

Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima

Genotoxic effects of environmental contaminants on commercial fish of Magdalena river, in the department of Tolima

Leidy Ortegon-Torres^I, Ketty Ordoñez-Osorio^{II}, Beatriz Henao-Murillo^{III},
Antonio Guio-Duque^{IV}, Carlos Pelaez-Jaramillo^V.

Resumen: Con el fin de evaluar algunos marcadores de daño genético en peces de importancia comercial del río Magdalena (Colombia), se colectaron ejemplares de *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) y *Pimelodus blochii* (Nicuro) en los municipios de Purificación, Flandes, Ambalema y Honda, puertos localizados en el departamento de Tolima. Se tomaron muestras de sangre de los ejemplares mediante punción cardíaca, para la determinación de eritrocitos micronucleados (EMN) y de quiebres en el ADN (a través del ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales). Los resultados obtenidos fueron además analizados buscando si existía correlación con los niveles de algunos metales pesados (Pb, Cd y Ni) determinados en el agua y los sedimentos en los mismos sitios donde se realizaron las capturas.

Pese a que se evidenciaron dificultades para establecer la relación *in vivo* de estos contaminantes ambientales con respecto a los efectos genotóxicos inducidos en los

I Programa de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena, Ibagué, Tolima. letaor-323@hotmail.com

II Programa de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena, Ibagué, Tolima. oroske@hotmail.com

III Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108, Bloque 1 Laboratorio 315, Medellín, Antioquia. bhenao2002@yahoo.com

IV Grupo de Investigaciones en Química de Productos Naturales GIPRONUT, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima. aguio@ut.edu.co

V Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108, Bloque 1 Laboratorio 315, Medellín, Antioquia. directorgiem@gmail.com

peces, en las especies estudiadas se logró observar efectos genotóxicos representados por la presencia de Eritrocitos Micronucleados (EMN) y la formación de los cometas, lo que de acuerdo con la frecuencia de formación y su longitud, representa un daño bajo sobre el ADN.

Estos resultados son significativos para establecer la presencia de efectos negativos sobre los recursos ícticos, atribuidos a la alta descarga de contaminantes de origen industrial, agrícola y minero, entre otras, considerados como potenciales agentes mutagénicos.

Palabras clave: Río Magdalena, Metales pesados, Peces, Eritrocitos Micronucleados (EMN), Efectos Genotóxicos.

ABSTRACT: In order to assess some markers of genetic damage in commercial fish from Magdalena River (Colombia), *Prochilodus magdalenae* (Bocachico) and *Pimelodus blochii* (Nicuro) specimens were collected in the municipalities of Purificación, Flanders, Ambalema and Honda, ports located in the department of Tolima. Blood samples were taken from the fishes by cardiac puncture for the determination of micronucleated erythrocytes (EMN) and breaks in DNA (alkaline comet assay or single-cell gel electrophoresis). The results were also analyzed for the correlation with the levels of some heavy metals (Pb, Cd and Ni), determined in water and sediments at the same sites where the sampling was performed.

Al though difficulties were evident to establish the *in vivo* relationship of these environmental contaminants regarding genotoxic effects induced in fish, in the species studied genotoxic effects were observed, represented by the presence of micronucleated erythrocytes (MNEs) and the formation of comets, which according to the frequency of formation and its length, the DNA damage is low.

These results are significant to establish the presence of adverse effects on fish resources, attributed to the high discharge of pollutants from industrial, agricultural and mining, among others, considered as potential mutagens.

Keywords: Magdalena River, Heavy metals, Fish, Micronucleated Erythrocytes (MNE), Comet Assay, Genotoxic effects.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia, el río Magdalena se destaca por ser una importante fuente de alimento para la población, pero en los últimos años se ha reportado una reducción del 12% anual de su potencial pesquero (CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIO-

NAL, 2006), como consecuencia, entre otras razones, de los altos niveles de contaminación provenientes de la agroindustria, del uso de plaguicidas y de la presencia de metales pesados, procedentes en su mayoría de la minería y vertimientos de la industria. A su paso por el departamento del Tolima, en donde cerca del 82 % de sus suelos son utilizados en actividades agrícolas intensivas, el río Magdalena recibe también la descarga de 39 m³/sg de aguas del río Bogotá, uno de los ríos más contaminados del mundo (Duran, 2005).

Gran parte de las sustancias encontradas en las aguas residuales de la industria y de la agricultura son altamente tóxicas, persistentes y resistentes a la biodegradación. De esta manera, pueden tener efectos negativos sobre diversos componentes ambientales y sobre la salud humana, bien sea en forma directa o indirecta. Entre estos contaminantes, los metales pesados como el plomo, el cadmio y el níquel, son en su mayoría bioacumulables, genotóxicos, carcinogénicos y por lo tanto pueden prolongar su acción con consecuencias peligrosas (Azizullah et al., 2011).

La regulación de los metales pesados en peces teleósteos y su respuesta inductiva varía significativamente, dependiendo de factores relacionados con la variabilidad del metal: tiempo de permanencia en el medio, tiempo de exposición, concentración, fisiología del pez, morfología y edad del pez, entre otros (Filipovic & Raspor, 2007).

Desde hace ya varios años, se ha generado un creciente interés en determinar el nivel de daño en la estructura del ADN como un indicador sensible de toxicidad para de este modo evaluar la relación entre estos daños y las propiedades mutacarcinogénicas de los contaminantes ambientales y sus diversas estructuras (Mitchelmore & Chipman, 1997). Para estos propósitos, técnicas como el ensayo cometa y el análisis de células de micronucleadas, proporcionan una información detallada de las posibles lesiones a nivel de material genético.

Comparado con otros marcadores de daño genético, el ensayo cometa se diferencia por su alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, su rápida realización (resultados en pocos días), el análisis de los datos es a nivel de células individuales, requiere un pequeño tamaño de muestra (pocas células), es flexible y es aplicable a cualquier población de células eucariotas (Arencibia y Rosario, 2003; Villela et al., 2007).

Por su parte, la prueba de micronúcleos ha mostrado ciertas ventajas comparado con otros marcadores de daño genético. Entre sus ventajas, se incluye que no se requiere

de un riguroso entrenamiento para llevar a cabo el ensayo, lo que conlleva a una mayor rapidez en el conteo de las preparaciones. Adicionalmente, se pueden cuantificar miles de células por tratamiento, lo que le imparte mayor poder estadístico al ensayo. (Arencibia & Rosario, 2003; Porto et al., 2005).

A través de este trabajo se buscó la aplicación de estos dos biomarcadores de daño genético para evaluar la distribución y los efectos tóxicos de los contaminantes presentes en la arteria fluvial más importante del país.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Los muestreos se realizaron en cuatro puntos ubicados en sectores pertenecientes a los cascos urbanos y rurales de los municipios de Purificación, Flandes, Ambalema y Honda en el departamento del Tolima Colombia (Figura 1). La zona de muestreo se caracteriza por ser un valle semihúmedo y hasta húmedo, con dos periodos anuales de lluvias y dos periodos secos (CORMAGDALENA, 2002). Los municipios mencionados están dedicados principalmente a las actividades agrícolas con extensos cultivos de arroz, algodón, sorgo, maíz y algunos frutales, de tal modo que son constantes los residuos agroquímicos que por diversas vías llegan a este cuerpo de agua. A esta condición se suma el hecho de que el río Magdalena recibe a la altura de Flandes y Girardot un aporte de hasta 39 m³/segundo de aguas contaminadas del río Bogotá (Alvear, 2005).



Figura 1. Municipios muestreados en el departamento del Tolima

Adicionalmente se realizaron muestreos en una zona no impactada por las actividades humanas ya mencionadas, ni abastecida por el río Magdalena, denominada como Piscícola (T), localizada en el municipio de Venadillo, perteneciente también al departamento del Tolima. Allí se tomaron muestras de sangre de peces no expuestos a contaminantes antropogénicos, para ser utilizados como controles negativos.

2.2 Fase de campo

Caracterización de hábitat. Se determinó la calidad de hábitat en las 4 zonas de muestreo siguiendo los parámetros recomendados por Barbour et al. (1999).

Colecta de individuos. La captura de 139 Individuos de las especies *Pimelodus blochii* Cuvier & Valenciennes, 1840 y *Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1879 (Nicuro y Bocachico, respectivamente), se efectuó en época de aguas altas a finales de enero y principios de febrero del 2009. En cada puerto el muestreo se realizó durante 24 horas, acompañando a los pescadores en su rutina diaria de pesca, quienes emplean como método de captura la atarraya o chile. De cada individuo capturado se tomaron datos de peso (W) y longitud estándar (LS), rasgos fenotípicos, olor y presencia o ausencia de alteraciones físicas. De acuerdo a lo establecido por Universidad de Concepción (2007), se calcularon los índices de condición (K) e índice hepatosomático (IHS).

Toma de muestras de sangre. Inmediatamente después de ser capturados los individuos, se tomaron muestras de sangre mediante punción cardiaca, utilizando jeringas heparinizadas de 3,0 cm³. Se realizó el extendido de la sangre empleando dos láminas por pez debidamente marcadas con códigos según la estación, la especie y el número del individuo. Posteriormente en el laboratorio, se realizó el procedimiento para el conteo de micronúcleos.

