

MONOGRAFÍA: BIOMARCADORES GENOTOXICOS EN TILAPIA NILÓTICA  
*Oreochromis niloticus* COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DE AGUAS POR  
METALES PESADOS

ÁNGELA CRISTINA TELLO VALLEJO

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
PROGRAMA ESPECIALIZACIÓN EN MEJORAMIENTO GENÉTICO  
POPAYÁN, 13 DE DICIEMBRE DE 2017

MONOGRAFÍA: BIOMARCADORES GENOTOXICOS EN TILAPIA NILÓTICA  
*Oreochromis niloticus* COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DE AGUAS POR  
METALES PESADOS

ÁNGELA CRISTINA TELLO VALLEJO

Trabajo presentado como Requisito para  
Optar al Título de Especialista en Mejoramiento Genético

DIRECTORA: Ph.D. LUZ MERY BERNAL PARRA

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
PROGRAMA ESPECIALIZACIÓN EN MEJORAMIENTO GENÉTICO

POPAYÁN, 13 DE DICIEMBRE DE 2017

## **Dedicatoria**

A Dios le dedico por cuanto soy, cuanto puedo y recibo, porque reflejas tu amor al poner en mi vida una bella familia, mi novio, compañeros, amigos y demás cosas bonitas pero más en la tristeza, el dolor y la necesidad me muestras tu infinita misericordia. Por todo: ¡Gracias Señor!

Dedicada especialmente a mi mama, a quien le estoy eternamente agradecida por todo el amor y el apoyo que me ha brindado en todo momento en especial en los difíciles, al ser mi mayor motivación para alcanzar mis metas en especial para obtener este título con mucho orgullo. Siendo siempre mi ejemplo a seguir porque todo lo que he conseguido en la vida y la mujer que soy se lo debo exclusivamente a ella. Te amo infinitamente mamita hermosa.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi familia, en especial a mi hermana por ser ese motor de superación, quien es el regalo más hermoso que me reta a ser cada día mejor para ella y a mi papá por su valioso esfuerzo en pro de mi educación, quien siempre ha estado ahí siendo mi apoyo además de enseñarme muchas cosas que ahora compartimos con mucho cariño.

Gracias a mi Directora Luz Mery Bernal por ser la luz en este camino académico que Dios puso para guiarme y quien con tanta entrega compartió su sabiduría, me acompañó y motivo a mejorar para lograr este título. Con orgullo puedo decir que tuve el privilegio de tener la mejor tutora y sobretodos sus títulos un excelente ser humano. La llevare siempre en mi corazón.

## Resumen

En los últimos años algunas de las causas de contaminación en el mundo son las actividades antrópicas, el crecimiento demográfico y económico, generando diversos desechos entre estos los metales pesados como resultado de la combustión de combustibles fósiles, procesos industriales, agrícolas y naturales. En los ecosistemas acuáticos, los metales pesados han recibido considerable atención debido a su toxicidad y potencial de bioacumulación a diversos niveles tróficos y se han implementado los biomarcadores genotóxicos en peces como el test de micronúcleos para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos como los metales pesados. En consideración a las problemática ambiental por metales pesados en ambientes acuáticos, se plantea como objetivo realizar una revisión bibliográfica de estudios que utilicen Biomarcadores genotóxicos en peces *Oreochromis niloticus* como indicadores de contaminación con metales pesados, concluyendo que los peces son centinelas de genotoxicidad porque brindan información de la calidad de las aguas, por su capacidad de acumulación de contaminantes y metabolizar xenobióticos. El género *Oreochromis*, es uno de los más abundantes y ampliamente utilizado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogénesis por su sensibilidad. El test de micronúcleos se considera de gran importancia por ser universalmente validada, de fácil acceso y ampliamente utilizada para evaluar del efecto genotóxico por exposición a metales pesados en peces por la sensibilidad, facilidad de ejecución, lectura, bajo costo, efectividad y precisión. En la mayoría de los resultados de los estudios revisados la frecuencia de micronúcleos se incrementa siendo estadísticamente significativa en los peces expuestos a metales respecto a los resultados del

grupo control o de peces no expuestos. Se hace necesario dar a conocer esta revisión a las comunidades y entidades de control ambiental para resaltar la importancia de los estudios realizados y motivar a que se realice un mayor número de estudios multidisciplinarios con el uso de biomarcadores en especial el test de micronúcleos para la evaluación y monitoreo ambiental de ecosistemas, con el fin de desarrollar estrategias para darle soluciones seguras, que ayuden a reducir el impacto ambiental generado por la actividades antrópicas.

*Palabras claves:* Genotóxico, Metales pesados, Micronúcleos, Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

## **Abstract**

In recent years, some of the causes of pollution in the world are anthropic activities, demographic and economic growth, generating various wastes among these heavy metals because of the combustion of fossil fuels, industrial, agricultural and natural processes. In aquatic ecosystems, heavy metals have received considerable attention due to their toxicity and bioaccumulation potential at various trophic levels and genotoxic biomarkers have been implemented in fish, such as the micronucleus test to evaluate the genetic instability induced by genotoxic agents such as metals heavy. In considering of the environmental problems by heavy metals in aquatic environments, the objective is to carry out a bibliographic review of studies that use genotoxic biomarkers in *Oreochromis niloticus* fish as indicators of contamination with heavy metals, concluding that fish are sentinels of genotoxicity because they provide information of water quality, due to its ability to accumulate pollutants and metabolize xenobiotics. The genus *Oreochromis*, is one of the most abundant and widely used in studies of mutagenicity, genotoxicity and carcinogenesis for its sensitivity. The micronucleus test is considered of great importance because it is universally validated, easily accessible and widely used to evaluate the genotoxic effect of exposure to heavy metals in fish by sensitivity, ease of execution, reading, low cost, effectiveness and accuracy. In most of the results of the studies reviewed, the frequency of micronuclei increases, being statistically significant in the fish exposed to metals with respect to the results of the control group or unexposed fish. It is necessary to make this review known to the communities and environmental control entities, to highlight the importance of the studies carried

out and to motivate a greater number of multidisciplinary studies with the use of biomarkers, especially the micronucleus test for evaluation and environmental monitoring of ecosystems, in order to develop strategies to provide safe solutions that help reduce the environmental impact generated by anthropogenic activities.

*Keywords:* Genotoxic, Heavy metals, Micronuclei, Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

## Índice general

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Índice general</b> .....	iv
<b>Índice figuras</b> .....	v
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 General.....	6
2.2 Especificos.....	6
<b>3. Cuerpo del trabajo</b> .....	7
<b>4. Conclusiones</b> .....	35
<b>5. Recomendaciones</b> .....	36
<b>6. Alcances</b> .....	37
<b>7. Bibliografía</b> .....	38

## Índice figuras

	Pág.
1. <b>Figura N°1.</b> Organismo de estudio: Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). 1x.....	25
2. <b>Figura N°2.</b> Eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de la Laguna de Sonso.100x.....	29
3. <b>Figura N°3.</b> Micronúcleos (Mn) observados en eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de la Laguna de Sonso.100x.....	29
4. <b>Figura N°4.</b> Eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de Río Patía.100x.....	29
5. <b>Figura N°5.</b> Micronúcleo (Mn) observado en eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de Río Patía.100x.....	30

## **Introducción**

El impacto sobre el medio natural creado por actividades antrópicas, el crecimiento demográfico y económico han tenido un fuerte detrimento en el ecosistema y su biodiversidad, esto se refleja en la transformación del paisaje, la fragmentación del hábitat, la pérdida de la biodiversidad con introducción de especies e incluso con la extinción de razas locales o especies enteras, la sobreexplotación de los recursos y la contaminación, además las causas consideradas indirectas como la débil capacidad institucional para reducir el impacto negativo que la expansión agrícola, industrial y minera como fuentes responsables del aporte de los metales pesados a las corrientes superficiales (Asoyotoco & Corporación Autónoma Regional, 2007; Gischler, 2005).

Los metales son elementos esenciales para las células de los organismos, algunos de ellos requeridos en pequeñas cantidades llamados “elementos traza”, entre los cuales se encuentra el plomo, el cadmio, el cromo, el mercurio, el zinc, el cobre, la plata, entre otros. Sin embargo, estos pueden ser tóxicos si se presentan en altas concentraciones para los seres vivos, organismos del suelo, plantas y animales (Spain & Alm, 2003).

La contaminación por metales pesados de los ecosistemas acuáticos ha sido reconocida como un serio problema. Todos los metales pesados son potencialmente perjudiciales para la mayoría de organismos en algunos niveles de adsorción y exposición (F. Yilmaz, 2009). Los metales pesados son muy contaminantes al no ser biodegradables, al ser bioacumulables en formas orgánicas e inorgánicas y permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo generando un impacto

dramático en los estuarios y zonas costeras cerradas, especialmente las cercanas a áreas altamente pobladas o industriales (Cáceres & Tello-Vallejo, 2009).

Los metales pesados pueden entrar en un estuario de fuentes naturales y antropogénicas, incluidas las aguas residuales industriales o domésticas, las aguas de lluvia, la lixiviación de los vertederos entre otras (Marcovecchio, 2004; A. B. Yilmaz, 2003), perturbando los ecosistemas y los organismos con efectos a corto plazo (tóxico) y efectos a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos).

Los biomarcadores son herramientas sensibles para medir los efectos biológicos en pruebas de calidad ambiental (Lam & Gray, 2003), se recomienda usar diferentes biomarcadores que permitan evaluar interdisciplinariamente cualquier tipo de daño causado en un individuo por contaminantes como los metales pesados (Kakkar & Jaffery, 2005).

Uno de los grupos que se utilizan como centinelas de genotoxicidad son los peces, que brindan información de la calidad de las aguas, por la capacidad de acumulación de contaminantes y metabolizar xenobióticos. Los peces representan el último nivel trófico de la cadena alimenticia acuática y reaccionan sensiblemente a cambios ambientales. El uso de peces en el estudio de la calidad del agua es ventajoso comparado con las pruebas in vivo tradicionales con mamíferos, porque ellos dependen del ambiente acuático donde ocurre la deposición significativa de contaminantes ambientales. Estos organismos son biomonitores de estrés o cambios ambientales que podrían afectar la diversidad genética de las poblaciones acuáticas. Las poblaciones sometidas a estrés ambiental son probables para tener una diversidad genética y un estado de salud disminuidos, siendo más susceptibles a efectos de cambios ambientales futuros (De Lemos, Rödel, Terra, De Oliveira, & Erdtmann, 2007).

