prevalencia resultaron mayores para esta zona en cuanto a las escalas de leve y moderado.



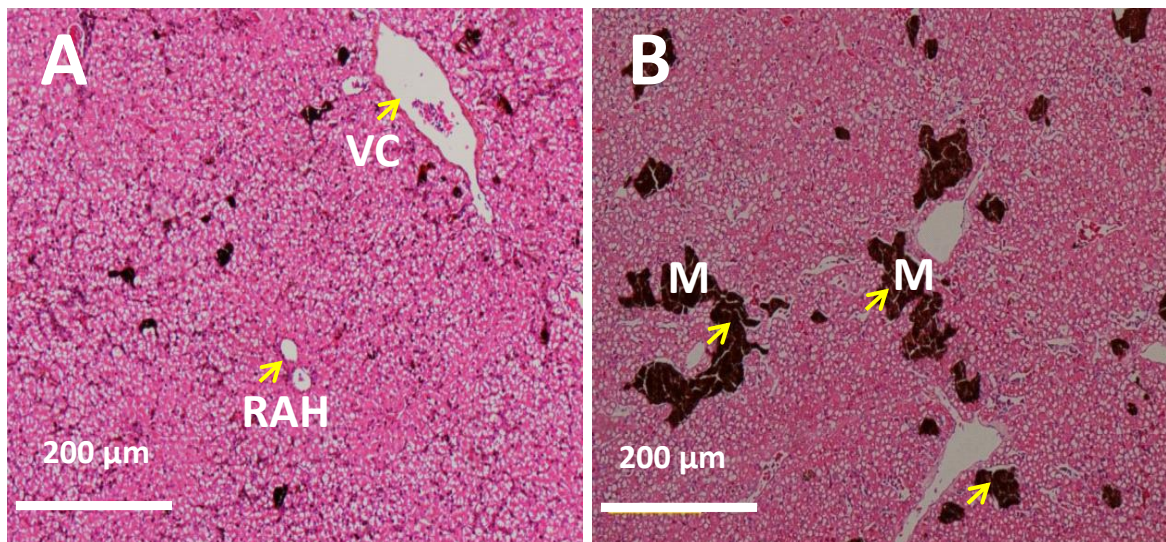
**Figura 10.** Principales alteraciones en hígado de *I. iguana* proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y el sitio de referencia (Valledupar). (A) Histología normal del hígado, (B) Cambios apoptóticos (flecha), (C) congestión vascular (flecha), (D) esteatosis microvesicular, (E) vacuolización hepatocelular, (F) infiltrado inflamatorio crónico (flechas). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) 40X (50µm).



**Figura 11.** Principal alteración a nivel de hígado de *I. iguana* proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma), (A) histología normal del hígado, (B) depósitos de pigmento pardo negrozco. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) 40X (50µm).

La Figura 12A muestra el análisis histopatológico del hígado de los especímenes muestreados en Valledupar, evidenciándose una estructura sin alteraciones que

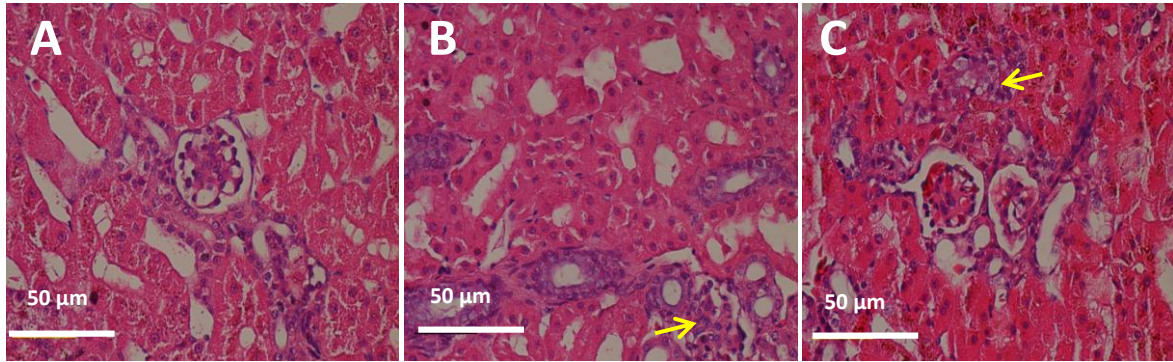
cumple con las características normales tisulares presentadas por la especie, en la cual la presencia de melano-macrófagos con pigmentos (melanina, hemosiderina y lipofuscina) es apreciada de manera habitual (Agius y Roberts, 2003). La presencia de este tipo de células con sustancia pardo negruzca (identificada como melanina por el método Fontana-Masson) en forma de depósitos, demostró para el área expuesta un mayor porcentaje de ocurrencia en la escala abundante comparada con la zona control (Tabla 3).



**Figura 12.** Corte histológico de hígado de *Iguana iguana*. Vena Central (VC), Melano-macrófagos cargados con pigmento pardo negruzco (Melanina), Rama de la Arteria Hepática (RAH). A: zona de referencia (Valledupar). B: zona expuesta (La Loma). H-E, 10X (200µm).

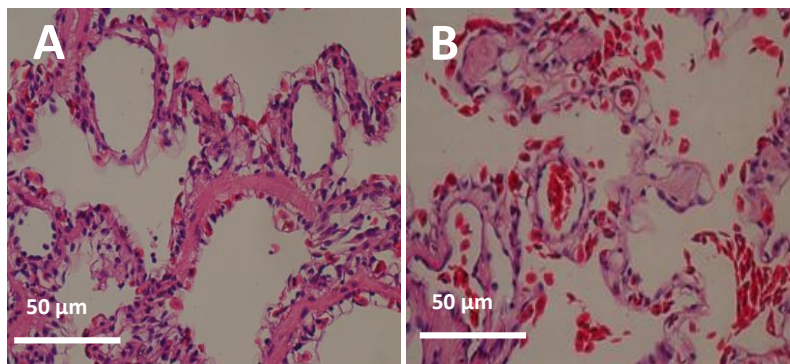
**7.1.1.3. Riñón.** Hallazgos histológicos como inflamación de tipo intersticial, perivascular, edema, resultaron ausentes en las muestras de riñón de la zona control. Trastornos circulatorios no fueron una característica de relevancia en cuanto a alteraciones renales, tal es el caso de congestión vascular, que resultó ser leve en el total de las muestras de la zona expuesta. Mientras que en la zona control un 33,3% resultaron clasificadas como leves, el porcentaje restante (66,7%) mostró ausencia de este hallazgo. Es de anotar que en este órgano no fueron observados cambios apoptóticos, en ningún de los sitios de estudio.