La sangre restante se disolvió en viales que contenían 1,5 mL de buffer salino fosfato, libre de Ca y Mg (PBS, por sus siglas en inglés), para realizar el ensayo cometa en el laboratorio. Estas muestras se refrigeraron a 4 °C en neveras de poliestireno para su traslado al laboratorio.

2.3 Fase de laboratorio

Prueba de micronúcleos. En el laboratorio, los extendidos de sangre fueron fijados con metanol al 90 % y coloreados con Giemsa (90 % de pureza). El conteo de micronúcleos se realizó en 1000 eritrocitos por placa utilizando un microscopio de

luz con objetivo de 100X. Para la identificación de los micronúcleos se siguieron los parámetros propuestos por Daoud, et al. (2008) y Zalacain (2005). La frecuencia de eritrocitos micronucleados se calculó de acuerdo con lo propuesto por Daoud, et al (opcit) así:

$$\% \text{ EMN} = (\text{Número de Eritrocitos Micronucleados} / \text{Número Total de Células}) \times 100$$

Ensayo cometa. Se continuó el ensayo cometa siguiendo la metodología propuesta por Henao et al. (2005) con algunas modificaciones de voltaje, amperaje y duración de la electroforesis (18 v, 200 mA, 15 min.).

El conteo y la medición de los cometas se realizaron con un microscopio de epifluorescencia, magnificando a 100 X y observando 200 células seleccionadas al azar de cada individuo (100 células por portaobjetos). La longitud total del cometa (LC), se utilizó como parámetro para estimar el daño en el ADN, conforme a lo establecido por García et al. (2007) y Yasuhara et al (2003).

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos fueron consignados en matrices de cálculo en donde se relacionó el porcentaje de formación de micronúcleos en los eritrocitos (%EMN), para cada uno de los individuos de las especies colectadas, con el respectivo puerto. Se calcularon unas medidas resumen de cada variable (n, media, desviación estándar, valor mínimo y valor máximo), usando como criterio de clasificación cada uno de los puertos, además, se construyeron tablas de frecuencia de cada una de las variables en los diferentes puertos. Este procedimiento se aplicó igualmente para los resultados obtenidos de la prueba cometa.

Luego de evaluar la normalidad de los valores aplicando la prueba Shapiro Willks (modificado) y su homogeneidad, se realizaron comparaciones entre las variables para cada una de las especies, mediante una ANOVA no paramétrica (Kruskal Wallis), con el apoyo del software estadístico InfoStat versión libre 2011, y el test de Duncan como prueba demostrativa, estableciendo un nivel de significancia de 95 % con (n-1) grados de libertad, definiendo diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

En forma paralela a esta investigación, Arenas y Noreña (2009), determinaron, la presencia de plomo, cadmio y níquel en tejidos hepático y sanguíneo en los mismos organismos. Las autoras permitieron el uso de estos datos (consignados en el Anexo A), para realizar correlaciones entre los niveles de metales determinados por ellas y

las variables estudiadas en este estudio. Para este propósito se empleó el coeficiente de correlación de Pearson y se definió la significancia de las significativas cuando $p < 0,05$, siempre con el apoyo del software estadístico InfoStat versión libre 2011.

3. RESULTADOS

Caracterización de hábitat. Conforme al protocolo utilizado, el hábitat encontrado en el tramo estudiado presenta unas condiciones subóptimas en tres de las cuatro estaciones, Flandes (58 %), Ambalema (56 %) y Honda (54 %); una condición óptima en la estación de Purificación (75 %).

Individuos colectados. Los peces capturados en cada uno de los puertos presentaron las características fenotípicas propias de cada especie. Solamente, en el puerto de Honda, los Nicuros capturados presentaron una coloración iridiscente y brillante, mayor a la habitual.

La Tabla 1 muestra que en promedio los Nicuros colectados en el puerto de Honda y los Bocachicos obtenidos en el puerto de Purificación, son los de mayor tamaño ($56,75 \pm 20,60$ g; $15,11 \pm 2,35$ cm y $268 \pm 45,26$ g; $23,50 \pm 1,43$ cm, respectivamente).

Tabla 1. Promedios y Desviación Estándar de las características morfométricas: Peso (W), Longitud Estándar (LS); Índice de Condición (K) e Índice Hepatosomático (IHS) en las especies de peces de interés comercial Nicuro y Bocachico del río Magdalena, tramo Tolima.

ESPECIE	PARAMETRO	PURIFICACION	FLANDES	AMBALEMA	HONDA
NICURO (n=20 por puerto)	W (g)	$19,50 \pm 8,72$	$35,38 \pm 15,06$	$33,75 \pm 18,20$	$56,75 \pm 20,60$
	LS (cm)	$11,23 \pm 1,02$	$13,05 \pm 1,40$	$13,60 \pm 1,45$	$15,11 \pm 2,35$
	K	$1,33 \pm 0,43$	$1,56 \pm 0,62$	$1,26 \pm 0,25$	$1,67 \pm 0,46$
	IHS	$1,26 \pm 0,63$	$0,59 \pm 0,29$	$0,67 \pm 0,40$	$0,48 \pm 0,26$
BOCACHICO (n=20 por puerto)	W (g)	$268,00 \pm 45,26$	$131 \pm 27,13$	$175,25 \pm 37,82$	-
	LS (cm)	$23,50 \pm 1,43$	$18,71 \pm 1,39$	$20,40 \pm 1,77$	-
	K	$2,05 \pm 0,18$	$1,99 \pm 0,18$	$2,05 \pm 0,18$	-
	IHS	$1,12 \pm 0,32$	$0,47 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,21$	-

(-) No colectado

Así mismo, la Tabla 1 muestra que de manera similar a los resultados de Peso y Longitud Estándar, los Nicuros colectados en Honda y los Bocachicos capturados

en Purificación son los que mejor Índice de Condición tienen ($1,67 \pm 0,46$ y $2,05 \pm 0,18$, respectivamente), y que es en los individuos de las dos especies capturadas en el puerto de Purificación las que presentan el mayor valor de Índice Hepatosomático.

Prueba de micronúcleos. La Tabla 2 muestra los porcentajes de Eritrocitos Micronucleados (EMN) de las especies estudiadas en cada uno de los puertos. En general los porcentajes de formación de EMN fueron bajos, pero se resalta lo obtenido en el puerto de Flandes, en donde el porcentaje de células micronucleadas fue el más alto para las dos especies: $0,07 \pm 0,11$ % en Nicuro y $0,23 \pm 0,30$ % en Bocachico. Por el contrario, en los individuos de las dos especies colectados en el puerto de Purificación y de los controles negativos colectados en la Piscícola (T) no se evidenció presencia de EMN ni otro tipo de anomalía nuclear.

Tabla 2. Estadística descriptiva: Valores Promedio (X), Desviación Estándar (D.E), Valores Mínimo y Máximo del Porcentaje de Formación de Eritrocitos Micronucleados (% EMN) en las especies de peces de interés comercial Nicuro y Bocachico del río Magdalena, tramo Tolima y de la Piscícola (T)

ESPECIE	PARAMETRO	PURIFICACION	FLANDES	AMBALEMA	HONDA	PISCICOLA
NICURO (n=40 por puerto)	X	0	0,07	0,05	0,01	0
	D.E	0	0,11	0,10	0,03	0
	Mínimo	0	0	0	0	0
	Máximo	0	0,30	0,40	0,10	0
BOCACHICO (n=40 por puerto)	X	0	0,23	0,01	-	0
	D.E	0	0,30	0,02	-	0
	Mínimo	0	0	0	-	0
	Máximo	0	1,40	0,10	-	0

(-) No colectado

De igual forma, la Tabla 2 muestra que los valores obtenidos del porcentaje de eritrocitos micronucleados (% EMN), oscilaron entre 0 y 0,40 % para los Nicuros y entre 0 y 1,40 para los Bocachicos, registrándose en los puertos de Ambalema y Flandes los máximos porcentajes de EMN (0,40 y 1,40, respectivamente).

En la Figura 2 se presenta la distribución de las frecuencias del % EMN, teniendo en cuenta los individuos capturados para cada una de las especies en el puerto de Flandes. Como puede observarse, se evidencia un patrón similar de los resultados

obtenidos para todo el tramo del río: una clase que aglutina la mayoría de los datos del % EMN, en Nicuros (Figura 2a, n=30), el 67% de los datos se encuentran distribuidos en la clase 0,00-0,08 %; mientras que en los Bocachicos (figura 2b; n=40), el 81% están reunidos en la clase 0,00-0,28 %.