En varios estudios se da especial atención a los peces como posibles monitores biológicos en muchos campos de la ciencia (Bolis, Piccolella, Dalla Valle, & Rankin, 2001) incluida la contaminación genotóxica (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Los primeros estudios realizados *in vivo* e *in situ* en sistemas ícticos, para evaluar efectos genotóxicos, teratogénicos de aguas contaminadas, demuestran lo ventajoso que resulta el uso de organismos acuáticos como los peces por la facilidad con que se adaptan y mantienen para detectar la polución acuática y determinar la actividad genotóxica de diferentes sustancias en ambientes acuáticos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Grisolia & Cordeiro, 2000; Hooftman & De Raat, 1982). Estos organismos responden a agentes tóxicos de forma similar a vertebrados superiores permitiendo la evaluación de sustancias que son potencialmente teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos para humanos. De Flora, Bagnasco, and Znacchi (1991), en una reseña de 53 páginas relatan los efectos de sustancias carcinogénicas en peces. Ellos concluyeron que los resultados obtenidos en peces son similares a los obtenidos en mamíferos en la metabolización de carcinógenos (De Lemos et al., 2007).

*Oreochromis* es el género que se escogió para esta revisión, por ser ampliamente usado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogénesis por su sensibilidad (Çava & Ergene-Gözükara, 2003). La tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* es de gran importancia, ya que el aprovechamiento de esta especie se centra principalmente en su tamaño y abundancia, apreciada para el consumo o comercialización de subsistencia (Axelrod et al., 1992). En Colombia, la tilapia (*O. niloticus*) fue introducida en 1979 por el Instituto Nacional de Desarrollo de los Recursos Renovables (INDERENA), mediante convenio con la AID - Auburn University, USA, procedente de Panamá y originaria de las Costas de Marfil (Rodríguez, 1981) y se convirtió en la especie de mayor importancia en la pesquería por encima de especies tradicionalmente importantes como el Bocachico. Su abundancia se atribuye principalmente a su resistencia a aguas anóxicas, amplia

tolerancia a la temperatura, amplitud en la dieta de acuerdo a la disponibilidad ambiental, pocos depredadores naturales, reproducción durante todo el año puesto que alcanza su madurez sexual a los tres meses, elevada fecundidad y protección de la prole (Royero & Lasso, 1992).

Se eligió para esta revisión como biomarcador genotóxico: el test de micronúcleos, que es considerada una prueba práctica, universalmente validada y de fácil acceso, para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos (Fenech, 2000). El test de micronúcleos en eritrocitos de branquia de peces es ampliamente empleada por la sensibilidad, facilidad de ejecución, lectura, bajo costo, efectividad y precisión (Hooftman & De Raat, 1982) en la evaluación del efecto genotóxico en aguas contaminadas. Los micronúcleos, son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear que se originan por roturas cromosómicas que pasan a las células hijas. Una de las causas es la exposición a agentes genotóxicos como los metales pesados (Cromo, Plomo y Mercurio), por esta razón es importante determinar lo que se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético, realizando ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria en poblaciones de riesgo. (Asoyotoco & Corporación Autónoma Regional, 2007; Hooftman & De Raat, 1982).

En Colombia existen pocos reportes de investigaciones sobre los efectos de los metales pesados en organismos como los peces, especialmente en Tilapia (*Oreochromis niloticus*), uno de estos es el trabajo realizado por Gischler (2005), en la laguna de Sonso, una reserva natural ubicada en el Municipio de Buga, en el Departamento del Valle del Cauca, que está siendo afectada por la gran actividad industrial (papel, textil, entre otras) y minera presente en sus alrededores, en este estudio se encontró que el mercurio y plomo en sedimentos no sobrepasan los estándares establecidos para los diferentes usos en el Decreto 1594/84 del Ministerio de Agricultura (límite para el Mercurio: 10-100ppm; Plomo 0,5-2,0ppm), mientras que el cromo supera la norma

establecida por la EPA (1-20ppm). Otro estudio en la misma localidad es el de Cáceres and Tello-Vallejo (2009), donde se utilizaron biomarcadores histopatológicos y genotóxicos con el test de micronúcleos para evaluar los efectos de la exposición a metales pesados en tilapia nilótica, los resultados encontrados se correlacionan significativamente con un mayor número de alteraciones tanto histopatológicas como genotóxicas en los individuos colectados Reserva de la Laguna de Sonso respecto con los colectados en el Río Patía.

En consideración a las razones anteriormente expuestas y con base a la problemática ambiental con los metales pesados en ambientes acuáticos, se hace necesario dar a conocer esta revisión a las comunidades y entidades de control ambiental para resaltar la importancia de los estudios realizados y motivar a que se realice un mayor número de estudios multidisciplinarios con el uso de biomarcadores en especial el test de micronúcleos para la evaluación y monitoreo ambiental de ecosistemas, con el fin de desarrollar estrategias para darle soluciones seguras, que ayuden a reducir el impacto ambiental generado por las actividades antrópicas.

## 2. Objetivos

### 2.1. General

Realizar una revisión bibliográfica de estudios que utilicen biomarcadores genotóxicos en peces como la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* como indicadores de contaminación de aguas con metales pesados.

### 2.2. Específicos

Resaltar la importancia del test de micronúcleos para evaluar del efecto genotóxico por exposición a metales pesados en peces.

Destacar en los estudios de revisión, como la frecuencia de micronúcleos se incrementa en los peces expuestos a metales.

### 3. Cuerpo del trabajo

Monografía: Biomarcadores genotóxicos en tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* como indicadores de contaminación de aguas por metales pesados

El crecimiento de la población humana y el desarrollo industrial han sido unas de las causas de contaminación alrededor del mundo durante los últimos años (Caussy, Gochfeld, Gurzau, Neagu, & Ruedel, 2003), estas han generado un impulso en el consumo de recursos y en la movilización, teniendo como consecuencia la generación de diversos desechos, incluyendo una variedad de contaminantes y elementos nocivos, plaguicidas y metales pesados, que en última instancia, afectaran el ambiente acuático con su entrada en él. Los metales pesados y sus derivados están ampliamente dispersos en el medio ambiente como resultado de la combustión de combustibles fósiles, procesos industriales, agrícolas y naturales. Entre la gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas liberadas en los ecosistemas acuáticos, los metales pesados han recibido considerable atención debido a su toxicidad y potencial de bioacumulación a diversos niveles tróficos (Blevins & Pancorbo, 1986; Szefer, Szefer, & Skwarzec, 1990).

Los metales, son componentes naturales presentes en los ecosistemas e indispensables para los procesos bioquímicos y fisiológicos en los seres vivos (Barbosa, Cabral, Ferreira, Agnez-Lima, & de Medeiros, 2010), sin embargo, existe el grupo de los metales pesados que comprende los elementos entre el número atómico 21 (Escandio) y 84 (Polonio) a excepción el aluminio con número atómico 13, calificados como potencialmente tóxicos para los seres vivos (Gischler, 2005), ya que se tiene información donde afirman que aún a bajas concentraciones, tienen la habilidad de

ser tóxicos y perjudiciales (Braunbeck, 1998; Giari, Simoni, Manera, & Dezfuli, 2008; Thophon et al., 2003) y muchos de estos metales a altas concentraciones pueden tener efectos adversos sobre la salud (Barbosa et al., 2010).

De todos los contaminantes metálicos el mercurio se considera el más tóxico, es un metal pesado conocido por su insolubilidad en agua y solubilidad en ácido nítrico, cuando aumenta su temperatura produce vapores tóxicos y corrosivos, más pesados que el aire, es dañino por inhalación, ingestión y contacto, además la exposición prolongada o repetida puede provocar lesiones en riñones, cerebro y sistema nervioso (Eschborn, 1996). El nivel de acumulación del mercurio depende de la edad, talla y nivel trófico (Zhang & Wong, 2007). Por ello, organizaciones como la Environmental Protection Agency (1999), establece la dosis de referencia (RfD) para el consumo de alimentos contaminados o expuestos al Mercurio ( $0,1 \mu\text{g} (\text{Kg bw})$ ). La contaminación por mercurio en ecosistemas acuáticos ha recibido gran importancia desde el desastre biológico en la ciudad de Minamata en Japón 1956 causado por vertimiento de grandes cantidades de mercurio desechos de una Industria de la Corporación Chisso a una bahía cercana y ahora con el crecimiento industrial y el alto uso de este metal en las mismas, ha desencadenado problemas de impacto ambiental por la expulsión del mercurio en forma orgánica (Arribere et al., 2003; Raldúa, Díez, Bayona, & Barceló, 2007). El cloruro mercúrico es el más utilizado entre todos los compuestos de mercurio. Es un compuesto cristalino blanco venenoso, usado como un ingrediente confiable en antisépticos, desinfectantes y conservantes, insecticidas, baterías y en operaciones metalúrgicas y fotográficas (Freeman, Shupe, Vlosky, & Barnes, 2003; Goldberg, 1996). Vale la pena aclarar que en ecosistemas acuáticos parte del mercurio inorgánico puede ser microbiológicamente convertido en metilmercurio y luego ser tomado por organismos acuáticos (Raldúa et al., 2007; Spry &

Wiener, 1991) y posteriormente ser bioacumulado, desencadenando alteraciones tanto a nivel genético como histológico.

El plomo es muy utilizado en la industria (óxidos de plomo, el tetraetilo de plomo y los silicatos de plomo), forma aleaciones con muchos metales, y, en general, se emplea en esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones. Es tóxico en forma de  $Pb^{+2}$  y produce envenenamiento por su uso inadecuado y mala manipulación, y por una exposición excesiva a los mismos. El plomo no cumple ninguna función esencial en el cuerpo humano, este puede principalmente hacer daño después de ser tomado en la comida, aire o agua, siendo capaz de causar varios efectos no deseados en cierto tipo de individuos, como son: perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia, incremento de la presión sanguínea o taquicardia, daño a los riñones y en el sistema urinario, entre otras (Eschborn, 1996). Específicamente, el plomo inhibe o inactiva enzimas por unión al grupo sulfidrilo de las mismas (Gwaltney-Brant, 2002). La EEC, European Economic Community (2001) estableció, que se pueden consumir peces con concentraciones menores a 0,2 mg/Kg bw.