**Figura 13.** Principales alteraciones en riñón de *I. iguana* proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar): (A) histología normal del riñón, (B) inflamación cortical (flecha), (C) inflamación medular (flecha). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) 40X (50µm).

**7.1.1.4. Pulmón.** Al evaluar el tejido pulmonar, fue notable el hecho de que las inflamaciones de tipo aguda y crónica no arrojaron resultados relevantes, para el caso de la primera, esta no fue encontrada en las muestras de las dos zonas de estudio, y la inflamación crónica estuvo presente en categoría leve en un 18,2% en el área expuesta. Evidencias de congestión vascular, fueron determinadas en ambas zonas, siendo mayor el porcentaje de prevalencia en La Loma, obteniéndose valores de 90,9 y 9,1 para las escalas leve y moderado respectivamente, mientras en la zona de referencia, no hubo muestras en categoría moderada y en la leve el valor fue de 50%. Fibrosis fue otra alteración presente en este órgano, siendo ausente en el 100% de las muestras de la zona control mientras que en la zona expuesta fue encontrada en un 81,8%, clasificada como leve.



**Figura 14.** Alteración principal en Pulmón de *I. iguana* proveniente de territorio impactado por la minería del carbón (La Loma) y del sitio de referencia (Valledupar): (A) histología normal del pulmón, (B) congestión vascular. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) 40X (50µm).

## 7.2. CARACTERIZACIÓN DE DEPÓSITOS DE MELANINA.

Los resultados histopatológicos semi-cuantitativos (cuantificación por cruces) de los grupos de estudio son presentados en la Tabla 4. Este análisis fue determinado después de realizada la tinción FM, la cual permitió evidenciar que los especímenes recolectados en la zonas de actividad minera tenían una alta frecuencia de depósitos de melanina en escala abundante en comparación con lo observado en el área de referencia.

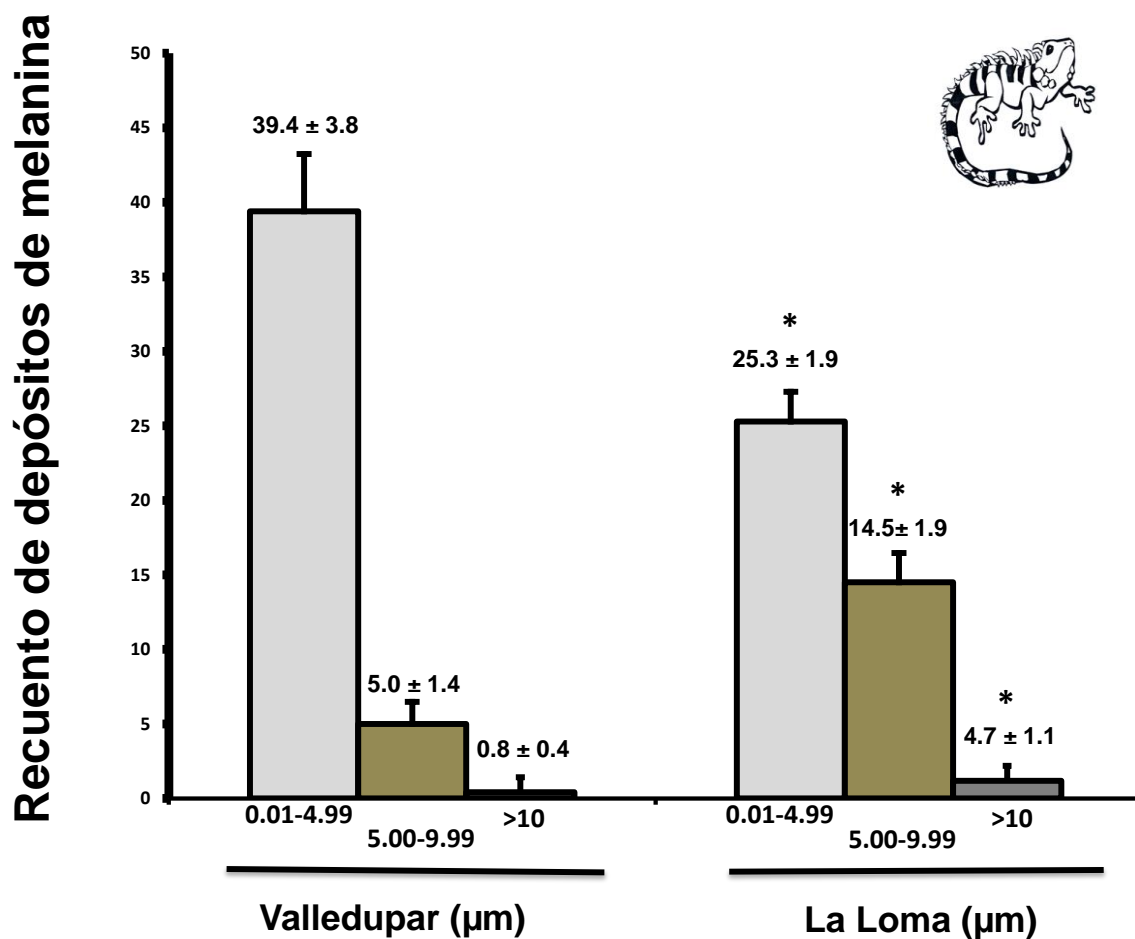
**Tabla 4.** Evaluación semi-cuantitativa del tamaño de los depósitos de melanina presentes en Iguanas de zonas control (Valledupar) y expuesta (La Loma).

<b>Presencia de depósitos de melanina (%)</b>		
	<b>VALLEDUPAR</b>	<b>LA LOMA</b>
<b>ABUNDANTES</b>	0	60
<b>MODERADOS</b>	10	10
<b>ESCASOS</b>	90	30

## 7.3. Área de depósitos de Melanina.

En referencia al análisis de las imágenes valoradas con el software optika visión Pro<sup>®</sup>, los datos presentados en función de la superficie cuadrática mostraron claras diferencias significativas. Para el rango de 0-5 micras fueron obtenidas ciertas diferencias significativas en cuanto al grupo expuesto en relación con el grupo control, lo que resulta en un menor número de depósitos de este tamaño en el área de minería (La Loma), tal como se representa en la Figura 15. En el rango de 5-10 micras también fueron observadas diferencias estadísticamente significativas en comparación con los datos del grupo de control, con un incremento de los depósitos de tamaño intermedio en las iguanas de la zona

afectada por la minería. Además de esto, para el rango de los depósitos más grandes (>10micras) también fueron observadas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control, demostrando, por esta razón, que los depósitos de melanina son sintetizados con mayor intensidad y de mayor tamaño en iguanas de la zona afectada por la minería de carbón que en iguanas pertenecientes a la zona de referencia, lo cual puede deberse a la presencia de alteraciones fisiológicas en las iguanas de la zona expuesta.