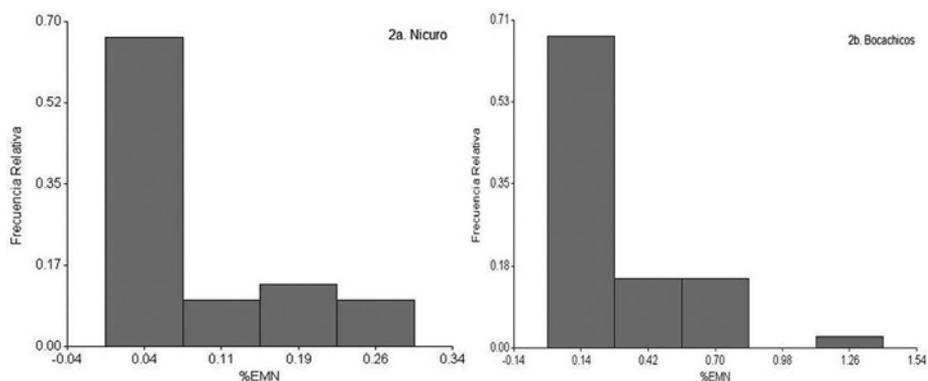


Figura 2. Distribución de frecuencia de los eritrocitos micronucleados (% EMN) para las especies de Nicuro y Bocachico del puerto de Flandes

El 82 % de los resultados del % EMN en Nicuro están entre 0,00 y 0,23 %. El 98 % de los resultados del % EMN en Bocachico están entre los límites 0,00 y 0,84 %, lo que corrobora la tendencia de que los % EMN son mayores en el Bocachico que en el Nicuro.

Las Figuras 3a y 3b, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la formación de EMN entre los puertos ($p < 0,05$; $p < 0,0001$, para las dos especies), confirmando que los resultados obtenidos de los individuos capturados en el puerto de Flandes, son diferentes.

Las Figuras 3a y 3b, muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la formación de EMN entre los puertos ($p < 0,05$; $p < 0,0001$, para las dos especies), confirmando que los resultados obtenidos de los individuos capturados en el puerto de Flandes, son diferentes.

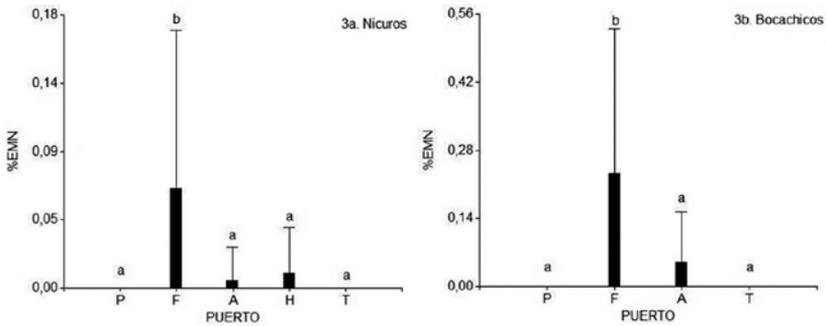


Figura 3. Porcentaje de formación de eritrocitos (% EMN) para la especie de Nicuro y Bocachico en los diferentes puntos de muestreo

También se puede apreciar en las Figuras 3a y 3b, una leve tendencia en la disminución del porcentaje de EMN en los peces capturados en los puertos aguas abajo (Ambalema y Honda), además los resultados obtenidos en el puerto de Purificación son similares a los obtenidos en el control negativo, la Piscícola (T).

La Figura 4, muestra algunos Eritrocitos Micronucleados (EMN) observados en las especies capturadas, los cuales se ajustan a los parámetros propuestos por Daoud (2008) y Zalacain et al., (2005) para definir un micronúcleo: igual tonalidad de la coloración del núcleo y del micronúcleo; el tamaño del micronúcleo debe ser un tercio del tamaño del núcleo de la célula; al movimiento del micrométrico ambos se difuminan al mismo tiempo; el micronúcleo debe estar completamente separado del núcleo, y el micronúcleo debe tener forma bien definida y cromatina condensada.

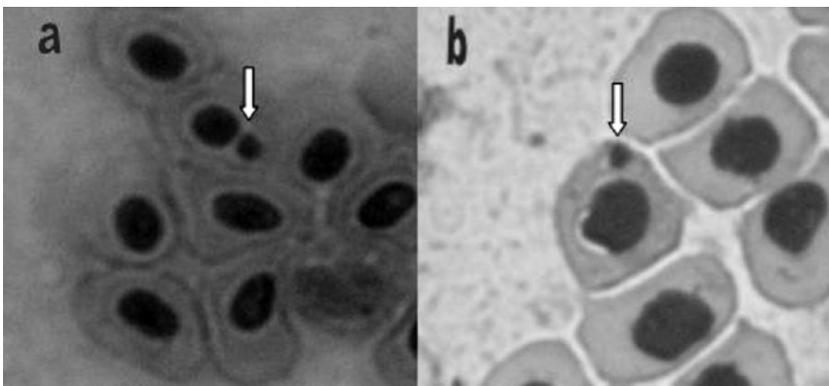


Figura 4. Eritrocitos Micronucleados (EMN) observados en las especies capturadas

Ensayo cometa

La Tabla 3 muestra los resultados del ensayo cometa. La mayor longitud total promedio de los cometas encontrados en Nicuros corresponde a los individuos colectados en el puerto de Honda ($28,82 \pm 7,05 \mu\text{m}$) y la mayor longitud promedio de los cometas en los Bocachicos corresponde a los ejemplares colectados en el puerto de Ambalema ($34,31 \pm 10,30 \mu\text{m}$).

Tabla 3. Estadística descriptiva: Valores Promedio (X), Desviación Estándar (D.E), Valores Mínimo y Máximo de la Longitud Total de los Cometas LC (μm) en las especies de peces de interés comercial Nicuro y Bocachico del río Magdalena, tramo Tolima y de la Piscícola (T)

ESPECIE	PARAMETRO	PURIFICACION (n=1770)	FLANDES (n=1600)	AMBALEMA (n=2662)	HONDA (n=2140)	Piscícola (T) (n=700)
Nicuro	X	23,15	16,66	25,60	28,82	8,75
	D.E	7,87	7,96	8,79	7,05	3,98
	Mínimo	5,00	8,00	2,00	10,00	6,00
	Máximo	57,00	150,00	90,00	58,00	79,00
	PARAMETRO	PURIFICACION (n=3328)	FLANDES (n=2376)	AMBALEMA (n=2359)	HONDA	Piscícola (T) (n=800)
Bocachico	X	26,33	27,15	34,31	-	10,46
	D.E	12,23	12,14	10,30	-	2,56
	Mínimo	1,00	6,00	6,00	-	7,00
	Máximo	81,00	68,00	70,00	-	20,00

(-) No colectado

Por otro lado, la Tabla 3 muestra que los valores obtenidos de Longitud total de Cometa (LC), oscilaron entre 2,00 y 150,00 μm para los Nicuros y entre 1 y 81 μm para los Bocachicos, siendo los puertos de Flandes y Purificación los lugares donde se registraron los máximos valores de LC (150 μm para Nicuro y 81 μm para Bocachico). También se observa en la Tabla 3, que los cometas encontrados en la Piscícola (T) son los de menor longitud.

En la Figura 5 se observan los histogramas de distribución de frecuencias de la LC para los Nicuros capturados en cada uno de los puertos: en Purificación (Figura 5a; n=1770), la clase 15,40-20,60 μm es la que mayor frecuencia tiene, 33%; en Flandes

(Figura 5b, n=1600), 81% de las LC están agrupadas en la clase 8,00-22,20 μm ; en Ambalema (Figura 5c, n=2662), el 39% de las LC están en el intervalo 18,00-26,00 μm ; finalmente en Honda (figura 5d, n=2140), cuatro clases agrupan el 77% de las LC y se encuentran en el intervalo 18,73-36,18 μm .

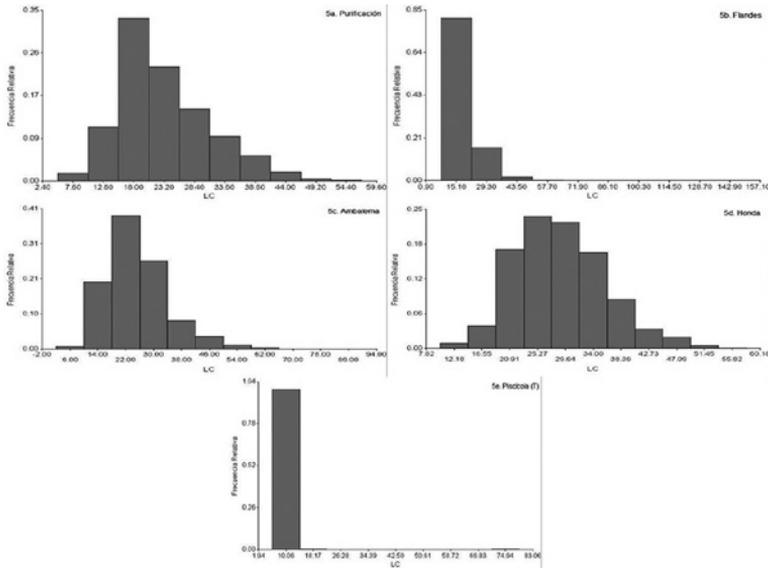


Figura 5. Histogramas de distribución de frecuencias de la LC para los Nicuros capturados en los sitios de muestreo

A pesar de las diferencias en la distribución de las frecuencias de la LC en los Nicuros (Figura 5), en los cuatro puertos, existe un intervalo común que agrupa a la mayoría de las longitudes, el cual se puede limitar entre 8 μm y 27,45 μm .