El cromo es tóxico en sus estados de oxidación III y VI, produce incorrecto intercambio entre cromátidas hermanas, reacciones alérgicas (erupciones cutáneas), debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, otras alteraciones del material genético, cáncer de pulmón y muerte, entre otras. Hasta el momento no se conoce cómo el Cromo se acumula en los peces, pero altas concentraciones del mismo pueden ocasionar daños a las branquias de los peces que nadan cerca del punto de vertido (Eschborn, 1996).

Los metales pesados también se pueden acumular en la flora y fauna acuática. El principal medio de transporte de los metales en las aguas es a través de los sedimentos como los sólidos suspendidos (Cantera & Blanco, 2001; Peña, Cantera, & Palacios, 2001). La persistencia de

metales en el medio ambiente al igual que otros contaminantes metálicos, es desfavorable para la flora y fauna, con repercusiones indeseables para los humanos. De igual manera se manifiesta en los sistemas acuáticos, debido a que en algunos casos las reacciones de estos elementos desencadenan formas más tóxicas del metal (Haapala, 1998; Silverberg, 1975), reflejándose en la biomagnificación de estos contaminantes en la cadena trófica (Arkhipchuk & Garanko, 2005).

En el medio acuático, los contaminantes sufren procesos de transformación que alteran de una u otra manera su capacidad tóxica, a saber: a) químicos y físicos, por adsorción en el material suspendido, intercambio iónico, floculación y precipitación al ambiente sedimentario, que constituye así un depósito importante del ambiente acuático y b) biológicos, por asimilación en la biota local, como plancton y peces, y en última instancia al ser transferidos a organismos superiores, como aves acuáticas y el hombre. La presencia de metales tóxicos puede llevar a riesgos en la salud de vertebrados superiores y por último en humanos después del consumo de peces y puede ser directamente adquirido solo por la ingestión (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Por lo tanto, la detección temprana de elevadas concentraciones de estos contaminantes en los cuerpos de agua como ríos o lagos es de vital importancia para su conservación (Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri, & Koehler, 2007).

Gutierrez, González, Díaz, y Ortega (2003) definen el término de biomarcador como una alteración bioquímica o fisiológica detectable, o una manifestación celular ocasionada por estrés ambiental. Estos autores proponen que cualquier sistema celular el cual experimenta una alteración fisiológica detectable bajo la influencia de un contaminante o estrés ambiental puede ser considerado como un biomarcador celular y las moléculas involucradas en esta alteración o cambio fisiológico pueden ser consideradas biomarcadores moleculares. Además, afirman que: los biomarcadores pueden ser indicadores bioquímicos, histológicos y fisiológicos, tienen alta

sensibilidad y especificidad en nivel molecular y citológico y sus respuestas pueden servir como alarma temprana para un previo estrés por daño fisiológico o impacto ambiental.

Los biomarcadores son medidas sensibles a nivel molecular y celular de organización biológica, ya que en estos niveles ocurre la interacción inicial de los contaminantes con los organismos, sirviendo como señales de alarma temprana de efectos en individuo, población o ecosistema y se propone el uso de estos marcadores biológicos para medir la calidad ambiental (Elahee & Bhagwant, 2007; Kakkar & Jaffery, 2005; Raldúa et al., 2007). Para que los efectos de los contaminantes sean evidentes en el ecosistema, el primer nivel de interacción es el molecular–celular. Este nivel de organización es además el ideal para estudiar relaciones causa-efecto y los mecanismos de acción de los contaminantes (Kakkar & Jaffery, 2005).

El uso de biomarcadores ayuda en la identificación de la relación causal entre la exposición a contaminantes tóxicos y el riesgo, incrementado de efectos en individuos y poblaciones que pueden indicar la disminución de la integridad ecológica (Bolognesi, Perrone, Roggieri, Pampanin, & Sciutto, 2006). Los biomarcadores han sido ampliamente utilizados para evaluar los efectos biológicos en la evaluación de calidad ambiental (Lam & Gray, 2003). Cajaraville et al. (2000) proponen el uso de biomarcadores para evaluar el impacto de la contaminación ambiental por contaminantes como metales, xenobióticos, y componentes organometálicos, teniendo en cuenta biomarcadores como la inducción de metalotioneinas, inhibición de la acetilcolinesterasa, inducción de citocromo P450, desestabilización de la membrana lisosomal y proliferación de peroxisomas. Los organismos que tuvo en cuenta para su estudio fueron *Nucella lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Nassarius reticulatus*, *Murex (Hexaplex) trunculus*, *Thaishaemastoma* y *Bolinus bryaris*, encontrando resultados positivos en cuanto a los efectos de contaminantes.

Autores como Kakkar y Jaffery (2005) y Viarengo et al. (2007) hicieron énfasis en los biomarcadores como herramientas indispensables en la identificación de exposición a tóxicos como los metales pesados, dando a conocer algunos de los efectos en la salud humana de metales como el plomo, cromo, cadmio, arsénico y mercurio. Además, de las ventajas de usar diferentes biomarcadores en la obtención de resultados más precisos.

Existen diferentes tipos de biomarcadores, entre estos, los biomarcadores genotóxicos que son herramientas para la detección de exposición y los efectos de la contaminación genotóxica en organismos acuáticos (Arkhipchuk, Malinovskaya, & Garanko, 2000; Bombail, Aw, Gordon, & Batty, 2001). Rank, Lehtonen, Strand, y Laursen (2007), estudiaron biomarcadores de genotoxicidad (daño en el ADN, por ensayo Cometa), neurotoxicidad (inhibición de acetilcolinesterasa) y estrés general (estabilidad de membrana lisosomal) en mejillones nativos y trasplantados (*Mytilus edulis*) en las zonas costeras de Dinamarca occidental potencialmente afectadas por la contaminación antropogénica procedente de vertederos de productos químicos. Los resultados indican respuestas a la contaminación en todos los biomarcadores aplicados en las áreas sospechosas.

El test genotóxico de micronúcleos, es comúnmente utilizada para evaluar alteraciones estructurales y numéricas cromosomales inducidas por agentes clastogénicos y aneugénicos, ha sido una herramienta eficiente para estudiar la citotoxicidad en los últimos 20 años (Heddle et al., 1991).

Los micronúcleos, se originan cuando los fragmentos del cromosoma o cromosomas enteros se retrasan en anafase porque ellos carecen de un centrómero, o porque el centrómero es defectuoso, o hay un defecto en el mecanismo que permite que los cromosomas se distribuyan correctamente hacia los polos de la célula en esta fase, estos se recubren por una membrana en la etapa siguiente (telofase) y en la citocinesis, el micronúcleo es expresado en una de las células hijas. Al ser teñidos adquieren la misma coloración azul con el Giemsa que el núcleo, por su condición acidófila. Por esta razón los micronúcleos se registran en células interfásicas. Los criterios para la identificación de eritrocitos micronucleados son los siguientes: (a) el micronúcleo debe ser más pequeño que un cuarto del núcleo principal, (b) el micronúcleo no debe tocar el núcleo principal, (c) el micronúcleo no debe ser refractivo y debe ser del mismo color e intensidad que el núcleo principal (Fenech et al., 2003; Grisolia, 2002).

Esta prueba para el biomonitorio de la calidad del agua, en la comunidad científica tiene gran aceptación por las ventajas que presenta como: sensibilidad, porque responde a bajas concentraciones de diferentes sustancias; confiabilidad debido a que la prueba es respaldada por varios estudios; económica porque se utilizan pocos reactivos y presenta una gran facilidad para desarrollarla (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Ergene, Çava , Çelik, Köleli, Kaya, et al., 2007; Udriou, 2006).

Los animales acuáticos han sido frecuentemente utilizados en los bioensayos para monitorear la calidad del agua (Belfiore & Anderson, 2001; Brungs et al., 1977; Cairns Jr, Dickson, & Westlake, 1975) y el test de micronúcleos ha sido ampliamente utilizada para biomonitorio de áreas silvestres con diferentes niveles de contaminación in situ (Zeng, Li, & Lin, 1999), utilizando especies marcadores una variedad de organismos desde mejillones (Mersch & Beauvais, 1997; Venier, Maron, & Canova, 1997), a peces (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Çava & Ergene-Gözükara,

2005; Palhares & Grisolia, 2002) y anfibios (Fernandez, L'Haridon, Gauthier, & Zoll-Moreux, 1993). En ecosistemas acuáticos de agua dulce (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Ergene, Çava , Çelik, Köleli, Kaya, et al., 2007; Udroi, 2006) como en ríos (De Flora et al., 1993; Lemos, 1998; Minissi, Ciccotti, & Rizzoni, 1996; Viganò et al., 2002), lagos (Grisolia & Starling, 2001), y en ecosistemas de agua marina (De Flora et al., 1991), mostrando la sensibilidad de este sistema biológico (Carrasco, Tilbury, & Myers, 1990; Hayashi et al., 1998; Hose, Cross, Smith, & Diehl, 1987; Minissi et al., 1996; Rodriguez-Cea, Ayllon, & Garcia-Vazquez, 2003; Sanchez-Galan, Linde, Ayllon, & Garcia-Vazquez, 2001).

Esta prueba originalmente se desarrolló para su aplicación en ratones pero Hooftman y De Raat (1982), la modificaron para su aplicación en peces, siendo los primeros investigadores en utilizar eritrocitos de sangre periférica de peces bajo condiciones de laboratorio. Los autores relatan la inducción de micronúcleos en los eritrocitos de la sangre periférica de *Umbra pygmaea* por el compuesto genotóxico etil metanosulfonato. La exposición al compuesto dio lugar a segmentos nucleares parecidos a las partículas encontradas en los test de micronúcleos de mamíferos, pero también a estructuras Feulgen-positivas en el citoplasma. Por lo que sus autores recomiendan estudios adicionales con eritrocitos de peces para investigar si el monitoreo de anomalías nucleares es un método adecuado y rápido para la detección de compuestos genotóxicos en el medio acuático.