**Figura 15.** Caracterización del tamaño de depósitos de Melanina presentes en tejido hepático de iguanas del área de referencia (Valledupar) y el área expuesta (La Loma), ambas en el departamento del Cesar. \*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) comparada con el grupo control.

En los vertebrados heterotérmicos, como la iguana, la melanina contenida de forma extracutánea, puede ser encontrada en células de varios tejidos y órganos como el riñón, hígado, bazo, pulmón, entre otros. Las células que poseen este pigmento son denominadas melanosomas y presentan actividad melanosintética autónoma, tienen mayor predominio en el hígado con respecto a los otros órganos; localizándose principalmente en las paredes sinusoidales (Breathnach, 1988; Sichel, 1988; Barniet al., 1999; Gallone et al., 2007).

Diversos autores han reportado a través de sus investigaciones, que la melanina, es un polímero dotado de actividad antioxidante, el cual actúa como una trampa para radicales libres. La melanina puede ser sintetizada en forma metabólica, por medio del sistema de formación extracutánea pigmentaria, o por mecanismos de fotólisis o radiólisis, en los cuales la formación es netamente cutánea. Sin embargo, ha llegado a demostrarse para ambos tipos de melanina, que su principal función es la capacidad de captar radicales libres (Sichel, 1988; Rózanowska et al., 1999; Gallone et al., 2002; Gallone et al., 2007).

La relación encontrada por Sichel y col. (1988) al explorar la función protectora de las melaninas contra la toxicidad de  $O_2^-$  en órganos pigmentados, permitió comparar la actividad antioxidante de SOD con el contenido de melanina de hígado en varias especies de animales. De hecho, en este estudio fue demostrado que la melanina en el hígado pigmentado podría sustituir la actividad de SOD en los tejidos pigmentados, puesto que su efecto limpiador, produce bajos niveles de  $O_2^-$ , y por lo tanto una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes tipo SOD (Sichel, 1987; Sichel, 1988). De esta manera, puede afirmarse que el aumento en el contenido de melanina en el hígado de los reptiles de la Loma, está ligado a una menor actividad por parte de la SOD para contrarrestar algún proceso de estrés oxidativo generado probablemente por los compuestos contaminantes que son liberados en la explotación del carbón (Barni et al., 1999).

La contaminación ambiental puede llegar a provocar tanto respuestas inmunes adaptativas como adversas a diferentes niveles estructurales, es decir, en células, tejidos y órganos. Estas reacciones dependerán de una variedad de factores, tales como el tipo de contaminante y de su concentración, la tasa de exposición y la susceptibilidad de los organismos. Los melano-macrófagos del hígado al pertenecer al sistema retículo histiocítico sirven como un mecanismo de vigilancia de patógenos invasores (Fenoglio et al., 2005). De esta manera, estos resultados pueden tomarse como un indicador potencial de inmunotoxicidad al generar en las iguanas una respuesta inmunológica contra agentes extraños, tanto a nivel de bazo como de hígado, originando cambios en su arquitectura tisular.

Otro factor influyente de los xenobióticos, es que pueden llegar a tener efectos directos o indirectos mediante la generación intracelular de moléculas bioactivas, tales como los radicales libres, causando alteraciones funcionales y estructurales a niveles nucleares y citoplasmáticos (Burnett, 2005).

Los resultados encontrados a nivel histológico muestran que probablemente, la contaminación ambiental generada por la actividad minera en el departamento del Cesar produce lesiones en el bazo y en el parénquima de hígado en *Iguana iguana* como consecuencia de la liberación y posterior inhalación de la partícula de carbón *per se* y/o sus contaminantes asociados. Todo esto despierta interés por estudiar *in vivo* bajo condiciones controladas de laboratorio las diversas patologías que pueden originarse por la inhalación de polvos minerales.

## **8. CONCLUSIONES**

Las iguanas de las zonas de minería carbonífera poseen lesiones histopatológicas en distintos órganos presentando mayor número de afecciones a nivel del bazo e hígado, con relación a las capturadas en un área de referencia,

Las iguanas obtenidas del área expuesta (La Loma) evidencian un aumento en los depósitos de Melanina comparados con los de la zona de referencia (Valledupar).

Al asociar las propiedades biológicas de la melanina con su presencia a nivel hepático, se puede inferir que las iguanas que habitan en zonas impactadas por la minería de carbón, reflejan un mayor grado de estrés oxidativo, con respecto a las procedentes de la zona de referencia.

Estos estudios sugieren que la iguana es un organismo sensible a la contaminación derivada de la minería del carbón.

## **9. RECOMENDACIONES**

Realizar investigaciones con reptiles en cautiverio para verificar que la exposición a polvillo de carbón genera las lesiones observadas en los organismos silvestres.

Ejecutar el estudio con mayor número de especímenes y en otros lugares similares, también expuestos a la actividad minería, para efectos de confirmación de resultados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abbate, F., Latella, G., Montalbano, G., Guerrera, M., Levanti, M., Ciriaco E. 2008. Scanningelectronmicroscopicalstudy of the lingualepithelium of greeniguana (Iguanaiguana). *Anat. Histol. Embryol.* 37:314-316.

Achten, C., Hofmann, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals - a hardly recognized source of environmental contamination. *Sci. Total. Environ.* 407(8):2461-2473.

Acosta-Galvis, A.R. 2000. Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota. Colombiana.* 3:289-319.

Agius, C., Roberts, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish. Dis.* 26:499-509.

Antoine, DJ., Dear, JW., Starkey-Lewis, P., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., Thanacoody, RH., Gray, AJ., Webb, DJ., Moggs, JG., Bateman, DN., Goldring, CE., Park, BK. 2013. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology.* 58:777-787.

Arencibia, D., Rosario, LA., Suárez, Y., Vidal, A., 2003. Líneas murinas como biomodelos eficientes en ensayos de genotoxicidad. *Retel.* (2003)43-54.

Armutcu, F., Gun, B., Altin, R., Gurel, A. 2007. Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience. *Environ. Toxicol. Phar.* 24:106-113.

Au, D.W. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48:817-834.

Bain, B.J. 2005. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med.* 353, 498-507.

Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., Del Razo, LM. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem. Biol Interact.* 188:319-333.

Barni, S., Bertone, V., Croce, A.C., Bottiroli, G., Bernini, F., Gerzeli, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *J. Anat.* 195:19-25.