Sin embargo, en todos los casos, los cometas medidos en el tejido sanguíneo de los Nicuros colectados en los cuatro puertos, fueron mayores a los medidos en los Nicuros colectados en la Piscícola (T), estación control. En este sitio la distribución de las frecuencias está concentrada en una sola clase, con un intervalo entre 6 μm y 14,11 μm , en donde se agruparon el 99,9% de las medidas (Figura 5e; n=700).

Las diferencias en los histogramas de distribución de frecuencia de la LC para los Bocachicos capturados se ilustran en la Figura 6. En todos los puertos se presentaron 11 clases. Para Purificación la clase 22,82 - 30,09 μm es la de mayor frecuencia: 28% (Figura 6a; n=3328). En Flandes el 19% de las LC están entre 28,55 y 34,18 μm

(Figura 6b, n=2376). En Ambalema el 27% de las LC están en el intervalo 23,45-29,27 μm (Figura 6c, n=2359).

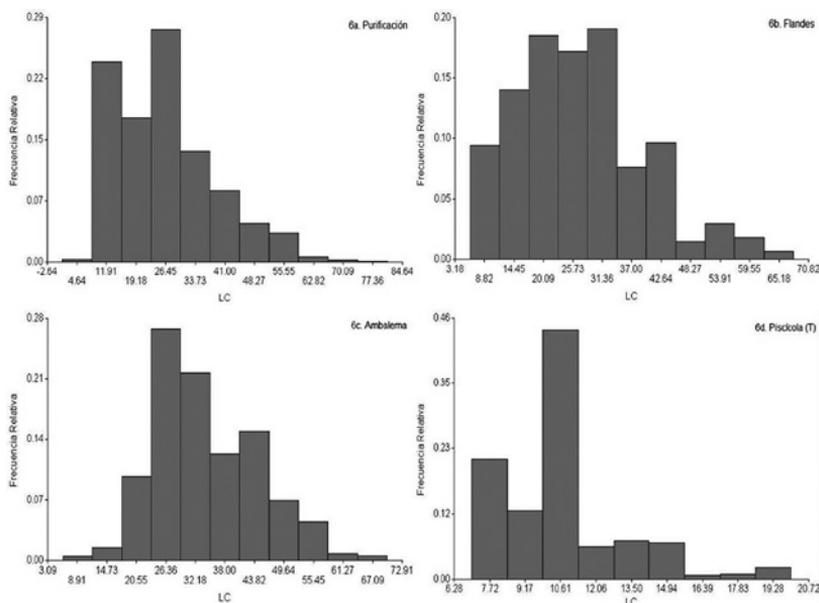


Figura 6. Histogramas de distribución de frecuencias de la LC para los Bocachicos capturados en los sitios de muestreo

A diferencia de lo encontrado en la distribución de la LC para los Nicuros (Figura 5), la Figura 6 muestra que la distribución de la LC en Bocachicos es más heterogénea, en el sentido que existen en todos los casos, mayor cantidad de clases y no hay una que agrupe mayoritariamente los resultados. Esto lo confirma el hecho que en Purificación el 83 % de las LC están distribuidas en cuatro clases cuyos límites son 8,27 – 37,36 μm (Figura 6a). De la misma manera, en Flandes el 68% de las LC se agrupan en cuatro clases que van desde 11,64 μm hasta 34,18 μm (Figura 6b), en Ambalema se distribuyen en cinco clases que tienen como límite inferior 17,64 μm y como superior 46,73 μm (Figura 6c).

Sin embargo, tal como sucedió con la LC en Nicuros, en todos los casos los cometas medidos en el tejido sanguíneo de los Bocachicos colectados en los tres puertos fueron mayores a los medidos en los Bocachicos colectados en la Piscícola (T). Allí, el 44% de las medidas está concentrado en una sola clase, con un límite inferior de 9,89 μm y un límite superior de 11,33 μm (Figura 6d; n=800).

En las figuras 7a y 7b se puede apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas en la longitud de los cometas (LC) entre los puertos ($p < 0,05$; $p = < 0,0001$, para las dos especies); y que son los resultados obtenidos de los individuos capturados en el puerto de Honda y Ambalema, los que mayores longitudes de los cometas presentan, y en donde probablemente exista un mayor daño en el ADN.

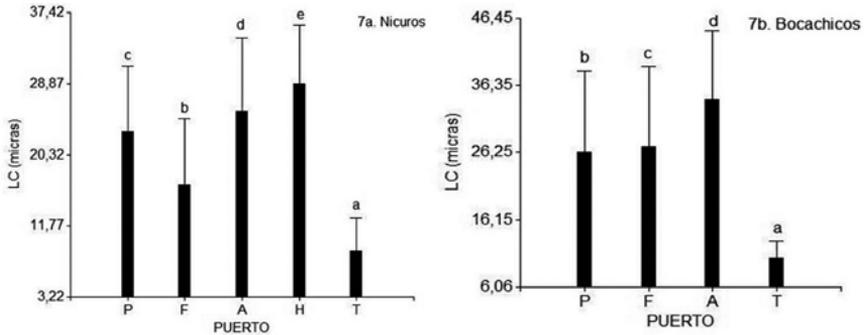


Figura 7. Porcentaje de la longitud de los cometas (LC) para la especie de Nicuro y Bocachico en los diferentes puntos de muestreo. ($p < 0,05$; $p = < 0,0001$)

La figura 7 muestra además, una leve tendencia de las LC a aumentar a medida que el río Magdalena recorre su curso y pasa por cada uno de los puertos muestreados.

En las figuras 8a y 8b se presentan los cometas, que evidencian el rompimiento del ADN y la migración de éste fuera del núcleo de las células, tanto en los Bocachicos, como en los Nicuros capturados en los 4 puntos de muestreo, migración que se presenta con la forma característica de un cometa.

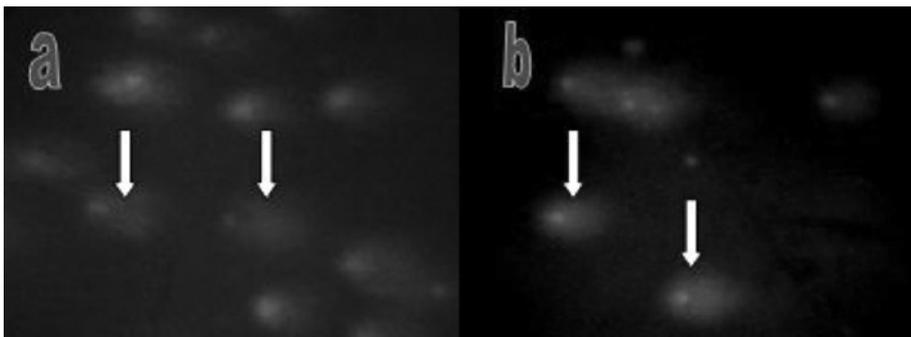


Figura 8. Micrográficas del ensayo cometa en las células de las especies capturadas

Correlaciones entre las variables

Micronúcleos

La tabla 4 muestra que los % EMN de los Nicuros están correlacionados estadísticamente y de manera significativa con los niveles de plomo ($p=0,0011$; $p<0,05$) y cadmio ($p=0,0017$; $p<0,05$) detectados en las branquias.

Tabla 4. Coeficientes (r) y Probabilidad (p) de las Correlaciones de Pearson entre el Peso (W), la Longitud Estándar (LS), el Índice de Condición (K), el Índice Hepatosomático, los niveles de Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) en Branquia e Hígado y la formación de Eritrocitos Micronucleados (%EMN) en Nicuros colectados en el tramo Tolima del río Magdalena

Correlación	General		Branquia		Hígado	
	r	P	r	p	r	P
W vs % EMN	-0,17	0,22				
LS vs % EMN	-0,09	0,50				
K vs % EMN	-0,18	0,18				
IHS vs % EMN	-0,09	0,52				
Pb vs EMN			0,43	0,0011*	0,17	0,17
Cd vs % EMN			0,41	0,0017*	-0,02	0,87
Ni vs % EMN			0,13	0,33	-0,07	0,56

*(Valores de $p<0,05$, suponen correlaciones estadísticamente significativas)

Estas correlaciones se muestran en las figuras 9a y 9b, en donde se aprecia que son positivas, es decir, a medida que aumentan los niveles de los metales pesados, aumenta la inducción de micronúcleos en los eritrocitos.