El test de micronúcleos ha sido ampliamente usada en peces, analizada en diferentes tipos de células tales como eritrocitos de sangre periférica, branquia, riñón, células hepáticas y de aleta (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Arkhipchuk & Garanko, 2005; Hayashi et al., 1998), porque representan el último nivel trófico en la cadena alimenticia acuática y reaccionan sensiblemente a los cambios ambientales dados por la descarga significativa de contaminantes en el agua, actuando como

organismos biomonitores de estrés o cambios ambientales acuáticos (Arkhipchuk & Garanko, 2005; Deguchi et al., 2007; Ergene, Çava , Çelik, Köleli, & Aymak, 2007; Sanchez-Galan, Linde, Izquierdo, & Garcia-Vázquez, 1998; Viarengo et al., 2007) y para el monitoreo genotóxico de contaminantes ambientales acuáticos (Farah, Ateeq, Ali, & Ahmad, 2003)

La revisión de Bolis et al. (2001) muestra que hay muchos campos científicos que usan peces como organismos centinelas en modelos en la investigación respiratoria y cardiovascular, de cultivo celular, ecotoxicología, farmacología, genética, entre otros campos.

Evans (1987), realizó una breve revisión sobre la branquia de peces como el sitio de acción y modelo de los efectos de los contaminantes ambientales usando el pez *Opsanus beta* y encontró que el epitelio branquial al ser el sitio del intercambio gaseoso, la regulación iónica, el equilibrio ácido-base y la excreción de desechos nitrogenados por los peces, es afectado por contaminantes ambientales como los metales pesados, la lluvia ácida y los xenobióticos, al alterar la morfología del epitelio branquial se asocian cambios en los niveles iónicos de la sangre, así como la actividad ATPasa activada por Sodio-Potasio y flujos iónicos, además afectan las etapas de transporte epitelial en el modelo de branquias de pescado que se asemejan a las descritas en el intestino y el riñón de humanos.

Manna y Sadhukhan (1986), detectaron células micronucleadas de branquias y riñón en tilapia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) tratados con rayos X y dos sustancias químicas (Cloruro de Cadmio y Glucosamina) evaluando que las células de las branquias parecían ser más sensibles a los rayos X y el cloruro de cadmio que las células de los riñones y los eritrocitos. El número de micronúcleos encontrados en las branquias de los peces tratados con rayos X y glucosamina fue

igual a uno y en algunos casos mayores que uno, comparado con los encontrados en el riñón. El test de micronúcleos en estas células reveló la sensibilidad diferencial a la radio y la quimioterapia.

Das y Nanda (1986), en su estudio sobre el monitoreo biológico de los genotóxicos ambientales, analizaron la incidencia de micronúcleos en eritrocitos periféricos de pez gato (*Heteropneustes fossilis*) tratados con Mitomicina C (MMC) y efluentes de fábricas de papel. Los autores utilizaron extendido de sangre periférica, para evaluar la utilidad de la prueba de micronúcleos y obtuvieron como resultado un incremento en las frecuencias de micronúcleos a medida que aumentaban las concentraciones detectando el efecto genotóxico de efluente de fábricas de papel en un sistema de vertebrados.

Hose et al. (1987), en un estudio *in situ* investigaron la genotoxicidad de hidrocarburos clorinados: Diclorodifeniltricloroetano (DDT) y Policlorobifenilos (PCB) en eritrocitos de corvina blanca (*Genyonemus lineatus*) y de cabrilla sargacera (*Paralabrax clathratus*) de áreas contaminadas de California del Sur, Estados Unidos. Las frecuencias de micronúcleos de los sitios contaminados fueron cuatro veces más altas en la corvina blanca y once veces más altas en la cabrilla sargacera que las áreas menos contaminadas. El aumento de la frecuencia de los micronúcleos se relacionó con concentraciones ambientales de los hidrocarburos clorados y metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Al-Sabti y Hardig (1990), probaron la inducción de micronúcleos en eritrocitos de Perca (*Perca Fluviatilis* L.) expuesta a desechos industriales de la fábrica de pulpa en el Mar Báltico, Suecia. Los peces fueron colectados a 2 km (Estación 1), 4,5 km (Estación 2) y 8 km (Estación 3) de los puntos de descarga de desechos. Los resultados de esta investigación mostraron una

disminución en la frecuencia de micronúcleos con el incremento en la distancia de las estaciones de muestreo de los puntos de descarga.

En 1993, De Flora et al, publicaron los resultados de un estudio donde fueron analizados múltiples biomarcadores genotóxicos en peces expuestos in situ a la contaminación en agua de río. Los investigadores emplearon trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en acuarios bajo condiciones de laboratorio o enjauladas en el río Po, aguas arriba y abajo del Río Lambro (Lombardía, Italia), considerado un afluente muy contaminado. Los biomarcadores genotóxicos encontraron que los extractos biliares contenían mutagénicos que requerían activación metabólica, con una prevalencia de componentes liposolubles después de una exposición corta; las monooxigenasas fueron mejoradas en las fracciones microsomales de hígado y el daño citogenético se manifestó por un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de 0.3% a 1.1%. Se demostró por significativa aparición de alteraciones biológicas tempranas en los peces enjaulados en aguas abajo, que el afluente contaminado era responsable del transporte de dosis subletales de agentes genotóxicos y de inductores enzimáticos.

Los efectos genotóxicos de bajas concentraciones de Mercurio  $Hg^{+2}$ , Selenio VI, Cloruro de metilmercurio ( $CH_3HgCl$ ) por separados o juntos, fueron analizados por Al-Sabti (1994), en una prueba *in vitro* con eritrocitos binucleados de Carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*), se utilizó citocalasina para bloquear la citocinesis, en los resultados se mostró que las frecuencia de micronúcleos se elevaron de forma dependiente de las dosis en todos los tratamientos comparados con los controles.

Al-Sabti y Metcalfe (1995), realizaron una revisión de la literatura sobre los efectos clastogénicos de agentes químicos y físicos en células de peces con énfasis en la inducción de micronúcleos en teleósteos. Incluyeron una descripción de los mecanismos para la formación de micronúcleos en las células y el resumen de las diversas técnicas que se han utilizado para el análisis de micronúcleos en peces, demostrando que los ensayos de micronúcleos con peces son útiles en técnicas in vivo para pruebas de genotoxicidad y muestran potencial para el monitoreo in situ de la calidad del agua.

Con el objetivo de evaluar el test de micronúcleos para la detección in situ de mutágenos en aguas dulces Minissi et al. (1996), emplearon eritrocitos del peces Barbo (*Barbas perplejus*) de los ríos Mignone y Tiber en Italia, con diferentes niveles de contaminación con muestreos en diferentes épocas del año. Los resultados muestran una mayor frecuencia significativa de micronúcleos en peces capturados en el río contaminado (Tiber), en comparación con los controles y los peces del río Mignone; no se observan diferencias significativas en las frecuencias de micronúcleos entre el grupo control y los peces del río no contaminado (Mignone), ni diferencias significativas entre las épocas de muestreo.

Para el biomonitoreo en ecosistemas de agua dulce Sanchez, Speare, y Johnson (1997), utilizaron como métodos complementarios el test de micronúcleos en eritrocitos renales y la asimetría fluctuante en Salmón (*Salmo trutta*) capturados en ecosistemas fluviales de Asturias (Norte de España) con diferentes niveles de influencia antrópica. Los resultados de los promedios de micronúcleos y asimetría fluctuante eran significativamente más altos en los salmones de ríos con alta influencia antrópica que los salmones de ríos menos antrópicos.

Russo, Rocco, Morescalchi, y Stingo (2004), señalan una fuerte acción genotóxica de la mezcla de contaminantes presentes en el río Río Sarno en Campania (Italia). Mediante la prueba de micronúcleos y el ensayo cometa en eritrocitos, probaron el daño biológico causado por la exposición de *Gambusia holbrooki* a diversos agentes mutagénicos nitratos y metales pesados (Cromo, Cadmio y Plomo) presentes en las aguas contaminadas de este río. Usando como control negativo peces colectados de aguas del cráter de la Reserva Natural de Astroni (Nápoles, Italia), los resultados indicaron unos valores estadísticamente más altos tanto para el test de micronúcleos, como para el ensayo cometa.

Porto, Araujo, y Feldberg (2005), estudiaron tres especies de peces amazónicos (*Prochilodus nigricans* (dentívoros), *Mylossoma duriventris* (omnívoros) y *Hoplias malabaricus* (piscívoros) del Río Madeira, Brasil (considerada área contaminada por mercurio). Realizaron prueba de micronúcleos para determinar los efectos mutagénicos de la contaminación. Los resultados indicaron que las frecuencias medias de micronúcleos observados en las especies anteriores fueron de 0.038%, 0.037% y 0.18%, respectivamente, siendo significativamente más altas que las frecuencias encontradas en el grupo control: peces del río Solimoes, considerada área no contaminada (*P. nigricans*: 0.01%, *M. duriventris*: 0.01% y *H. malabaricus* 0.006%).

Has-Schön, Bogut, y Strelec (2006) realizaron una investigación sobre la concentración de metales pesados como el mercurio, plomo, cadmio y arsénico en cinco especies de peces (*Cyprinus Carpio*, *Tinca tinca*, *Leuciscus svallizi*, *Mugil cephalus* y *Anguilla anguilla*) del Río Neretva (Croacia) incluidos en la dieta humana, por medio de la espectrofotometría de absorción atómica en órganos como el músculo, riñón, hígado y branquia, concluyendo que por lo general la parte consumida del pez (músculo) contiene menos cantidad de metales que los otros órganos estudiados.

Talapatra y Banerjee (2007), para la determinación de los efectos genotóxicos, analizaron los eritrocitos de branquia y riñón para la detección de micronúcleos y anomalías nucleares en la especie *Labeo bata*, criada en las piscícolas alimentadas con aguas residuales de los humedales del Este de Calcuta. Se obtuvieron valores altamente significativos tanto para las frecuencias de micronúcleos en la branquia y riñón ( $P < 0.001$ ), como en las frecuencias de anomalías nucleares tales como: células necróticas, células apoptóticas y células binucleadas ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) de los peces experimentales comparados con el grupo control. Estos resultados confirman que aguas residuales contienen metales genotóxicos como Cr, Zn, Cu, Pb, Mn, Fe, por el uso directo de aguas residuales sin pre-tratamiento.

Para evaluar el potencial tóxico de los tres metales pesados (mercurio, arsénico y cobre), en los peces *Channa punctata*, Yadav y Trivedi (2009), encontraron un aumento significativo por encima de control negativo en la frecuencia de micronúcleos en los peces expuestos a compuestos metálicos. La frecuencia media de micronúcleos en los peces expuestos a Hg fue de 9.79; a As fue de 12.03 y a Cu fue de 8.86. Se revela que el orden de la inducción de la frecuencia de micronúcleos y la toxicidad fue  $As > Hg > Cu$ . Los resultados muestran potencial genotóxico de estos compuestos metálicos incluso en concentraciones subletales.