- Bessis, M. 1972. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. *Nouv Rev. Fr. Hematol.* 12:721-746.
- Beyersmann D, Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.*82:493-512.
- BijoyNandan, S., Nimila, P.J. 2012. Lindane toxicity: histopathological, behavioural and biochemical changes in *Ectoparasitiscus maculatus*. *Mar. Environ. Res.* 76:63-70.
- Bishop, J.A., Nelson, A.M., Merz, W.G., Askin, F.B., Riedel, S.2012. Evaluation of the detection of melanin by the Fontana-Masson silver stain in tissue with a wide range of organisms including *Cryptococcus*. *Hum. Pathol.* 43:898-903.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch- Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 28: 625-631.
- Bornman, M.S., Barnhoorn, I.E., De Jager, C., Veeramachaneni, D.N. 2010. Testicular microlithiasis and neoplastic lesions in wild eland (*Tragelaphus oryx*): possible effects of exposure to environmental pollutants? *Environ. Res.* 110:327-333.
- Bradl HB. 2005. Sources and Origins of Heavy Metals. Heavy Metals in the Environment: Origin, interaction and remediation. Interface Science and Technology. 6:1-27.
- Breathnach, A.S. 1988. Extra-cutaneous melanin. *Pigment Cell Res.* 1:234-237.
- Bucheli, T.D., Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 25:201-268.
- Burger J, Campbell KR, Campbell TS.2004 Gender and spatial patterns in metal concentrations in brown anoles (*Anolis sagrei*) in southern Florida, USA. *Environ. Toxicol Chem.* 23:712-718.
- Burger J, Campbell KR, Murray S, Campbell TS, Gaines KF, Jeitner C, Shukla T, Burke S, Gochfeld M. 2007 . Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. *Sci. Total. Environ.* 373:556-563.
- Burnett, K. 2005. Impacts of environmental toxicants and natural variables on the immune system of fishes. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol 6. Elsevier, Charleston, pp 231-253.
- Burns RP, Paul-Murphy J. 2009. Determination of lead and zinc concentrations in the blood and liver of the captive common green iguana (*Iguana iguana*). *J. Zoo. Wild. L. Med.* 40:495-500.
- Campbell, KR, Campbell, TS. 2000. Lizard contaminant data for ecological risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 165:39-116.



- Campen, MJ., Lund, AK, Doyle-Eisele, ML., McDonald, JD., Knuckles, TL, Rohr, AC., Knipping, EM., Mauderly. 2010. A comparison of vascular effects from complex and individual air pollutants indicates a role for monoxide gases and volatile hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 118:921-927.
- Çelik, A., Ögenler, O., Cömelekoğlu, Ü. 2005. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. *Mutagenesis.* 20:411-415.
- Chamorro-Rengifo, J., Cubillos-Rodríguez, PA. 2007. Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia. *SiB F.* 2007.
- Champoux, L., Moisey, J., Muir, DC. 2010. Polybrominated diphenyl ethers, toxaphenes, and other halogenated organic pollutants in great blue heron eggs. *Environ. Toxicol. Chem.* 29:243-249.
- Chen, Y., Shan, N., Huggins, F., Huffman, GP. 2005. Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ. Sci. Technol.* 39:1144-1151.
- Costa PM, Costa MH. 2012. Development and application of novel histological multichrome technique for clam histopathology. *J. Invertebr. Pathol.* 110:411-414.
- Costa, C., Catania, S., De Pasquale, R., Stancanelli, R., Scribano, GM., Melchini, A. 2010. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology.* 271:83-86.
- Costa, P.M., Costa, M.H. 2008. Biochemical and histopathological end points of *in vivo* cadmium toxicity in *Sparus aurata*. *Cienc.* 34:349-361.
- Costa, PM., Diniz, MS., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, AM., Caetano, M., Vale, C., Del Valls, TA., Costa, MH. 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquat. Toxicol.* 92:202-212.
- Crain, DA., Guillette, LJ Jr. 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim. Reprod. Sci.* 53:77-86.
- Cui, M., Jang, M., Cho, SH., Khim, J. 2010 Potential application of sludge produced from coal mine drainage treatment for removing Zn(II) in an aqueous phase. *Environ. Geochem. Health.* 33:103-112.
- Da Silva, J., de Freitas, T.R., Heuser, V., Marinho, J.R., Bittencourt, F., Cerski, C.T., Kliemann, L.M., Erdtmann, B. 2000 (a). Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutat. Res.* 470: 39-51.
- da Silva, J., de Freitas, TR., Heuser, V., Marinho, JR., Bittencourt, F., Cerski, CT., Kliemann, LM., Erdtmann, B. 2000 (b). Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutat. Res.* 470:39-51.

D'Agostini, F., Balansky, R., Steele, V.E., Ganchev, G., Pesce, C., De Flora, S. 2008. Preneoplastic and neoplastic lesions in the lung, liver and urinary tract of mice exposed to environmental cigarette smoke and UV light since birth. *Int. J. Cancer*. 123:2497-2502.

Dalal, N.S., Newman, J., Pack, D., Leonard, S., Vallyathan, V. 1995. Hydroxyl radical generation by coal mine dust: possible implication to coal workers' pneumoconiosis (CWP). *FreeRadic. Biol. Med.* 18:11-20.

Davidson, T., Ke, Q., Costa, M. 2007. Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity. En: Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition). *Elsevier Inc.* 79-99.

Dellantonio, A., Fitz, W.J., Repmann, F., Wenzel, W.W. 2010. Disposal of coal combustion residues in terrestrial systems: contamination and risk management. *J. Environ. Qual.* 39:761-775.

Elard, F., León, D. 2006. La importancia del carbón mineral en el desarrollo. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG.* 9:91-97.

El-Refaay, A.I., Eissa, F.I. 2013. Histopathology and cytotoxicity as biomarkers in treated rats with cadmium and some therapeutic agents. *Saudi. J. Biol. Sci.* 20:265-280.

EPA.gov. Environmental Protection Agency - PM10 NAAQS. Implementation [Página principal en internet]. United States; 2010 [citado 18 Dic 2011]. Disponible en: [http://www.epa.gov/ttn/naaqs/pm/pm10\\_index.html](http://www.epa.gov/ttn/naaqs/pm/pm10_index.html).

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G., Barni, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:259-68.

Ferreira, D., da Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J. 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere.* 79:914-21.

Gallone, A., Guida, G., Maida, I., Cicero, R. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? 2002. *Pigment Cell Res.* 15:32-40.

Gallone, A., Sagliano, A., Guida, G., Ito, S., Wakamatsu, K., Capozzi, V., Perna, G., Zanna, P., Cicero, R. 2007. The melanogenic system of the liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L tyrosinase activity. *Histol. Histopathol.* 10:1065-1075.