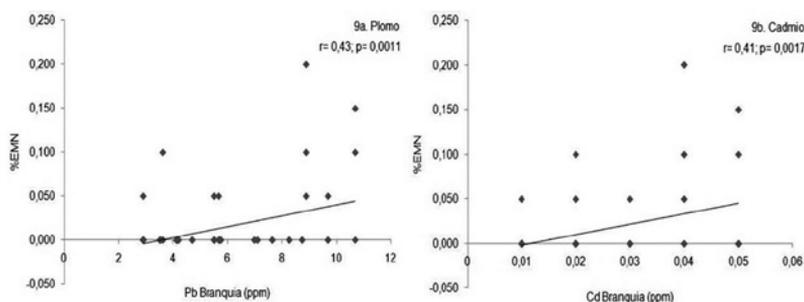


Figura 9. Correlación entre el Porcentaje de eritrocitos (% EMN) y los niveles de plomo ($p=0,0011$; $p<0,05$) y cadmio ($p=0,0017$; $p<0,05$) detectados en las branquias de la especie de Nicuro

También se encontró que los % EMN de los Bocachicos están correlacionados estadísticamente y de manera significativa con los parámetros morfométricos (Peso y Longitud Estándar), de salubridad (IHS), y con los niveles de Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) encontrados en el hígado de los individuos colectados (Tabla 5).

Tabla 5. Coeficientes (r) y Probabilidad (p) de las Correlaciones de Pearson entre el Peso (W), la Longitud Estándar (LS), el Índice de Condición (K), el Índice Hepatosomático, los niveles de Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) en Branquia e Hígado y la formación de Eritrocitos Micronucleados (% EMN) en Bocachicos colectados en el tramo Tolima del río Magdalena

Correlación	General		Branquia		Hígado	
	r	P	r	p	R	P
W vs %EMN	-0,40	0,0033*				
LS vs %EMN	-0,40	0,0037*				
K vs %EMN	0,04	0,77				
IHS vs %EMN	-0,40	0,0033*				
Pb vs %EMN			-0,18	0,19	-0,20	0,16
Cd vs %EMN			0,21	0,18	0,51	0,0011*
Ni vs %EMN			0,15	0,28	0,38	0,0045*

*Valores de $p < 0,05$, suponen correlaciones estadísticamente significativas

Llama la atención que contrario a lo observado en la Tabla 4, en la tabla 5 se aprecia que la significancia en las correlaciones entre el % EMN y los niveles de los metales pesados, se dio en los niveles encontrados en el hígado de los Bocachicos estudiados y no en las branquias, como sucedió con los Nicuros.

Estas correlaciones se ven reflejadas en las figuras 10 y 11. La figura 10 muestra en los tres casos (10a ,10b y 10c), que la línea de tendencia es negativa, lo que indica una proporcionalidad inversa entre las variables, es decir que a medida que aumenta la variable morfométrica y de salubridad, el % EMN disminuye. Mientras que las figuras 11a y 11b, denota que la línea de tendencia es positiva, demostrando una correlación directamente proporcional entre las variables, a medida que aumentan los niveles de cadmio y níquel, el porcentaje de EMN se incrementa.

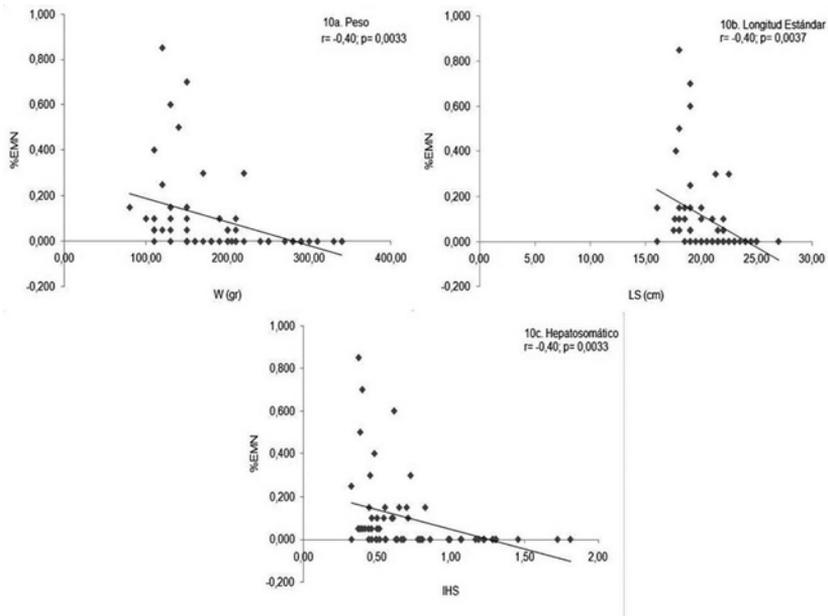


Figura 10. Correlación entre el Porcentaje de eritrocitos (% EMN), el peso (10a), la longitud estándar (10b) y el índice hepatosomático (10c)

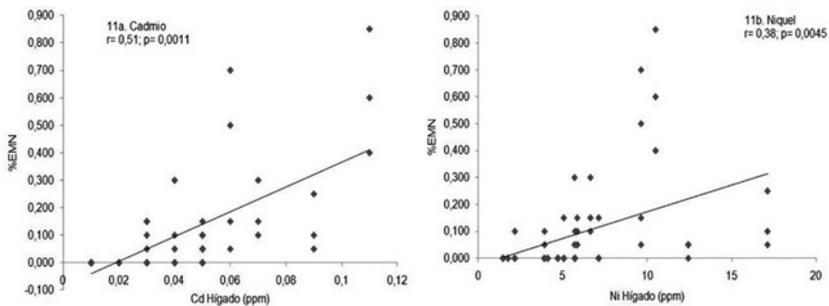


Figura 11. Correlación entre el Porcentaje de eritrocitos (% EMN) y los niveles de cadmio ($p = 0,0011$; $p < 0,05$) y níquel ($p = 0,0045$; $p < 0,05$) detectados en las branquias de la especie de Bocachico

En términos generales, las correlaciones del % EMN con cada una de las variables analizadas para las dos especies estudiadas (Tablas 4 y 5), poseen coeficientes de correlación bajos, indicando que probablemente, este tipo de relación no se ajuste completamente a una lineal.

Longitud de los cometas

La tabla 6, muestra que las LC de los Nicuros están correlacionados estadísticamente y de manera significativa solamente con los parámetros morfométricos (W y LS), y con el índice de Condición (K).

Tabla 6. Coeficientes (r) y Probabilidad (p) de las Correlaciones de Pearson entre el Peso (W), la Longitud Estándar (LS), el Índice de Condición (K), el Índice Hepatosomático, los niveles de Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) en Branquia e Hígado y la Longitud de los Cometas (LC) en Nicuros colectados en el tramo Tolima del río Magdalena

Correlación	General		Branquia		Hígado	
	r	P	R	p	r	P
W vs %EMN	0,38	0,02*				
LS vs %EMN	0,52	0,0014*				
K vs %EMN	-0,39	0,01*				
IHS vs %EMN	-0,23	0,19				
Pb vs %EMN			-0,21	0,22	0,02	0,92
Cd vs %EMN			-0,20	0,24	0,30	0,06
Ni vs %EMN			0,07	0,68	0,28	0,08

*Valores de $p < 0,05$, suponen correlaciones estadísticamente significativas

Estas correlaciones se muestran en la figura 12, donde se aprecia que las relaciones con los parámetros morfométricos son positivas (Figura 12a y 12b), lo que indica que son directamente proporcionales, a medida que aumenta el W y la LS, aumenta la LC.

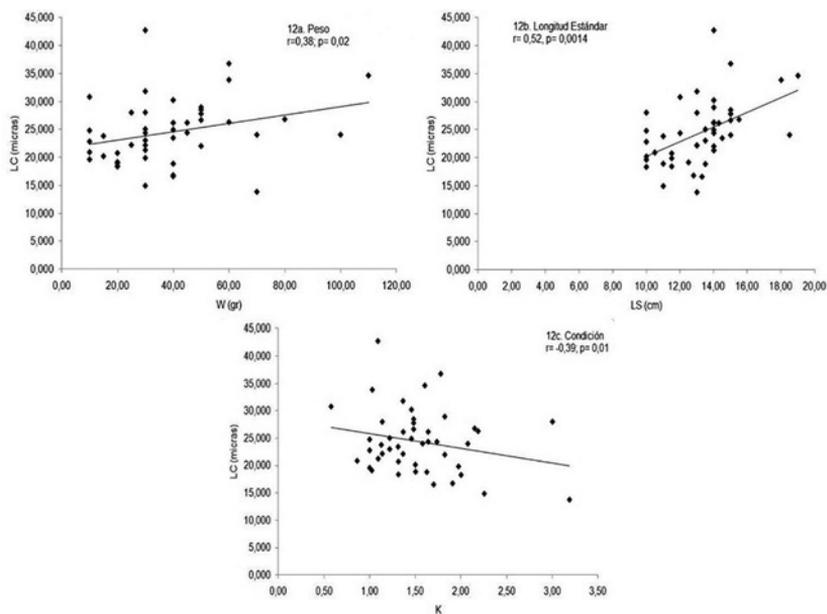


Figura 12. Correlación entre la longitud de los cometas (LC), el peso (12a), la longitud estándar (12b) y el índice de condición (12c)

Contrariamente, la figura 12c muestra una correlación negativa entre K y LC, lo que indica una relación inversamente proporcional, a medida que aumenta K, disminuye LC.