Monteiro, Cavalcante, Viléla, Sofia, y Martinez (2011), estudiaron la exposición *in vivo* e *in vitro* para la evaluación de los efectos genotóxicos del plomo en peces de agua dulce *Prochilodus lineatus* con el ensayo de cometa, el test de micronúcleos (Mn) y otras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE). Los resultados del ensayo de cometa *in vivo* e *in vitro* mostraron un aumento significativo en el daño del ADN en las células sanguíneas ( $p < 0.001$ ) y en las células hepáticas ( $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo control mostrando la genotoxicidad del plomo; la frecuencia de Mn no aumentó después de la exposición a Pb por la baja sensibilidad del test de

micronúcleos y la frecuencia de ANE mostró un aumento significativo, indicando que ANE son un mejor biomarcador para la exposición a Pb que la prueba de Mn sola, después de exposiciones a corto plazo. Los resultados en general demuestran el potencial de genotoxicidad y citotoxicidad de plomo al mostrar el aumento de daño del ADN después de exposiciones agudas a mayor tiempo.

El test de micronúcleos Gutiérrez, Villar, y Plavan (2015), la aplicaron para evaluar el daño genético en peces de tres sub-estuarios del Río de la Plata (Uruguay): Pando (Área más impactada, principalmente por los insumos de alcantarillado, efluentes industriales y residuos sólidos), Solís Chico y Solís Grande (Áreas de control, sin actividades industriales y bajo impacto antrópico). Esta prueba reveló que los niveles más altos de micronúcleos en Pando son consistentes con la alta contaminación del sub-estuario y la inadecuada planificación del saneamiento y manejo de efluentes y la ausencia de micronúcleos en los cambios estacionales en Pando, podría explicarse por las características físicas del sub-estuario y por las condiciones climáticas regionales.

La determinación de los efectos a la exposición subcronica de cobre en el pez gordo (*Centropomus parallelus*) de agua dulce adquiridos de una piscícola privada ubicada en São Mateus, Espírito Santo, Brasil por Oss, Kampke, Chippari-Gomes, y Gomes (2016), determinó que los peces expuestos al cobre presentaron una menor tasa de crecimiento, los autores concluyeron que esto se debe al mayor consumo de energía por los mecanismos de detoxificación. La frecuencia de micronúcleos en peces expuestos fue significativamente mayor que en los peces control, esto puede ser por la interacción del ion cobre con las moléculas oxidantes presentes en el organismo.

Ferrante et al. (2017), estudiaron la bioacumulación de metales, biomarcadores de estrés ambiental (Prueba micronúcleos y anomalías nucleares) y la variación genética neutral (Secuencias de la región de control del mtDNA), en una especie de peces teleósteos bentónicos *Parablennius sanguinolentus*, muestreados en varios sitios costeros italianos con diferentes grados de presión antropogénica. Encontraron una correlación clara y significativa de la bioacumulación de metales con micronúcleos y anomalías nucleares, especialmente con metales genotóxicos como: Cd, Cr, Hg y Pb y el análisis genético molecular, reveló una disminución de la variabilidad genética en las poblaciones sometidas a más presión antrópica. Los resultados obtenidos se relacionan con la contaminación crónica desde hace varios años por la variabilidad de la presión humana y /o insumos naturales que aportan los metales a las áreas estudiadas.

Se informa sobre el daño genético empleando el test de micronúcleos y el ensayo de cometa, y las concentraciones de metales traza e hidrocarburos totales de petróleo en el pez *Arius arius*, distribuido a lo largo de la costa de Goa, India. Se registraron en los parámetros físico-químicos concentraciones de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) y metales traza en el agua y sedimentos, así como los tejidos de peces recolectados de estos sitios. Se observó una correlación positiva ( $p < 0.001$ ) entre el ADN en cola del ensayo cometa y la frecuencia de micronúcleos en todos los peces expuestos. Los resultados demuestran que los metales traza, especialmente el Fe, el Mn, el Cd y el Pb, y los HTPs contaminan tanto el agua como los sedimentos y la exposición a largo plazo a concentraciones bajas de estos genotoxicantes en el agua podrían ser causa de genotoxicidad en *A. arius* (D'Costa, Shyama, & Praveen Kumar, 2017).

*Oreochromis niloticus* por su amplia distribución, abundancia, resistencia a la contaminación, buena respuesta a químicos en los ambientes acuáticos y su relativa importancia estacionaria, territorial y comercial, es considerada una buena candidata para usarla como una especie centinela

en programas de monitoreo para evaluar efectos de contaminación por descargas industriales, desechos urbanos no tratados y pesticidas (Linde-Arias, Inácio, de Albuquerque, Freire, & Moreira, 2008) por exposición a efluentes de fábrica de papel (Çava & Ergene-Gözükara, 2003), a efluentes de una refinería de petróleo y planta de procesamiento de cromo (Çava & Ergene-Gözükara, 2005).

La tilapia nilótica, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766), es un cíclido ampliamente distribuido desde Siria, y a través de Egipto a todo el este y occidente de África por la cuenca del río Congo (Sterba 1966), desde donde ha sido llevada a muchas otras regiones del trópico en Centroamérica, Suramérica, sur de Estados Unidos, Indonesia, Tailandia, China, Taiwán, Asia suroriental, Israel, India. *O. niloticus*, también se le conoce con los sinónimos *Tilapia nilótica* y en Colombia se le conoce comúnmente además como mojarra plateada. Esta fue introducida Colombia en 1979, por el entonces Instituto Nacional de Desarrollo de los Recursos Renovables (INDERENA), mediante convenio con la AID-Auburn University, USA, procedente de Panamá y originaria de las Costas de Marfil (Rodríguez, 1981).

Trewavas (1983), realizó la siguiente descripción de esta especie: en la parte inferior del primer arco branquial con (18-19) (20- 26) (27-28) branquiespinas; 30-34 escamas en la línea lateral, usualmente 31-33; altura del hueso pre orbital no sobrepasa el 22% de la longitud de la cabeza; longitud de la mandíbula inferior 29- 35 (37.5) por ciento de la longitud de la cabeza; aleta caudal con bandas regulares y definidas verticalmente, las cuales son el mejor diagnóstico de la especie. Cuerpo elongado, un tanto alto y comprimido, perfiles superior e inferior casi igualmente convexos; coloración muy variable, en los flancos con una coloración gris plata opaca y un viso violeta claro, costado blanco plata a suavemente rojizo, varias bandas transversas, no muy distinguibles en peces viejos especialmente. Unas manchas negras bien delineadas en el opérculo;

aletas pares verticales de color café claro a café rojizo y usualmente bordeado con rojo brillante; aleta caudal con bandas angostas verticales, la margen superior de la aleta dorsal es negra a gris. Algunas veces la melanina se mezcla con un rojo suave, en época de reproducción. La cabeza y el tronco de los machos en reproducción se tiñen de rojo oscuro, en algunas partes por debajo de la mandíbula, pecho, aletas pélvicas y la parte anterior de la aleta anal, así como la garganta. Las aletas pectorales, y algunas veces también las ventrales, toman un color rojo oscuro. Los ojos con un fino borde color oro en la pupila. Las hembras son más pequeñas y menos intensamente coloreadas, solo durante la época de reproducción la garganta es suavemente más roja. El dimorfismo sexual secundario de la tilapia nilótica consiste en que la hembra presenta tres orificios urogenitales (ano, poros genital y urinario), en tanto que el macho solo presenta el ano y el poro urogenital.

La tilapia nilótica, es un pez adaptable a diferentes condiciones ecológicas. Vive en ambientes loticos, pero preferiblemente lenticos, con gran éxito en los últimos; es tolerante a altas salinidades, se reproduce en salinidades de 29 partes por mil y sobrevive a 35 por mil. Temperaturas por debajo de los 12°C son letales, tolera 8°C por 3 o 4 horas; sobrevive por largos periodos a 15°C, a 42°C mueren. Desova 5 a 7 veces al año entre 22 y 24 °C. Su crecimiento óptimo ocurre alrededor de los 28°C. Se adapta a fuertes cambios de oxígeno disuelto en el agua , niveles por debajo de 3 ppm los soporta sin mayores consecuencias, incluso llega a tolerar periodos largos en aguas hipóxicas alternantes con anoxia donde su crecimiento es nulo (Gómez & Rico, 1990).

Según Cala y Bernal (1997), este pez como muchos otros cíclicos, se reproduce en cautiverio y tiene cuidado parental de sus crías. Para la reproducción en ambiente natural, el macho construye un nido de unos 40 a 60 cm de diámetro en promedio en el fondo del estanque o hacia

el litoral del embalse, mediante el movimiento de sus aletas pectorales, ventrales y de su boca. Una vez termina busca una hembra en celo y la atrae al centro del hueco, colaborando en el desove por medio de golpes con su hocico en la región abdominal de la hembra. Luego el macho los fecunda y la hembra recoge los huevos en su boca y abandona el nido. El macho busca otra hembra, llegando a aparearse con tres o más durante este periodo reproductivo. También, esta tilapia se reproduce en cautiverio en estanques de cemento, buscando alguna orilla sombreada en el estanque. La hembra incuba los huevos en la boca y mantiene las larvas allí hasta la reabsorción del saco vitelino, Este cuidado parental puede durar hasta ocho días con el fin de proteger a las crías frente a la depredación de otros organismos acuáticos. Esto, junto con su precoz reproducción antes de los seis meses, y al hecho de desovar los mismos peces varias veces (5-7) al año, permite su fácil incremento en los sistemas lenticos como ciénagas, embalses y estanques.



**Figura N°1.** Organismo de estudio: Tilapia (*Oreochromis niloticus*). 1x. Tomado de Cáceres y Tello-Vallejo (2009)

La especie *O. niloticus* objeto de esta revisión ha resultado ser una especie útil centinela para probar los efectos de contaminación en sistemas acuáticos (Linde-Arias et al., 2008), puede ser una alerta de salud pública y estableciendo el riesgo potencial en el hombre, que en muchas ocasiones puede conllevar al desarrollo de enfermedades como el cáncer, por la ingesta de los peces, convirtiéndose en una de las rutas de exposición de las poblaciones humanas a contaminantes como los metales pesados (Hooftman & De Raat, 1982). A continuación, se presentan el análisis las investigaciones con *O. niloticus* que muestran en sus resultados frecuencias de micronúcleos en los sitios contaminados significativamente más altas que las frecuencias de las mismas especies de los controles negativos o sitios no contaminados.