Gao, S., Wang, Y., Zhang, P., Dong, Y., Li, B. 2008. Subacute oral exposure to dibromoacetic acid induced immunotoxicity and apoptosis in the spleen and thymus of the mice. *Toxicol. Sci.* 105:331-341.

Geras'kin, S., Oudalova, A., Michalik, B., Dikareva, N., Dikarev, V. 2011. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test. *Chemosphere.* 83:1133-1146.

Ghose, MK., Majee, SR. 2007. Characteristics of hazardous airborne dust around an Indian surface coal mining area. *Environ. Monit. Assess.* 130:17-25.

Guillette, LJ Jr, Guillette, EA. 1996. Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol Ind Health.* 12:537-550.

Gutiérrez-Salinas, J., Morales-González, JA., Madrigal-Santillán, E., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., González-Rubio, MG., Suástegui-Domínguez, S., Valadez-Vega, C.2010. Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes. *Int. J Mol. Sci.* 11:3610-3622.

Hadnagy, W., Stiller-Winkler, R., Idel, H. 1996. Immunological alterations in swera persons living in areas with different air pollution. *Toxicol Lett.* 88:147-153.

Handy, R.D., Runnals, T., Russel, P.M. 2002. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology.* 11:467-479.

Hart, K., Kannan, K., Tao, L., Takahashi, S., Tanabe, S. 2008. Skipjack tuna as a bioindicator of contamination by perfluorinated compounds in the oceans. *Sci. Total Environ.* 403:215-221.

Hédouin, L., Pringault, O., Bustamante, P., Fichez, R., Warnau, M. 2011. Validation of two tropical marine bivalves as bioindicators of mining contamination in the New Caledonia lagoon: Field transplantation experiments. *Water. Res.* 45:483-496.

Hemrajani, D.K. 2005. Introduction of Histopathology: Standard operative procedures in histopathology for laboratory technicians. Consultado por última vez el 20 de mayo de 2011. Disponible en: <http://www.rajswasthya.nic.in/RHSDP%20Training%20Modules/Lab.%20Tech/Histo/Introduction.pdf>

Herberth, G., Gubelt, R., Röder, S., Krämer, U., Schins, RP., Diez, U., Borte, M., Heinrich, J., Wichmann, HE., Herbarth, O., Lehmann, I.; LISA plus study group. 2009. Increase of inflammatory markers after indoor renovation activities: the LISA birth cohort study. *Pediatr. Allergy. Immunol.* 20:563-570.

Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environ. Res.* 55:137-159.

Hsu, MJ., Selvaraj, K., Agoramoorthy, G. 2006. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environ Pollut.* 143:327-334.

Hu, N., Shi, X., Huang, P., Mao, J., Liu, J., Liu, Y., Ma, D.2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of Liaodong Bay, Bohai Sea, China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18:163-172.

International Energy Agency (IEA). World Energy Statistics. Francia: International Energy Agency; 2010.

Iwano, S., Ichikawa, M., Takizawa, S., Hashimoto, H., Miyamoto, Y. 2010. Identification of AhR-regulated genes involved in PAH-induced immunotoxicity using a highly-sensitive DNA chip, 3D-Gene Human Immunity and Metabolic Syndrome 9k. *Toxicol. In Vitro*. 24:85-91.

Jones, T., BéruBé, K. 2006. Mineralogy and structure of pathogenic particles. En: Particle toxicology, First Edition. Taylor & Francis Group, LLC.

José Zocche, J., Dimer Leffa, D., Paganini Damiani, A., Carvalho, F., Avila Mendonça, R., Dos Santos, CE., Appel Bouffleur, L., Ferraz Dias, J., de Andrade, VM. 2010. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coalmining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environ. Res.* 110:684-91.

Jurkiewicz, A. 1986. Second moment of n.m.r. line for the Wisser model of coal. *Fuel* 65:1022-102.

Kabe, T., Ishihara, A., Weihua Qian, E., Sutrisna, I., Kabe, Y. 2004. Chemical and macromolecular structure of coal. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 150: 81-126.

Kesteman, N., Vansanten, G., Pajak, B., Goyert, S.M., Moser, M. 2008. Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 83:640-647.

Kimura, KC., Fukumasu, H., Chaible, LM., Lima, CE., Horst, MA., Matsuzaki, P., Sanches, DS., Pires, CG., Silva, TC., Pereira, TC., Mello, M.L., Matera, J.M., Dias, R.A., Monnereau, A., Sasco, A.J., Saldiva, PH., Dagli, ML. 2010. Evaluation of DNA damage by the alkaline comet assay of the olfactory and respiratory epithelia of dogs from the city of São Paulo, Brazil. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62:209-219.

Klimentidis, YC., Beasley, TM., Lin, HY., Murati, G., Glass, GE., Guyton, M., Newton, W., Jorgensen, M., Heymsfield, SB., Kemnitz, J., Fairbanks, L., Allison, DB. 2011. Canaries in the coalmine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics. *Proc. Biol. Sci.* 278:1626-1632

Kuzmick, DM., Mitchelmore, CL., Hopkins, WA., Rowe, CL. 2007. Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full-lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthius). *Sci. Total Environ.* 373:420-430.

Lang T, Wosniok W, Barsiene J, Broeg K, Kopecka J, Parkkonen J. 2006. Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 53:488-496.

Leffa, DD., Damiani, AP., da Silva, J., Zocche, JJ, dos Santos, CE., Bouffleur, LA., Dias, JF., de Andrade, VM. 2010. Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59:614-621.

León, G., Pérez, LE., Linares, JC., Hartmann, A., Quintana, M. 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat. Res.* 630:42-49.

León-Mejía, G., Espitia-Pérez, L., Hoyos-Giraldo, LS., Da Silva, J., Hartmann, A., Henriques, JA., Quintana, M. 2011. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci. Total Environ.* 409:686-691.

Liu, J., Liu, Y., Goyer, R.A., Achanzar, W., Waalkes, M.P. 2000. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol. Sci.* 55:460-467.

Loft, S., Poulsen, H.E. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol. Med.* 74:297-312.

Lynch, E.C. 1990. Peripheral blood smear. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 3rd edition. Boston: *Butterworths.*

Mamurekli, D. 2010. Environmental impacts of coal mining and coal utilization in the UK. *Acta Montanistica Slovaca.* 15:134-144.

Martin, LK., Jr, Black, MC. 1998. Biomarker assessment of the effects of coal strip-mine contamination on channel catfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41:307-320.

Matos, P., Fontai 'nhas-Fernandes, A., Peixoto F., Carrola J., Rocha E. 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89:73-80.

McCunney, R.J., Morfeld, P., Payne, S. 2009. What component of coal causes coal workers' pneumoconiosis? *J. Occup. Environ. Med.* 51:462-71.