La tabla 7 muestra que las LC de los Bocachicos no están correlacionados estadísticamente y de manera significativa con los parámetros morfométricos (Peso y Longitud Estándar), de salubridad (Hepatosomático), ni con los niveles de Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) encontrados tanto en las branquias como en el hígado de los individuos colectados.

Tabla 7. Coeficientes (r) y Probabilidad (p) de las Correlaciones de Pearson entre el Peso (W), la Longitud Estándar (LS), el Índice de Condición (K), el Índice Hepatosomático, los niveles de Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Níquel (Ni) en Branquia e Hígado y la Longitud de los Cometas (LC) en Bocachicos colectados en el tramo Tolima del río Magdalena

Correlación	General		Branquia		Hígado	
	r	P	r	p	R	P
W vs %EMN	-0,14	0,41				
LS vs %EMN	-0,19	0,26				
K vs %EMN	-0,13	0,44				
IHS vs %EMN	0,10	0,53				
Pb vs %EMN			-0,04	0,83	-0,12	0,46
Cd vs %EMN			0,27	0,12	0,09	0,58
Ni vs %EMN			0,13	0,46	0,05	0,77

*Valores de $p < 0,05$, suponen correlaciones estadísticamente significativas

Tal como sucedió en el % EMN, en términos generales, las correlaciones de la LC con cada una de las variables analizadas (Tablas 6 y 7), para las dos especies estudiadas, poseen coeficientes de correlación bajos. Esto indica que probablemente, este tipo de relación no se ajusta del todo a una relación lineal.

4. DISCUSIÓN

Individuos colectados

En su totalidad los ejemplares muestreados hacen parte de lo que en la región se conoce como punta o cabeza de subienda, que corresponde a una avanzada de lo que posteriormente es la subienda como tal, entendiendo que la subienda es el proceso de migración reproductivo que algunas especies de peces realizan anualmente, entre ellos el Bocachico y el Nicuro (Torres H, comunicación personal, noviembre 2009).

En promedio ninguno de los organismos de las especies capturadas superó la talla Mínima de Captura establecida por la autoridad ambiental: 180 mm para el Nicuro y 250 mm para el Bocachico (Tabla 1). La Corporación Colombia Internacional (2006), asegura que para estas especies en el río Magdalena ya se sobrepasó el rendimiento máximo sostenible, evidenciado en la disminución de las capturas, de la talla media de los individuos colectados y de la talla media de madurez gonadal.

No obstante, en este estudio los resultados morfométricos y de los índices de salubridad para las dos especies, son proporcionales al resultado de la valoración de calidad de hábitat de los puertos estudiados, ya que los mayores pesos (W) y tallas (LS), correspondieron a los individuos colectados en los puertos con mejor calidad de hábitat: Honda y Purificación (Tabla 1). Estos resultados lógicamente generan los mejores valores de salubridad, considerando a los índices de condición (K) y Hepatosomático (IHS), como bioindicadores de la salud de los organismos, tal como lo menciona Corsi et al. (2003).

Chuiko et al. (2007) y Bervoets & Blust (2003), proponen que K es reflejo del estado nutricional del animal, resultando en un buen indicador del crecimiento de los peces, ya que un alto valor de K está determinado por un alto peso, lo que significa una buena capacidad de forrajeo del animal, una alta capacidad de conversión del alimento, aumentando la eficiencia alimenticia y convirtiendo en últimas, estos nutrientes en músculo y que generalmente está relacionado con la calidad del hábitat y la disponibilidad de alimento que hay en este.

Por otro lado, K es influenciado por una condición óptima del ambiente, la cual aumenta las relaciones como predación, forrajeo y en general las condiciones de crianza, el estado de desarrollo y reproductivo de los organismos, favoreciendo el aumento en los valores de K (Knapen et al 2009), tal como se evidencia en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos para el IHS, pueden estar relacionados con el estatus nutricional del pez, tal como lo indican Chuiko et al. (2007), quienes asocian el IHS con la acumulación de energía (niveles de glicógeno y contenido de grasa), en el hígado. Yang & Baumann (2006) mencionan que además, el IHS se ve afectado por los cambios estacionales.

Micronúcleos

Los metales pesados favorecen la formación de micronúcleos, los cuales se derivan de rupturas de la cadena de ADN a nivel de las cromátidas o en todo el cromosoma (Russo et al., 2004). Se forman además por la inhibición de la polimerización de los túbulos de actina, estructura esencial en la división mitótica (Porto et al., 2005), y reflejan daños a corto término relacionados con el ciclo celular y la replicación del ADN (Rodríguez-Cea et al., 2003).

A pesar del relativo bajo porcentaje de formación de Eritrocitos Micronucleados (%EMN), cuantificados en los peces para los cuatro puntos de muestreo, se resalta

el puerto de Flandes donde se registraron las más altas frecuencias de %EMN (Tabla 2). Según Delgado & Ortiz (2009), en el agua del puerto, se encontraron niveles de plomo y níquel de 0,16 y 56,63 ppm, respectivamente, valores que sobrepasan los límites permisibles por la normatividad ambiental y para el consumo humano del recurso pesquero. Así mismo, las autoras determinaron que en Flandes se encontraron los mayores valores de cadmio en los sedimentos (0,038 ppm), en relación con los otros puntos de estudio.

Estos metales pueden ser detectados en aguas superficiales, incluso cuando se encuentran a bajas concentraciones. Generalmente están disueltos o suspendidos en el agua o en los sedimentos e ingresan a los peces a través de las branquias, la piel o el tracto gastrointestinal (Ohe et al., 2004). Su disponibilidad puede incrementar debido a las alteraciones del potencial redox de los sedimentos y a la resuspensión de los mismos causada por la actividad excavadora de los peces y la turbulencia de las aguas (Costa et al., 2008).

Arenas & Noreña (2009), para los mismos individuos colectados en este estudio, encontraron que los capturados en el puerto de Flandes, presentaron los mayores niveles de Cd, Pb y Ni en los tejidos hepático y branquial (Anexo A), niveles que en su mayoría sobrepasaron los límites establecidos por la autoridad. La presencia de metales pesados en niveles mayores de los indicados en la normatividad, indican claramente un efecto contaminante significativo, debido a las actividades antropogénicas sobre el ambiente y el recurso íctico (Barbosa et al., 2010). Bervoets y Blust (2003), mencionan que la carga contaminante en el ambiente acuático probablemente se acumula en los peces y representa entonces un riesgo para ellos.

Los resultados expuestos en el Anexo A, dan cuenta que los órganos de mayor acumulación de los metales Pb, Cd y Ni, son las branquias en el caso del nicuro, y para el bocachico, el hígado. Filipovic y Raspor (2007), plantearon que la respuesta de los peces a los metales pesados varía significativamente y que está relacionada con la actividad metabólica, la fisiología y la edad del organismo. Deviller et al. (2005), exponen también que esta respuesta depende de igual forma de la variabilidad del metal, el tiempo de exposición, su concentración, la concentración del material particulado y las características físicas y químicas del agua.

Algunos autores mencionan que el cadmio induce significativamente la formación de EMN en truchas (Rodríguez-Cea et al., 2003) y que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de cadmio y plomo con la formación de EMN (Costa

et al., 2008). En cuanto al níquel, Kasprzak et al. (2003), indicaron que compuestos de níquel generan daños específicos en la morfología de los cromosomas e inducen la formación de micronúcleos.

Karamanis et al. (2008), indicaron que los niveles de carga contaminante de metales como el plomo y níquel, están relacionados con las impurezas de fertilizantes y a que estos metales son la “base metálica” de pesticidas empleados en las prácticas agrícolas, actividad predominante en la zona de estudio.

El hecho de que las mayores frecuencias de formación de EMN se encontraron en los organismos colectados en el puerto de Flandes, puede deberse a la influencia de la descarga del río Bogotá a menos de dos kilómetros aguas arriba del punto donde se realizó el muestreo, sin olvidar la presencia compleja de sustancias químicas usadas en la actividad agrícola del municipio y otras contribuciones antrópicas, lo que es consecuente con el bajo porcentaje en la calidad de hábitat que se registró para este puerto. Al respecto Al Sabti & Metcalfe, (1995), Lemos et al., (2008) y Matsumoto et al. (2006) han demostrado que los eritrocitos periféricos de peces, tienen una alta incidencia de micronúcleos luego de la exposición a diferentes contaminantes bajo condiciones de campo.

El efecto de disminución de EMN visto aguas abajo, probablemente corresponde al conjunto de fenómenos físicos, químicos y biológicos que permiten la autodepuración del río Magdalena y la dilución de los agentes contaminantes en las aguas, pues para la época del muestreo se presentaron elevados caudales y altas precipitaciones. Además la forma de la cuenca permite que el flujo del agua sea más eficiente ayudando a que el efecto contaminante sea menor (Palma, 2005). Otro importante factor, asociado a los organismos muestreados, es la presencia de un efectivo mecanismo molecular de reparación de los daños genéticos Russo et al. (2004); Mackey & Mac Gregor (1979) y Zúñiga et al. (2000) afirmaron que las diferencias en las frecuencias de formación de EMN dependen de la capacidad del sistema retículo endotelial, que filtra la sangre, eliminando eritrocitos viejos o aquellos que contienen micronúcleos.