En 2002 (Palhares & Grisolia), realizaron una comparación entre la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos de riñón y branquia en Tilapia herbívora (*Tilapia rendalli*) y Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con tratamientos de mitomicina C y ciclofosfamida. Los tratamientos indujeron altas frecuencias de micronúcleos en ambas especies, sin embargo, no se encontraron diferencias entre las frecuencias de micronúcleos entre los eritrocitos de riñón y branquias, esto puede asociarse a que los eritrocitos periféricos circulantes también sufren mitosis. En *T. rendalli*, se observaron niveles más altos de eritrocitos micronucleados y un gran número de deformidades nucleares que indicaban citotoxicidad, estos no fueron observados en células de *O. niloticus*. Esto se puede dar por la farmacocinética de los fármacos utilizados y la velocidad del ciclo hematopoyético.

La investigación de los efectos citogenotóxicos de efluentes de industrias textiles en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), mediante el test de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica y células branquiales, anomalías nucleares y las regiones organizadoras nucleares teñidas con plata interfásica en las células epiteliales de aletas caudales, realizada por Çava y

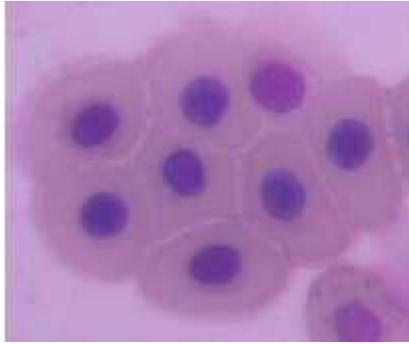
Ergene-Gözükara (2003), determinó un incremento significativo dependientes de las tres concentraciones, en la frecuencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares como binúcleos, núcleos lobulados, núcleos burbujeados y núcleos dentados tanto en eritrocitos periféricos como en células branquiales y el parámetro de las las células de la aleta disminuyó, como resultado de los tratamientos de efluentes textiles y ciclofosfamida. En este mismo año, en la Universidad del Cauca (Muñoz & Guerrero), realizaron la inducción de micronúcleos in vivo en eritrocitos de branquias de *Oreochromis niloticus* por efecto de Roundup, encontrando que el número promedio de micronúcleos se incrementa significativamente respecto a las concentraciones de Roundup que varía entre 4.2 y 7.6 micronúcleos/2000 células.

Da Silva Souza y Fontanetti (2006), evaluaron la calidad del agua del Río Paraíba do Sul en Brasil, afectado por los efluentes de una planta procesadora de petróleo, empleando eritrocitos de *Oreochromis niloticus* para las pruebas de micronúcleos y alteraciones nucleares. Se encontró como resultado una alta incidencia en ambas pruebas por el potencial clastogénico y/o aneugénico, citotóxico de las sustancias de los puntos de drenaje de los efluentes a lo largo del río, posiblemente por la alta concentración de metales, el incremento y larga exposición a bajas concentraciones de genotoxicantes.

Hoshina, De Angelis, y Marin-Morales (2008), para determinar la calidad del agua de río Atibala en Brasil, el cual recibe en un área la descarga de efluentes de una refinería de petróleo y evaluar la efectividad de los tratamientos utilizados por la refinería, utilizaron las pruebas de micronúcleos y alteraciones nucleares en eritrocitos de *Oreochromis niloticus*. Los resultados obtenidos demostraron que los peces de los puntos de descarga de la refinería presentaban altas frecuencias de micronúcleos, anormalidades nucleares y células en proceso de muerte celular sugiriendo que el efluente contenía sustancias con actividad tóxica, aneugénica y/o clastogénica.

En los peces colectados en puntos con tratamiento, se observó una disminución en la inducción de los parámetros evaluados, siendo las frecuencias de micronúcleos, anormalidades nucleares diferentes del control negativo posiblemente por la eficiencia de los tratamientos para mejorar los parámetros fisicoquímicos del efluente y reducir los daños citogenéticos.

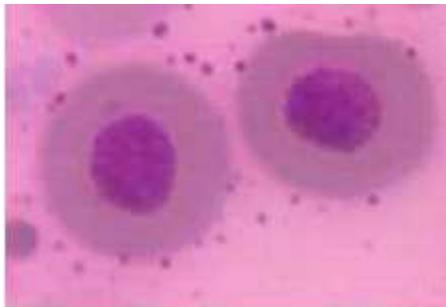
Cáceres, Tello-Vallejo, y Torres (2010), para evaluar el efecto de la exposición a metales (Cromo, Plomo, Mercurio), usaron biomarcadores histopatológicos y genotóxicos en Tilapias (*Oreochromis niloticus*) colectadas en Laguna de Sonso, Valle del Cauca (Sitio Expuesto) y en el río Patía, Cauca (Sitio Control), en temporadas húmeda y seca. Obteniendo como resultados histopatológicos de branquia y hepatopáncreas, que las alteraciones con mayor frecuencia en branquia fueron las adaptativas y tisulares; mientras que, en hepatopáncreas fueron las citoplasmáticas y degenerativas; en cuanto a la temporada, no hay asociación estadísticamente significativa entre la época de los muestreos y la presencia de las alteraciones. Para la prueba genotóxica se analizaron los eritrocitos de sangre periférica y se encontró un incremento estadísticamente significativo en los peces de la Laguna de sonso (4.78 micronúcleos) respecto a los peces control colectados del río Patía (0.15 Mn); este incremento no se asoció a la época. Al comparar épocas (seca Mn 3.21 y húmeda: Mn 3.00) no hubo una diferencia significativa. Los biomarcadores usados en *Oreochromis niloticus* se correlacionan significativamente con un mayor número de alteraciones tanto histopatológicas como genotóxicas en los individuos colectados Reserva de la Laguna de Sonso respecto con los colectados en el Río Patía.



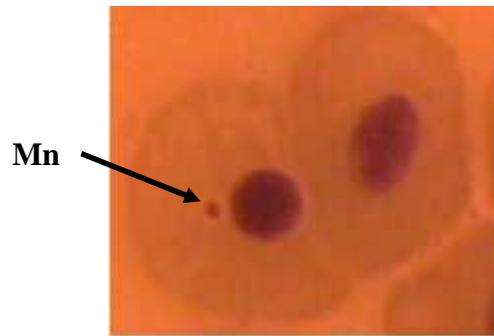
**Figura N°2.** Eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de la Laguna de Sonso.100x Tomado de Cáceres y Tello-Vallejo (2009)



**Figura N°3.** Micronúcleos (Mn) observados en eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de la Laguna de Sonso.100x. Tomado de Cáceres y Tello-Vallejo (2009)



**Figura N°4.** Eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de Río Patía.100x. Tomado de Cáceres y Tello-Vallejo (2009)



**Figura N°5.** Micronúcleo (Mn) observado en eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de Río Patía.100x. Tomado de Cáceres y Tello-Vallejo (2009)

En Egipto, para evaluar los efectos genotóxicos de contaminación por metales en dos especies de peces, *Oreochromis niloticus* y *Mugil cephalus*, de los hábitats acuáticos altamente degradados (El lado suroeste del lago Qaroun y Cuatro granjas de peces en el lado sur del lago Qaroun) comparados con los peces de un sitio referente no contaminado (Piscifactoría de la Facultad de Agricultura, irrigada por una rama del río Nilo), Omar, Zaghoul, Abdel-Khalek, y Abo-Hegab (2012) utilizaron como biomarcador general de la salud de los peces (El factor de Condición (FC)) y biomarcadores de genotoxicidad (La prueba micronúcleos (Mn) y de fragmentación de ADN). La degradación de los hábitats acuáticos estudiados reveló efectos específicos en los peces de estas áreas presentando disminución significativa en los valores de FC asociados con una elevación significativa en las frecuencias Mn y fragmentación de ADN, comparados con los peces del sitio de referencia. Los resultados muestran que las altas concentraciones de metales pesados tienen un efecto genotóxico potencial posiblemente relacionado con las actividades agrícolas y domésticas y resaltan la importancia de integrar un conjunto de biomarcadores para identificar los efectos de la contaminación antropogénica.

En el Río Anambra del Bajo Níger en Nigeria, se estudió la genotoxicidad mediante el test de micronúcleos en eritrocitos de branquia y riñón en las especies *Synodontis clarias* y *Tilapia nilótica* predominantes en el río con presencia de estrés ambiental en diferentes lugares. Las células de eritrocitos de *S. clarias* registraron mayor número de micronúcleos que *T. nilótica*, al parecer esta especie es más sensible al daño genotóxico y podría predecir la genotoxicidad acuática. La estación, la especie y la localización geográfica tuvieron efectos significativos ( $P < 0.05$ ) en el perfil de micronúcleos. Se detectó una mayor frecuencia de micronúcleos en los peces en la estación seca asociado a la disminución del nivel del agua que aumentaría las concentraciones de los xenobióticos y contaminantes presentes en el río. Los micronúcleos tienen mayor frecuencia en las branquias que en el hígado sugiriendo que las branquias se encuentran en contacto directo con los metales pesados presentes en el agua que posteriormente pueden depositarse en otros tejidos. Este estudio recomienda un monitoreo regular de la vida acuática comestible, con el fin de eliminar el peligro que tienen las personas que se alimentan de estas especies afectadas por metales tóxicos (Obiakor, Okonkwo, & Ezeonyejaku, 2014).

Weldetinsae et al. (2017), aplicaron la técnica de ensayo biológico como herramienta de pruebas de toxicidad para evaluar la inducción de micronúcleos (Mn) en eritrocitos periféricos y células exfoliadas de branquias y riñón en *O. niloticus* expuestos a concentraciones tolerables máximas (CTM) de la efluente de curtiduría, lugar donde se realiza el proceso que convierte las pieles de los animales en cuero, se detectó que la inducción de Mn fue significativamente más alta en Grupos expuestos ( $P < 0.05$ ) en comparación con el grupo control. Además la respuesta de micronúcleos específicos del tejido fue mayor en células de las branquias, seguido en eritrocitos periféricos y menor en riñón. Los resultados se asocian con la química del agua, la presencia de metales pesados y sus interacciones.