Miller, G. 2005. The Effect of Coal Usage on Human Health and the Environment. En: *Coal Energy Systems.* Elsevier Inc. 77-122.

Ming-Ho Y. 2005a. Volatile Organic Compounds. En: *Environmental Toxicology Biological and Health Effects of Pollutants, Second Edition.* CRC Press.

Ming-Ho Y. 2005b. Air Pollution-Particulate Matter. En: *Environmental Toxicology Biological and Health Effects of Pollutants, Second Edition.* CRC Press.

Ministerio de Minas y Energía. La cadena del carbón. Colombia: Ministerio de Minas y Energía, UPME-Unidad de Planeación minero energética; 2005.

Minors, D.S. 2004. Physiology of red and white blood cells. *Anaesth. Intensive Care.* 5:174-178.

Moldoveanu, SC. 2010. Toxicological and Environmental Aspects of Polycyclic Aromatic. En: *Pyrolysis of Organic Molecules with Applications to Health and Environmental Issues.* Elsevier B.V. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry.* 28(693-699).

Monteiro, M., Quintaneiro, C., Pastorinho, M., Pereira, ML., Morgado, F., Guillermino, L., Soares, AM. 2006. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere*. 62:1333-1339.

Moulis, JM., 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biomaterials*. 23:877-896.

Munoz, EM., Ortega, AM., Bock, BC., Páez, VP. 2003. Demografía y ecología de anidación de la iguana verde, *Iguana iguana* (Squamata: Iguanidae) en dos poblaciones explotadas en la Depresión Momposina, Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 51:229-240.

Myers, M., Johnson, L., Olson, O., Stehr, C., Horness, B., Collier, T., McCain, B. 1998. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and Pacific Coasts, USA. *Mar. Pol. Bull.* 37:92-113.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8:199-216.

Nakayama SM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Teraoka H, Mizuno N, Ishizuka M. Metal and metalloid contamination in roadside soil and wild rats around a Pb-Zn mine in Kabwe, Zambia. *Environ. Pollut.* 2011 Jan;159:175-181.

Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, LE., Srám, RJ., Ceppi, M., Bocchini, V., Merlo, DF. 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.* 612:14-39.

Nunes, A.C., Mathias, M.L., Crespo, A.M. 2011. Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environ. Pollut.* 113:87-93.

Oliva, M., Perales, JA., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riaño, MD. 2012. Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Sole senegalensis*) from heavy metals and PAHs polluted estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 64:2097-1208.

Orem, WH., Finkelman, RB. 2004. Coal formation and geochemistry. In *Treatise on Geochemistry*. Volume 7. Edited by: Mackenzie FT. San Diego, Elsevier Inc.;191-222.

Palmer, MA., Bernhardt, ES., Schlesinger, WH., Eshleman, KN., Foufoula-Georgiou, E., Hendryx, MS., Lemly, AD., Likens, GE., Loucks, OL., Power, ME., White, PS., Wilcock, PR. 2010. Science and regulation. Mountaintop mining consequences. *Science*. (5962):148-149.

Park, JH., Mangal, D., Frey, AJ., Harvey, RG., Blair, IA., Penning, TM. 2009. Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-ketoreductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J. Biol. Chem.* 284:29725-29734.

Pekmez, H., Ogeturk, M., Ozyurt, H., Sonmez, M.F., Colakoglu, N., Kus, I. 2010. Ameliorative effect of caffeic acid phenethyl ester on histopathological and biochemical changes induced by cigarette smoke in rat kidney. *Toxicol. Ind. Health*. 26:175-182.

Pereira, R., Pereira, M.L., Ribeiro, R., Gonçalves, F. 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattusrattus L.*) and Algerian mice (*MusspretusLataste*) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ. Pollut.* 139:561-575.

Perez, DG., Fontanetti, CS. 2011. Hemocitital responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ. Monit. Assess.* 177:437-447.

Pies, C., Hoffmann, B., Petrowsky, J., Yang, Y., Ternes, TA., Hofmann, T. 2008. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere*. 72:1594-1601.

Pinho, RA., Bonatto, F., Andrades, M., Frota, ML Jr., Ritter, C., Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Uldrich-Kulczynski, JM., Moreira, JC. 2004. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ. Res.* 96:290-297.

Poleksic, V., Lenhard, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B. 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenserruthenus Linnaeus, 1758*). *Environ. Toxicol. Chem.* 29:515-521.

Prabu, PC., Dwivedi, P., Sharma, AK. 2011. Toxicopathological studies on the effects of aflatoxin B(1), ochratoxin A and their interaction in New Zealand White rabbits. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65:277-86.

Rabitto, IS., Alves Costa, JR., Silva de Assis, HC., Pelletier, EE., Akaishi, FM., Anjos, A., Randi, MA., Oliveira Ribeiro, CA. 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:147-56.

Rezaee J., Nejati V., Tukmechi, A., Hasanzadeh, S. 2012. Histopathological effects of experimental paraquat on spleen and pronephros of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Clin. Pathol.* 25 February 2012. 1-5.

Riba, I., Casado-Martinez, M.C., Blasco, J., DelValls, T.A. 2004. Bioavailability of heavy metals bound to sediments affected by mining spill using *Solea senegalensis* and *Scrobicularia plana*. *Mar. Environ. Res.* 58:395-399.

Rózanowska, M., Sarna, T., Land, EJ., Truscott, TG. 1999. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidizing radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 26:518-25.

Ruehl-Fehlert, C., Hartmann, E., Rinke, M. 2008. Reactive and proliferative changes of splenic reticulum cells of rats investigated with special staining methods and immunohistochemistry. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59:281-290.

Sackett, DK., Aday, DD., Rice, JA., Cope, WG., Buchwalter, D. 2010. Does proximity to coal-fired power plants influence fish tissue mercury? *Ecotoxicology*. 19:1601-1611.