De otro lado, es importante tener en consideración que algunas especies de peces son más sensibles que otras a los efectos de los metales pesados, incluso la prolongada exposición a los agentes químicos hace que se desarrollen mecanismos adaptativos de tolerancia al estrés, promoviendo el incremento en la tasa de reemplazo, y que los daños de ADN no alcancen a convertirse en micronúcleos por la capacidad de respuesta en reparar los rompimientos del ADN (Barbosa et al., 2010).

Los individuos de las especies Bocachico y Nicuro del puerto de Flandes son los que marcan la diferencia significativa en la formación de EMN al comparar cada una de estas especies en los diferentes puertos. Estas diferencias significativas en el porcentaje de formación EMN vistas en estas dos especies concuerdan con los resultados obtenidos por Al Sabti & Metcalfe (1995), Lemos et al. (2001), De Flora et al. (1993) y Hurtado (2007), estimaron que existe variabilidad en las respuestas interindividuales de los organismos, de tal modo que la variabilidad de la respuesta genotóxica puede estar relacionada con factores metabólicos y farmacocinéticos, incluso advierten sobre una probable respuesta adaptativa de los organismos a la constante interacción con los agentes contaminantes, lo que hace que la formación de micronúcleos sea diferente, de tal modo que los individuos mejor adaptados soportan de mejor manera el efecto del contaminante, lo que determina que existe una relación más equilibrada entre la reparación o desintoxicación y el efecto contaminante.

Por estas razones, Minissi et al. (1996), resaltan que los micronúcleos en peces son indicativos de daño citogenético a corto tiempo, de tal modo que la genotoxicidad se hace evidente utilizando este test en donde son constantes mayores cantidades de agentes contaminantes, como es el caso del puerto de Flandes.

En los individuos colectados en el puerto de Purificación, así como en los muestreados en la Piscícola (T) (control negativo), no se evidenciaron eritrocitos micronucleados. En el puerto de Purificación este hecho se puede relacionar con la calidad del hábitat, ya que según la metodología aplicada (Barbour et al., 1999), este puerto presentó el mejor porcentaje en la valoración de la calidad del hábitat. Además, Arenas & Noreña (2009) encontraron en los tejidos de los especímenes capturados en Purificación, las menores concentraciones de metales pesados. Este hecho conduce a suponer que las bajas concentraciones no generan una respuesta genotóxica en los animales, dando como resultado la no formación de micronúcleos o que los efectos no son detectables con este marcador de daño genético.

Ensayo cometa

Contrario a los resultados obtenidos en los porcentajes de formación de EMN, los resultados del ensayo cometa revelaron un incremento de los efectos genotóxicos aguas abajo del río Magdalena en todos los puertos y las especies, lo que indica el valor de este ensayo para evaluar el daño en el material genético causado por agentes químicos y físicos. Este daño es representado en el aumento de fragmentos generados por rompimiento del ADN, que migran fuera del núcleo, hecho que se observó en

las tres especies objeto de estudio, con la forma característica de un cometa (Prieto & Llopiz, 1999).

Los resultados obtenidos con este biomarcador indican que la migración del ADN en las muestras de los controles negativos es mínima comparada con la de los demás puertos, hecho que confirma la presencia de sustancias con actividad genotóxica en las aguas del río Magdalena y su interacción con el ADN de los organismos que habitan este cuerpo de agua, lo que coincide con la presencia de metales pesados como plomo (Pb) y cadmio (Cd), encontrados en los tejidos de las especies Bocachico y Nicuro por Arenas & Noreña (2009), lo que también podría explicar los efectos genotóxicos detectados en los ejemplares del puerto de Flandes, donde se encontraron los mayores niveles de Cd para las especies Bocachico y Nicuro.

De tal forma que es factible que las bajas concentraciones de metales pesados encontradas en las muestras de agua, sedimentos y tejidos (Delgado & Ortiz 2009; Arenas & Noreña 2009), puedan ser inductoras de los daños genotóxicos encontrados en las especies objeto de estudio.

Ahmed et al (2010), describieron que la toxicidad del cadmio es atribuible a la capacidad de este metal de interactuar con el ADN, incrementando las rupturas de cadena de ADN por medio de reducciones enzimáticas de los nucleótidos dañados. Adicionalmente Risso-de-Faverney et al. (2001), manifiestan que el cadmio interactúa en los procesos de reparación de ADN y que tiene la capacidad de romperlo en extensos fragmentos oligonucleosomales por medio de la activación de endonucleas asociadas a las caspasas.

Así mismo, Lee & Steinert (2003), mencionaron que los metales pesados interfieren en la reparación del ADN inhibiendo una o más de las ADN polimerasas que intervienen en el proceso, lo que origina reparaciones incompletas de escisiones, las que se convierten en espacios de ruptura en las hebras sencillas de ADN, siendo el níquel uno de los metales que produce estos efectos (Kasprzak et al., 2003).

Al comparar los resultados obtenidos de las distribuciones de frecuencia se infiere que de acuerdo con García et al. (2007) y con Yasuhara et al. (2003), la longitud de los cometas obtenidos corresponde en todos los casos a cometas que se agrupan en las categorías 1 y 2. Según estos autores, dichas categorías corresponden a un nivel bajo de daño del ADN. Sin embargo García et al. (2011), hablan sobre las dificultades que la prueba cometa tiene, respecto a la interpretación y comparación de los

resultados obtenidos, ya que existe una gran diversidad de parámetros usados en la expresión del daño del ADN.

Aunque en los Bocachicos se detectaron los menores niveles de metales pesados en sus tejidos, presentaron mayor daño genotóxico que los Nicuros, hecho que puede estar relacionado con la particularidad de su hábito alimenticio, pues el Bocachico, especie detritívora, está en contacto directo con los sedimentos que son los receptores finales de los contaminantes insolubles (o levemente solubles en agua), y pueden actuar como un depósito para varias sustancias (Rocha et al., 2009). Este resultado coincide con los obtenidos por Grisolia et al (2009), quienes hallaron en el lago Paranoá (Brasil) un alto índice de daño en el ADN (mediante el ensayo cometa) en especies de peces de hábitos alimenticios detritívoros.

Correlaciones de las variables

De manera general, las correlaciones en mayor proporción resultaron estadísticamente significativas cuando se relacionaron las variables de salubridad y los niveles de metales pesados con la formación de EMN que con la LC. Estos resultados, probablemente se expliquen por la naturaleza de las pruebas (micronúcleos y ensayo cometa), pues éstas reflejan diferentes formas de estrés ambiental (Villela et al, 2007; Barbosa et al., 2010); la prueba de micronúcleos detecta daños de corto término relacionados con el ciclo celular y la replicación de ADN (Russo et al., 2004); el ensayo cometa detecta bajos niveles de rompimiento de fragmentos de ADN (Prieto & Llopiz, 1999).

Por otro lado, las correlaciones significativas entre las variables de salubridad (K e IHS), con la formación de EMN y la LC se presentaron con diferentes tendencias. Bervoets & Blust (2003) indican que existe poca información que explique las relaciones entre los niveles de los metales pesados y la condición de los peces, sin embargo argumentan que no siempre los bajos niveles de metales pesados en el ambiente y en el organismo, generan altos valores de salubridad. De la misma manera, Knapen et al (2009), mencionan que en sitios contaminados se pueden presentar altos valores de K, pues las especies que sobreviven en estos hábitats, desarrollan una alta resistencia a los contaminantes y se habitúan a estas condiciones.

Además, Yang & Baumann (2006), reportan relaciones directamente proporcionales entre los valores de IHS y la contaminación con residuos de petróleo; Cabrera et al. (2008), encontraron que algunos índices de salubridad tienden a ser mayores en los lugares más contaminados, altos valores de IHS están relacionados con un incremen-

to en el tamaño del hígado (hiperplasia de los hepatocitos), como respuesta al estrés contaminante, ampliando la capacidad del órgano de desintoxicarse.

Para el caso del Bocachico, las correlaciones significativas obtenidas entre los niveles de los metales pesados encontrados en el hígado y los efectos tóxicos asociados a la formación de EMN, pueden estar relacionados con la particularidad de su hábito alimenticio, tal como se discutió previamente. Además, el hígado es un importante órgano que almacena metales pesados y es el principal sitio de desintoxicación (Rodríguez et al., 2007).

Finalmente, si bien el efecto de los metales pesados (Cd, Pb y Ni) sobre las especies estudiadas es bajo, estos resultados deben alertar a las Autoridades Ambientales. Los daños en el ADN pueden significar un alto riesgo degenerativo y de lesiones pre-neoplásticas en etapas tempranas de la histogénesis (Ohe et al., 2004) y además pueden estar asociados a una reducción en el crecimiento de los organismos, desarrollos anormales, decrecimiento de las tasas de sobrevivencia, retrasos en el desarrollo embrionario, cambios en la estructura y función del sistema endocrino, lo que en últimas resultaría en una reducción del tamaño de la población (Barbosa et al., 2010).