En la tilapia (*Oreochromis niloticus*) de aguas estuarias expuesta a la concentración ambiental de 1-nitropireno, se evaluó el estrés oxidativo con los biomarcadores de la actividad de Glutathion Peroxidasa, Oxidación del ADN, de proteína y peroxidación lipídica y la genotoxicidad con la prueba de micronúcleos. Los resultados mostraron que todos los biomarcadores para el estrés oxidativo respondieron positivamente, esto se puede asociar a la exposición a contaminantes orgánicos y metálicos. Las frecuencias de micronúcleos y otras anomalías nucleares aumentaron significativamente ( $p < 0.001$ ) en los peces expuestos posiblemente como resultado del estrés oxidativo y porque se afecta el proceso de hematopoyesis. Se concluye que la exposición a una menor concentración de 1-nitropireno puede ser un riesgo para los organismos de agua dulce y estuarios a través de la acumulación (Bacolod, Uno, Villamor, & Koyama, 2017).

Cabe resaltar que en esta revisión se encontraron los siguientes estudios realizados en *Oreochromis niloticus* con resultados que no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos entre los sitios expuestos a contaminantes y muestran la utilidad de integrar biomarcadores para definir la exposición y los efectos antropogénicos entre los sitios impactados y los de referencia en los cuerpos de agua. comprobando que es más preciso un estudio cuando se usa más de un biomarcador, como lo afirma Kakkar y Jaffery (2005).

Grisolia y Starling (2001), para evaluar el daño genético causado por dos plantas municipales de tratamiento de aguas residuales que desembocan en el Lago Paranoá, Brasil, utilizaron la prueba de micronúcleos en Tilapia herbívora (*Tilapia rendalli*), Tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) y Carpa común (*Cyprinus carpio*). Para los experimentos de control positivo, se determinó que la frecuencia de eritrocitos micronucleados de peces tratados con ciclofosfamida fue significativamente mayor en *T. rendalli* y *O. niloticus* que en *C. carpio*. *T. rendalli* fue más sensible a la Mitomicina C que a *O. niloticus* y *C. carpio* y fue la especie más sensible para ambos

clastógenos. Los resultados de las frecuencias de micronúcleos fueron muy bajos en todas las especies de peces estudiados, sin diferencias significativas entre los tres sitios de muestreos con diferentes estados de antropización, esto indica la ausencia de actividad clastogénica en el lago. Sin embargo, se requiere más investigación usando otro sistema de prueba para reforzar los resultados.

En el año 2008 (Linde-Arias et al.), analizaron los efectos de contaminación en el Río Paraíba do Sul en Brasil usando la especie *Oreochromis niloticus*, empleando un conjunto de biomarcadores: un biomarcador general de la salud individual de los peces (Factor de condición), un biomarcador genotóxico (prueba de micronúcleos) y biomarcadores específicos de exposición a contaminantes (Metalotioneína) y la actividad de la acetilcolinesterasa. Los peces del área industrializada y altamente degradada ambientalmente presentaron para el factor de condición valores significativos menores respecto con los otros sitios ( $p < 0.05$ ), evidenciando más estrés ambiental en los peces de este sitio. Las frecuencias de micronúcleos no muestran diferencias estadísticas entre los sitios, esto indica que esta prueba sería una mejor herramienta para el diagnóstico ambiental combinándola con otros biomarcadores. Los altos niveles de metalotioneína y bajos niveles para la actividad de la acetilcolinesterasa, indican los efectos del uso intensivo de pesticidas y la contaminación por metales en el río. Este estudio muestra la utilidad de integrar biomarcadores para definir la exposición y los efectos antropogénicos entre los sitios impactados y los de referencia en este cuerpo de agua.

Barbosa et al. (2010), tenían como objetivo de estudio: evaluar el potencial genotóxico de aguas del lago Extremoz en la costa noreste de Brasil, utilizando el sistema de *Allium cepa*, prueba de micronúcleos y ensayo cometa en eritrocitos de sangre periférica. Los resultados del sistema *A. cepa* mostraron cambios significativos en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y en el

índice mitótico en comparación con el control negativo. En la frecuencia de los micronúcleos en los eritrocitos de *Oreochromis niloticus*, no se observaron cambios significativos y el ensayo de cometa mostró una alteración estadísticamente significativa en el nivel de ruptura de ADN de *O. niloticus*. Estos resultados señalan un estado de deterioro de la calidad del agua, causada por la contaminación de metales pesados y la actividad genotóxica.

#### 4. Conclusiones

Los peces son centinelas de genotoxicidad porque brindan información de la calidad de las aguas, por su capacidad de acumulación de contaminantes y metabolizar xenobióticos. Y el género *Oreochromis*, es uno de los más abundantes y ampliamente utilizado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogénesis por su sensibilidad.

Los biomarcadores son herramientas sensibles para medir los efectos biológicos en pruebas de calidad ambiental y como biomarcador genotóxico: el test de micronúcleos se considera de gran importancia por ser universalmente validada, de fácil acceso y ampliamente utilizada para evaluar del efecto genotóxico por exposición a metales pesados en peces por la sensibilidad, facilidad de ejecución, lectura, bajo costo, efectividad y precisión.

La mayoría de los estudios de esta revisión obtuvieron en sus resultados que la frecuencia de micronúcleos se incrementa siendo estadísticamente significativa en los peces expuestos a metales respecto a los resultados del grupo control o de peces no expuestos.

## **5. Recomendaciones**

Sería de gran importancia evaluar los efectos genotóxicos de los metales pesados en los diferentes estadios de desarrollo de los peces.

Mediante estudios de citotoxicidad y genotoxicidad sería interesante determinar los niveles de biomagnificación de los metales en la cadena trófica relacionada con los peces de mayor consumidos por las poblaciones.

## **6. Alcances**

Esta revisión puede servir a investigadores nacionales a adelantar más estudios relacionados con los efectos de los metales pesados en diferentes ecosistemas y organismos para determinar efectos a corto y largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos) y así prevenir el deterioro de la salud humana y sistemas acuáticos en nuestro país.

Con este tipo de trabajo se puede incentivar a la comunidad científica a desarrollar más estudios relacionados con el test de micronúcleos en peces, ya que presenta ventajas al ser eficaz, económica y rápida para la detección de alteraciones causadas por contaminantes y que puede complementar otros tipo de análisis.

Con los resultados de los estudios de la revisión se resalta la importancia de esta prueba para que se tenga en cuenta al diseñar estrategias de prevención, control y reducción de las actividades que desencadenan la contaminación de metales pesados tanto a nivel regional como a nivel nacional, así como se hace internacionalmente por parte de las entidades que controlan y vigilan el medio ambiente.

## 7. Bibliografía

- Al-Sabti, K. (1994). Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 320(1), 157-163.
- Al-Sabti, K., & Hardig, J. (1990). Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 179-182.
- Al-Sabti, K., & Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2), 121-135.
- Arkhipchuk, V., & Garanko, N. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 62(1), 42-52.
- Arkhipchuk, V., Malinovskaya, M., & Garanko, N. (2000). Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. *Environmental toxicology*, 15(4), 338-344.
- Arribere, M., Guevara, S. R., Sanchez, R., Gil, M., Ross, G. R., Daurade, L., . . . Kestelman, A. (2003). Heavy metals in the vicinity of a chlor-alkali factory in the upper Negro River

ecosystem, Northern Patagonia, Argentina. *Science of the Total Environment*, 301(1), 187-203.

Asoyotoco, & Corporación Autónoma Regional, V. d. C. (2007). *Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso - Municipio de Guadalajara (Buga)*. .

Axelrod, H., Pronek, C. W., Walls, N., Hunziker, J. G., Burgess, W. E., & Emmans, C. W. (1992). *Mini Atlas de peces de acuario. Editorial Hispano Europea S.A.*, 700.

Bacolod, E. T., Uno, S., Villamor, S. S., & Koyama, J. (2017). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Marine Pollution Bulletin*.

Barbosa, J. S., Cabral, T. M., Ferreira, D. N., Agnez-Lima, L. F., & de Medeiros, S. R. (2010). Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(3), 320-325. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.10.008

Belfiore, N. M., & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2), 97-122.

Blevins, R. D., & Pancorbo, O. C. (1986). Metal concentrations in muscle of fish from aquatic systems in East Tennessee, USA. *Water, Air, & Soil Pollution*, 29(4), 361-371.

- Bolis, C., Piccolella, M., Dalla Valle, A., & Rankin, J. C. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological research*, 44(4), 265-280.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78, S93-S98.
- Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., & Batty, J. (2001). Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44(3), 383-392.
- Braunbeck, T. (1998). Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination *Fish ecotoxicology* (pp. 61-140): Springer.
- Brungs, W., McCormick, J., Neiheisel, T., Spehar, R., Stephan, C., & Stokes, G. (1977). Effects of pollution on freshwater fish. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 1425-1493.
- Cáceres, P., & Tello-Vallejo, A. (2009). *Uso de biomarcadores genotóxicos e histopatológicos para evaluar el efecto de los metales en la tilapia (Oreochromis niloticus LL) presente en la Laguna de Sonso (Valle del Cauca)*. (Biologo Trabajo de Grado), Universidad del Cauca.

- Cáceres, P., Tello-Vallejo, A., & Torres, G. (2010). Uso de biomarcadores genotoxicos e histopatológicos para evaluar el efecto de los metales en la tilapia (*Oreochromis niloticus* LL) presente en la laguna de Sonso (valle del Cauca). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(22), 109-121.
- Cairns Jr, J., Dickson, K., & Westlake, G. (1975). Biological monitoring of water and effluent quality. *ASTM, Philadelphia*.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2), 295-311.
- Cala, P., & Bernal, G. (1997). Ecología y adaptaciones de la tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) en ambientes naturales-Caso embalse de Betania y cienaga de chilloa, sistema del rio Magdalena, Colômbia. *DAHLLIA Revista Associação Colombina de Ictiologia*, 2(1), 3-29.
- Cantera, J., & Blanco, J. (2001). The estuary ecosystem of Buenaventura Bay, Colombia *Coastal Marine Ecosystems of Latin America* (pp. 265-280): Springer.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136.

- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., & Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicol Environ Saf*, 56(1), 45-51. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00049-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00049-6)
- Çava , T., & Ergene-Gözükara, S. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1), 81-91.
- Çava , T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 264-271.
- D'Costa, A., Shyama, S. K., & Praveen Kumar, M. K. (2017). Bioaccumulation of trace metals and total petroleum and genotoxicity responses in an edible fish population as indicators of marine pollution. *Ecotoxicol Environ Saf*, 142(Supplement C), 22-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.049>
- Da Silva Souza, T., & Fontanetti, C. S. (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1), 87-93.

- Das, R. K., & Nanda, N. K. (1986). Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Research letters*, 175(2), 67-71.
- De Flora, S., Bagnasco, M., & Znacchi, P. (1991). Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 258(3), 285-320.
- De Flora, S., Vigano, L., D'agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., . . . Arillo, A. (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(3), 167-177.
- De Lemos, C. T., Rödel, P. M., Terra, N. R., De Oliveira, N. C. D. A., & Erdtmann, B. (2007). River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf*, 66(3), 391-401.
- Deguchi, Y., Toyozumi, T., Masuda, S., Yasuhara, A., Mohri, S., Yamada, M., . . . Kinae, N. (2007). Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 178-185.
- Elahee, K., & Bhagwant, S. (2007). Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. *Ecotoxicol Environ Saf*, 68(3), 361-371.

Environmental Protection Agency, E. P. A. (1999). Integrated Risk Information Systems (IRIS) on Arsenic. *National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.*

Ergene, S., Çava , T., Çelik, A., Köleli, N., & Aymak, C. (2007). Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 48(6), 421-429.

Ergene, S., Çava , T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., & Karahan, A. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16(4), 385-391.

Eschborn. (1996). *Guía de Protección Ambiental: Material auxiliar para la identificación y evaluación de impactos ambientales.*

European Economic Community, E. E. C. (2001). Regolamento No. 466/2001 della Commissione dell' 8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunita' Europee*, L77.

Evans, D. H. (1987). The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, 47.

- Farah, M. A., Ateeq, B., Ali, M. N., & Ahmad, W. (2003). Evaluation of genotoxicity of PCP and 2, 4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 54(1), 25-29.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81-95.
- Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 65-75.
- Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., & Zoll-Moreux, C. (1993). Amphibian micronucleus test (s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 292(1), 83-99.
- Ferrante, M., Pappalardo, A. M., Ferrito, V., Pulvirenti, V., Fruciano, C., Grasso, A., . . . Copat, C. (2017). Bioaccumulation of metals and biomarkers of environmental stress in *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) sampled along the Italian coast. *Marine Pollution Bulletin*.
- Freeman, M. H., Shupe, T. F., Vlosky, R. P., & Barnes, H. (2003). Past, present, and future of the wood preservation industry: wood is a renewable natural resource that typically is

- preservative treated to ensure structural integrity in many exterior applications. *Forest products journal*, 53(10), 8-16.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., & Dezfuli, B. (2008). Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 70(3), 400-410.
- Gischler, C. (2005). Pathways of heavy metals and implication for stakeholders, Sonso Lagoon, Colombia. *TRITALWR Master Thesis LWR-EX-05-13. Stockholm-Sweden.*
- Goldberg, L. (1996). A history of pest control measures in the anthropology collections, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *Journal of the American Institute for Conservation*, 35(1), 23-43.
- Gómez, D. M., & Rico, S. (1990). *Evaluación comparativa de tres densidades de siembra en un cultivo monosexo machos de Oreochromis niloticus (LINNAEUS, 1766), con alimentación suplementaria.* (Trabajo de grado), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145-150.

- Grisolia, C. K., & Cordeiro, C. M. T. (2000). Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 235-239.
- Grisolia, C. K., & Starling, F. L. (2001). Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491(1), 39-44.
- Gutierrez, J. C., González, A., Díaz, S., & Ortega, R. (2003). Silliates as a potential source cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *Universidad Complutense. España.*, 39, 461-467.
- Gutiérrez, J. M., Villar, S., & Plavan, A. A. (2015). Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*, 91(2), 518-523.
- Gwaltney-Brant, S. (2002). Heavy metals. *Handbook of toxicologic pathology*, 1, 701-725.
- Haapala, H. (1998). The use of SEM/EDX for studying the distribution of air pollutants in the surroundings of the emission source. *Environmental Pollution*, 99(3), 361-363.
- Has-Schön, E., Bogut, I., & Strelec, I. (2006). Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(4), 545-551.

- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., . . . Asano, N. (1998). Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(2), 125-133.
- Heddle, J., Cimino, M., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M., Tucker, J., . . . MacGregor, J. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and molecular mutagenesis*, 18(4), 277-291.
- Hooftman, R. N., & De Raat, W. (1982). Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research letters*, 104(1), 147-152.
- Hose, J. E., Cross, J. N., Smith, S. G., & Diehl, D. (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Marine Environmental Research*, 22(3), 167-176.
- Hoshina, M. M., De Angelis, D. d. F., & Marin-Morales, M. A. (2008). Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656(1), 44-48.
- Kakkar, P., & Jaffery, F. N. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 335-349.

- Lam, P. K., & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182-186.
- Lemos, C. (1998). *Estudo genotóxico de amostras ambientais através de métodos citogenéticos in vitro e in vivo*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., de Albuquerque, C., Freire, M. M., & Moreira, J. C. (2008). Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Science of the Total Environment*, 399(1), 186-192.
- Linnaeus, C. v. (1766). *Systema Naturae. Editio Duodecima, Reformata. Impensis Direct Laurentii Salvii: Holmiae, I*, 1-532.
- Manna, G., & Sadhukhan, A. (1986). Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Curr. Sci*, 55, 498-501.
- Marcovecchio, J. E. (2004). The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Science of the Total Environment*, 323(1), 219-226.

- Mersch, J., & Beauvais, M.-N. (1997). The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393(1), 141-149.
- Minissi, S., Ciccotti, E., & Rizzoni, M. (1996). Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 367(4), 245-251.
- Monteiro, V., Cavalcante, D., Viléla, M., Sofia, S., & Martinez, C. (2011). In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 104(3), 291-298.
- Muñoz, E., & Guerrero, N. (2003). *Inducción de MN in vivo en eritrocitos de branquias de Oreochromis niloticus por efecto de ROUNDUP*. (Biólogo), Universidad del Cauca, Popayán, Cauca.
- Obiakor, M., Okonkwo, J., & Ezeonyejiaku, C. (2014). Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775, 20-30.
- Omar, W. A., Zaghoul, K. H., Abdel-Khalek, A. A., & Abo-Hegab, S. (2012). Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from

- highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746(1), 7-14.
- Oss, R. N., Kampke, E. H., Chippari-Gomes, A. R., & Gomes, L. C. (2016). The effects of subchronic exposure to copper in fat snook (*Centropomus parallelus*). *Aquatic Toxicology*, 177, 441-445.
- Palhares, D., & Grisolia, C. K. (2002). Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 25(3), 281-284.
- Peña, E. J., Cantera, J. R., & Palacios, M. L. (2001). Nutrient dynamic in the Dagua river estuary, Pacific Coast of Colombia. *Memorias IX Congress Afro-American en Ciencias del Mar-Colacmar. San Andres Isla, Colombia.*, 13-17.
- Porto, J. I., Araujo, C. S., & Feldberg, E. (2005). Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97(3), 287-292.
- Raldúa, D., Díez, S., Bayona, J. M., & Barceló, D. (2007). Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory. *Chemosphere*, 66(7), 1217-1225.

- Rank, J., Lehtonen, K. K., Strand, J., & Laursen, M. (2007). DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84(1), 50-61.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Saf*, 56(3), 442-448.
- Rodríguez, D. (1981). Declaración del efecto ambiental para el cultivo de tilapia nilotica en el sistema magdalénico. *Centro de Investigación Piscícola de Repelón (Atlántico), INDERENA, Colombia.*
- Royero, R., & Lasso, C. (1992). Distribución actual de la mojarra de río, *Caquetaia kraussii*,(Steindachner, 1878)(Perciformes, Cichlidae) en Venezuela: un ejemplo del problema de la introducción de especies. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, 52(138), 163-180.
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M. A., & Stingo, V. (2004). Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf*, 57(2), 168-174.
- Sanchez-Galan, S., Linde, A., Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 49(2), 139-143.

- Sanchez-Galan, S., Linde, A., Izquierdo, J., & Garcia-Vázquez, E. (1998). Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 412(3), 219-225.
- Sanchez, J., Speare, D. J., & Johnson, G. (1997). Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramine-T treatment. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 375-381.
- Silverberg, B. A. (1975). Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (Chlorophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycologia*, 14(4), 265-274.
- Spain, A., & Alm, E. (2003). Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment.
- Spry, D. J., & Wiener, J. G. (1991). Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. *Environmental Pollution*, 71(2), 243-304.
- Szefer, P., Szefer, K., & Skwarzec, B. (1990). Distribution of trace metals in some representative fauna of the southern Baltic. *Marine Pollution Bulletin*, 21(2), 60-62. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X\(90\)90188-E](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X(90)90188-E)

- Talapatra, S. N., & Banerjee, S. K. (2007). Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 210-215.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., & Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121(3), 307-320.
- Trewavas, E. (1983). *Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*: British Museum (Natural History).
- Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204.
- Venier, P., Maron, S., & Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1), 33-44.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.

- Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D'Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C., & De Flora, S. (2002). Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 515(1), 125-134.
- Weldetinsae, A., Dawit, M., Getahun, A., Patil, H., Alemayehu, E., Gizaw, M., . . . Abera, D. (2017). Aneugenicity and clastogenicity in freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to incipient safe concentration of tannery effluent. *Ecotoxicol Environ Saf*, 138, 98-104.
- Yadav, K. K., & Trivedi, S. P. (2009). Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*, 77(11), 1495-1500.
- Yilmaz, A. B. (2003). Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb, and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. *Environmental Research*, 92(3), 277-281.
- Yilmaz, F. (2009). The comparison of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn) in tissues of three economically important fish (*Anguilla anguilla*, *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus*) inhabiting Köycegiz Lake-Mugla (Turkey). *Turkish Journal of Science and Technology*, 4(1), 7-15.
- Zeng, D., Li, Y., & Lin, Q. (1999). Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426(2), 159-161.

Zhang, L., & Wong, M. (2007). Environmental mercury contamination in China: sources and impacts. *Environment international*, 33(1), 108-121.