- Sadiyappan, B., Balaraman, D., Sangaralingam, K., Manikam, S., Thirunavukkarsu, R., Pandiyan, Priyadharsini. 2012. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* S635-S638
- Sartori, M., Taylor, E., Abe, A. 2012. Nitrogen excretion during embryonic development of the green iguana, *Iguana iguana* (Reptilia; Squamata). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 163:210-214.
- Schins, RP., Borm, PJ. 1999. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann. Occup. Hyg.* 43:7-33.
- Sciarrillo, R., De Falco, M., Virgilio, F., Laforgia, V., Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Varano, L. 2008. Morphological and functional changes in the thyroid gland of methyl thiophanate-injected lizards, *Podarcis sicula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55:254-261.
- Sichel, G. 1988. Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. *Pigment. Cell. Res.* 1:250-258.
- Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Sciuto, S., Geremia, E. 1987. Relationship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem. Funct.* 2:123-128.
- Silva, LF., Oliveira, ML., da Boit, KM., Finkelman, RB. 2009. Characterization of Santa Catarina (Brazil) coal with respect to human health and environmental concerns. *Environ. Geochem. Health.* 31:475-85.
- Simco.gov.co. Sistema de Información Minero Colombiano - SIMCO [Página principal en internet] Boletín Estadístico de Minas y Energía 1999-2010. Bogotá: Ministerio de Minas y Energía de Colombia; 2010 [citado 15 Dic 2011]. Disponible en: <http://www.simco.gov.co/Inicio/tabid/38/Default.aspx>
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W. 2003. Stout, SA., Emsbo-Mattingly, S. 2008. Concentration and character of PAHs and other hydrocarbons in coals of varying rank-Implications for environmental studies of soils and sediments containing particulate coal. *Org. Geochem.* 39:801-819.
- Suresh, N. 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melanomacrophage centres in *Tilapia mossambica*. *J. Environ. Biol.* 30:505-508.
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, JA., Dimanche-Boitrel, MT., Lagadic-Gossmann, D. 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243:68-76.
- The, S., Adams, S., Hinton, D. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic toxicology.* 37:151-170.
- Tucker, V. 1966. Oxygen transport by the circulatory system of the green iguana (*Iguana iguana*) at different body temperatures. *J Exp Biol.* 44:77-92.

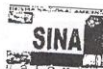


- Tuluçe, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., Ine, H. 2011. Increased occupational coal dust toxicity in blood of central heating system workers. *Toxicol. Ind. Health*. 27:57-64.
- Vallyathan, V., Shi, X., Castranova, V. 1998. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* Suppl 5:1151-1155.
- Van Krevelen D. W. 1994. Coal: Typology-Physics-Chemistry-Constitution. En: International Journal of Coal Geology. Vol. 3-4. Elsevier Science, Amsterdam, pp 261-262.
- Vaschenko, MA., Zhadan, PM., Aminin, DL., Almyashova, TN. 2012. Lipofuscin-Like Pigment in Gonads of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* as a Potential Biomarker of Marine Pollution: A Field Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62:599-613.
- Vidic, A., Ilic, Z., Deljkic, D, Adrovic F. 2011. Exposure of workers in tusnica coal mine. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 144:672-674
- Vucetich, JA., Outridge, PM., Peterson, RO., Eide, R., Isrenn, R. 2009. Mercury, lead and lead isotopes in the teeth of moose (*Alces alces*) from Isle Royale, U.S. Upper Midwest, from 1952 to 2002. *J. Environ. Monit.* 11:1352-1359.
- Walker, CH. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Organic Pollutants An Ecotoxicological Perspective, Second Edition. CRC Press. 165-176.
- Wang, Z., Chai, L., Yang, Z., Wang, Y., Wang, H. 2010. Identifying sources and assessing potential risk of heavy metals in soils from direct exposure to children in a mine-impacted city, Changsha, China. *J. Environ. Qual.* 39:1616-1623.
- Wayland, M., Kneteman, J., Crosley, R. 2006. The American dipper as a bioindicator of selenium contamination in a coal mine-affected stream in west-central Alberta, Canada. *Environ. Monit. Assess.* 123:285-298.
- Wester, P.W., Van Der Ven, L.T.M., Vethaak, A.D., Grinwis, G.C.M., Vos, J.G. 2002. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11:289-295.
- Williams, W.J., Beutler, E., Ersler, A.J., Lichtman, M.A. 1983. Eds. Hematology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 257-279.
- Wu, Y., Wang, C., Wang, Y., Zhao, Y., Chen, YX., Zuo, ZH. 2007. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*. *J. Environ. Sci.* 19:1129-1135.

## **11. ANEXOS**

**ANEXO 1. PERMISO DE CORPOCESAR PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES.**

Corporación Autónoma Regional del Cesar  
CORPOCESAR



Continuación Auto No **040** de **10 MAY 2010** por medio del cual se inicia trámite administrativo ambiental con el fin de examinar la viabilidad de otorgar permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica a la Universidad de Cartagena, dentro del proyecto investigativo referente al estudio y evaluación de marcadores de toxicidad en especies animales provenientes de la zona de influencia de la minería del carbón en el Departamento del Cesar.

- 6. Copia de la resolución No 02 del 2 de junio de 2006 por medio se designa al doctor GERMAN ARTURO SIERRA ANAYA como Rector de la Universidad en citas.
- 7. Copia del acta de posesión.
- 8. Número de identificación tributaria.
- 9. Certificación expedida por la coordinadora del grupo de consulta previa del Ministerio del Interior y de Justicia, especificando que no se registran comunidades indígenas y consejos comunitarios de comunidades negras en el área del proyecto delimitado por las siguientes coordenadas: N: 9° 38'17.28"- WO: 73° 37'18.30, N: 09° 32'44.97"- WO: 73° 38'46.30" , N: 10° 34'26.7"- WO: 73° 16'19", N: 9° 38'26.1"- WO: 73° 29'55.83"-N: 9° 31'18.95"- WO: 73° 18'56.39", N: 9° 37'14.73"- WO: 73° 32'57.99", N: 9° 37'10.58"- WO: 73° 26'23.12", N: 9° 37'23.43"- WO: 73° 35'46.772, N: 9° 32'43.64"- WO 73° 34'41.48"

Frente a lo pedido resulta conveniente indicar lo siguiente:

- 1. Mediante Decreto 309 del 25 de febrero de 2000 se reglamentó lo relativo a la investigación científica en diversidad biológica.
- 2. A través de la Resolución No 068 del 22 de enero de 2002 el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial establece el procedimiento para los permisos de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica y adopta otras determinaciones.
- 3. Al tenor de lo dispuesto en la resolución supra-dicha, la persona natural o jurídica interesada en obtener permiso de estudio en diversidad biológica o práctica docente universitaria con fines de investigación científica, que involucre alguna o todas las actividades de colecta, recolecta, captura, caza, pesca, manipulación del recurso biológico y movilización en el territorio nacional, deberá presentar una solicitud escrita y/o en medio magnético dirigida a la autoridad ambiental competente conforme al formato No. 1 denominado "Investigación científica sobre diversidad biológica" y su correspondiente instructivo, anexo a dicho acto administrativo y del cual forma parte integral.
- 4. El procedimiento para la expedición del permiso está contenido en el artículo tercero y ss de la resolución en comento.
- 5. Por mandato del Artículo 96 de la ley 633 de 2000, "las autoridades ambientales cobrarán los servicios de evaluación y los servicios de seguimiento de la licencia ambiental, permisos, concesiones, autorizaciones y demás instrumentos de control y manejo ambiental establecidos en la ley y los reglamentos". Para estos efectos cabe indicar que mediante Resolución No 021 del 19 de febrero de 2004, Corpoesar adoptó las tarifas para el cobro de los servicios de evaluación y seguimiento ambiental. Para el caso de las autorizaciones, permisos, concesiones y otros instrumentos de control diferentes a licencias y planes de manejo ambiental, por cada profesional que se emplee en la labor de evaluación técnica se cobra un valor equivalente a 24.6 veces el salario mínimo legal diario vigente, durante cada día de visita a la zona del proyecto, obra o actividad, incrementado en el porcentaje que anualmente fija el MAVDT por concepto de gastos de administración. En consecuencia la liquidación es la siguiente:

Carrera 9 No 9-88- Valledupar  
Teléfonos 5733925-5737778  
Fax 5737181

Corporación Autónoma Regional del Cesar  
CORPOCESAR



Continuación Auto No **040** de **10 MAY 2010** por medio del cual se inicia trámite administrativo ambiental con el fin de examinar la viabilidad de otorgar permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica a la Universidad de Cartagena, dentro del proyecto investigativo referente al estudio y evaluación de marcadores de toxicidad en especies animales provenientes de la zona de influencia de la minería del carbón en el departamento del Cesar.

SALARJO MINIMO LEGAL DIARIO VIGENTE (\$515.000/30)	NUMERO DE PROFESIONALES EVALUADOS	VALOR (constante) EQUIVALENTE POR PROFESIONAL	DIAS DE VISITA	GASTOS DE ADMINISTRACION RACION R. MAVDT	COSTO TOTAL
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	6= 1*2*3*4*5
\$ 17.167	1	24.6	0.5	25% (1.25)	\$ 264.000

En razón y mérito de lo expuesto, el Director General de Corpopesar en ejercicio de las facultades conferidas por la ley 99 de 1993 y disposiciones reglamentarias.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Iniciar el trámite administrativo ambiental con el fin de examinar la viabilidad de otorgar permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica a la Universidad de Cartagena con identificación tributaria No 890.480.123-5, dentro del proyecto investigativo referente al estudio y evaluación de marcadores de toxicidad en especies animales provenientes de la zona de influencia de la minería del carbón en el departamento del Cesar.

ARTICULO SEGUNDO: Ordenar la práctica de una diligencia inspectiva en la zona de influencia de la minería del carbón en el Departamento del Cesar, en las coordenadas N: 9° 38'17.28" WO: 73° 37'18.30", N: 09° 32'44.97"- WO: 73° 38'46.30" , N: 10° 34'26.7"- WO: 73° 16'19", N: 9° 38'26.1"- WO: 73° 29'55.83"-N: 9° 31'18.95"- WO: 73° 18'56.39" N: 9° 37'14.73"- WO: 73° 32'57.99", N: 9° 37'10.58"- WO: 73° 26'23.12", N: 9° 37'23.43"- WO: 73° 35'46.772, N: 9° 32'43.64"- WO 73° 34'41.48". La diligencia será cumplida por el Biólogo Wilson Pérez Ascanio el día 14 de mayo de 2010, quien deberá rendir el correspondiente informe técnico a la Subdirección General del Área de Gestión Ambiental, precisando además lo que fuere pertinente en torno a la necesidad o no del permiso para la especie Ratón.

PARAGRAFO 1: La Universidad de Cartagena debe presentar a Corpopesar un Ejemplar del Diario de amplia circulación nacional, regional o local, en el que publique un extracto del formato radicado ante la Corporación, el cual deberá contener por lo menos la información del titular, título y ámbito de la investigación o del programa institucional de investigación, área geográfica y los especímenes o muestras de la diversidad biológica objeto de estudio.

PARAGRAFO 2: En el evento en que el evaluador requiera por escrito información o documentación técnica para proseguir el trámite, a partir de ese momento quedan suspendidos los términos del proceso hasta tanto el interesado cumpla todo lo requerido.

Carrera 9 No 9-88- Valledupar  
Teléfonos 5733925-5737778  
Fax 5737181

Corporación Autónoma Regional del Cesar  
CORPOCESAR



Continuación Auto No **040** de **10 MAY 2010** por medio del cual se inicia trámite administrativo ambiental con el fin de examinar la viabilidad de otorgar permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica a la Universidad de Cartagena, dentro del proyecto investigativo referente al estudio y evaluación de marcadores de toxicidad en especies animales provenientes de la zona de influencia de la minería del carbón en el departamento del Cesar.

Si el requerido no da respuesta dentro del término legal, se entenderá que ha desistido de la solicitud y se procederá al archivo del expediente en los términos del artículo 13 del CCA.

ARTICULO TERCERO: La Universidad de Cartagena debe cancelar a favor de Corpoesar la suma de DOSCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS ( \$ 264.000 ) por concepto del servicio de evaluación ambiental en la Cuenta Corriente No 938.009735 Banco BBVA o la No 494129943 del Banco Bogotá. De igual manera la Universidad peticionaria debe transportar al comisionado. En ningún caso se podrá pagar a un servidor público.

PARAGRAFO: Dos copias del recibo de consignación o comprobante del pago, deben remitirse a la Coordinación de la Sub Area Jurídica Ambiental de Corpoesar antes de la diligencia inspectiva, para su inserción en el expediente y trámite respectivo. Si el recibo se presenta fuera del término señalado la diligencia no podrá realizarse en la fecha prevista y será necesaria su reprogramación

ARTICULO CUARTO: Notifíquese al Representante Legal de La Universidad de Cartagena o a su apoderado legalmente constituido.

ARTICULO QUINTO: Comuníquese al señor Procurador Delegado Para Asuntos Ambientales.

ARTICULO SEXTO: Publíquese en el Boletín Oficial de Corpoesar.

ARTICULO SEPTIMO: Contra lo resuelto en el Artículo Tercero procede el recurso de reposición del cual habrá de hacerse uso por escrito ante este despacho dentro de los cinco (5) días siguientes a la notificación. Contra los demás artículos no procede recurso alguno por tratarse de disposiciones de trámite.

NOTIFIQUESE, COMUNIQUESE, PUBLIQUESE Y CUMPLASE

**VIRGLIO SEGUNDO CALDERON PEÑA**  
Director General

Proyecto: Julio Alberto Olivella Fernández- Coordinador Sub Área Jurídica Ambiental  
Expediente CJA 005-010

Carrera 9 No 9-88- Valledupar  
Teléfonos 5733925-5737778  
Fax 5737181