Respecto a la utilidad de las pruebas, la combinación del test de micronúcleos y el ensayo cometa, permite relacionar diferentes niveles de degradación del ADN (Costa et al., 2008); el test de micronúcleos detecta daños clastogénicos y aneugénicos no reparados y el ensayo cometa puede evidenciar lesiones recientes que fueron reparadas (Barbosa et al., 2010; Villela et al., 2007).

5. CONCLUSIONES

Existen dificultades para establecer la relación *in vivo* de los metales pesados que llegan al río Magdalena y los efectos genotóxicos inducidos en los peces, debido a la gran variedad de sustancias tóxicas que son vertidas a este ecosistema, a la dinámica ecológica del mismo y a los mecanismos metabólicos de los peces que marcan una diferencia en la respuesta depurativa ante los agentes contaminantes.

Los biomarcadores usados demostraron que son herramientas importantes en la valoración de la calidad ambiental y sirven como medida para evidenciar los efectos genotóxicos de agentes contaminantes.

Este trabajo se constituye en uno de los pocos realizados en Colombia sobre efectos genotóxicos asociados a contaminantes ambientales en peces en condiciones *in situ*, por esta misma razón se convierte en un modelo para investigaciones futuras realizadas no sólo en el departamento del Tolima sino también en Colombia en general.

6. AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima, GIPRONUT; a la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima, al Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM de la Universidad de Antioquia, por el apoyo económico; a los profesores y auxiliares de laboratorio de la facultad de Ciencias de la Universidad del Tolima quienes brindaron asesorías, apoyo metodológico y un espacio físico que permitió el desarrollo de este trabajo.

7. REFERENCIAS

- Ahmed, MD. Parvin, E. Arif, M. Akter, M.S. Khan, M.S. & Islam M.D. (2010). Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. *Environment Toxicology and Pharmacology*, 30, 80-84.
- Al Sabti, K. & Metcalfe, C. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 343, 121 – 135.
- Alvear S.J. (2005). Manual del Río Magdalena. Bogotá: Corporación Autónoma Regional del Río Grande de la Magdalena CORMAGDALENA
- Arenas, M & Noreña D. (2009). Niveles de metales pesados y plaguicidas organoclorados en tejidos de tres especies de peces de importancia comercial del río Magdalena – tramo Tolima. [Tesis de pregrado]. [Ibagué (Colombia)] Universidad del Tolima.
- Arencibia, D. & Fernandez, L. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Revista de Toxicología* [Internet], 24 – 41. Recuperado de: http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf
- Azizullah, A. Khan, M. Richter, P. Häder, D. (2011). Water pollution in Pakistan and its impact on public health – A review. *Environment International*, 37. 470-497.
- Barbosa, J.S. Cabral, T.M Ferreira, D.N. Agnez-Lima, L.F. Batistuzzo de Madeiros S.R. (2010). Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320-325.

- Barbour, M. Gerritsen, J. Snyder, B. Stribling, J. (1999). Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and Fish, [Internet]. 2nd ed. Washington, D. C. Environmental Protection Agency; Office of Water. Recuperado de: <http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/index.cfm>
- Bervoets, L. & Blust, R. (2003). Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution*, (126), 9-19.
- Cabrera, P. Aguilar, C. Gonzalez, G. (2008). Indicadores morfológicos y reproductivos del pez *Gambusia puncticulata* (Poeciliidae) en sitios muy contaminados del río Almendares, Cuba. *Rev. Biol. Trop*, 56, (4).
- Chuiko, G. Tillitt, D. Zajicek, J. Flerov, B. Stepanova, V. Zhelnin, Y. Podgornaya, V. (2007). Chemical contamination of the Rybinsk Reservoir, northwest Russia: Relationship between liver polychlorinated biphenyls (PCB) content and health indicators in bream (*Abramis brama*). *Chemosphere*, 67, 527–536.
- Corsi, I. Mariottini, M. Sensini, C. Lancini, L. Focardi, S. (2003). Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutants concentrations. *Acta Oceanologica*, 26, 129-138.
- Corporacion Autonoma Regional del Río Grande la Magdalena Cormagdalena. (2002). Estudio ambiental de la cuenca del Magdalena-Cauca y elementos para su ordenamiento territorial, Resumen Ejecutivo. Bogotá D.C.
- Corporación Colombia Internacional Pesca y Acuicultura. (2006) Bogotá. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, INCODER, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Costa, P.M. Lobo, J. Caeiro, S. Martins, M. Ferreira, A.M. Caetano, M. del Valls, T.A. (2008). Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research.*, 654: 29-37.
- Daoud, A. Nagpure, N. Kumar, S B. Kumar, R A. kushwaha, B. (2008). Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, 71(10), 1823–1831.
- De Flora, S. Viganò, L. D'agostini, F. Camoirano, A. Bagnasco, M. Bennicelli, C. Melodia, F. Anillo, A. (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, 319 (3), 167–77.
- Delgado, J & Ortiz T. (2009). Evaluación Ecotóxica de Metales Pesados y Plaguicidas Organoclorados en Sedimentos del Río Magdalena tramo Tolima. [Tesis pregrado]. [Ibagué (Colombia)] Universidad del Tolima.

- Deville, G. Palluel, O. Aliaume, C. Asanthi, H. Sanchez, W. Franco M.A. Casellas C. (2005). Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 89-97.
- Duran, L. (2005). Formulación de la Agenda Prospectiva para la Competitividad del Tolima, El Sector Ambiental. Universidad del Tolima, Gobernación del Tolima.
- Filipovic, V & Raspor, B. (2007). Metal exposure assessment in native fish, *Mullus barbatus* L, from the Eastern Adriatic Sea. *Toxicology Letters*, 168: 292-301.
- Garcia, O. Romero, I. Gonzalez, J.E. Mandina, T. (2007). Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutation Research*, 627, 186-190.
- Garcia, O. Romero, I. Gonzalez, J.E. Moreno, D. Cuetara, E. Rivero, Y. Guevara, I. (2011). Visual estimation of the percentage of DNA in the tail in the comet assay: Evaluation of different approaches in an intercomparison exercise. *Mutation Research*. 720, 14-21.
- Grisolia, C. Rivero, C. Starling, F. Da Silva, I. Barbosa, A. Dorea, J. (2009). Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32 (1), 138-143.
- Henao, B. Palacio, J. Camargo, M. (2005). Evaluación Genotóxica de los plaguicidas Cipermetrina y Diazinón en tilapia roja (*Oreochromis* sp). *Actualidades Biológicas*, 27, (82), 43-55.
- Hurtado, J. López, J. Montoya, F. (2007). Prueba de micronúcleos en eritrocitos de sabaletas (*Brycon henni*) presentes en el río Porce y en el embalse Porce II, Antioquia. *Revista Electrónica De Ingeniería En Producción Acuícola*, (3), 238 – 245.
- Knapen, D. De Wolf, H. Knaepkens, G. Bervoets, L. Eens, M. Blust, R. verheyen, E. (2009). Historical metal pollution in natural gudgeon populations: inferences from allozyme, microsatellite and condition factor analysis. *Aquatic Toxicology*, 95, 17-26.
- Karamanis, D. Stamoulis, K. Ioannides, K. Patiris, D. (2008). Spatial and seasonal trends of natural radioactivity and heavy metals in river waters of Epirus, Macedonia and Thessalia. *Desalination*, 224, 1-3, 250–260.
- Kasprzak, K.S. Sunderman Jr, F.W. Salnikow K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutation Research*, 533, 67-97.
- Lee, R.F. Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 43-64.
- Lemos, C. Iranço, F. Oliveira, N. Souza, G. Guimarães, J. (2008) Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of the total environmental*, 406 (1-2), 337-343.

- Lemos, C. Röedel, P. Terra, N. Erdtmann, B. (2001). Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, (6), 1320–4.
- Mackey, B. Macgregor, J. (1979). The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 64, (3), 195 - 2004.
- Matsumoto, S. Tamie, M. Malaguttii, I. Dias, A. Fonseca, I. Marin, M. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29, (1), 148-158.
- 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.
- Mitchelmore, C. & Chipman, J. (1997). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*. 399, (2), 135 -147.
- Ohe, T. Watanabe, T. Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface Waters: a review. *Mutation Research*, 567, 109-149.
- Palma, P. (2005). Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguén. [Tesis pregrado]. [Chile]: Facultad de Ciencias, Universidad de Temuco. p. 130.
- Porto, J.I.R. Araujo, C.S.O. Feldberg E. (2005). Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*. 97, 287-292.
- Prieto, E. & Llopiz, J. (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Revista Cubana Investigacion Biomedica*, 18, (1), 34-46.
- Risso-DE Faverney, C. Devaux, A. Lafaurie, M. Girard, J.P. Bailly, B. Rahmani, R. (2001). Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquatoxic Toxicology*, 53, 65-76.
- Rodríguez-Cea, A. Ayllon, F. Garcia, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 442-448.
- Rodríguez, F. González, J. Suárez, R. (2007). Bioacumulación por metales pesados en el capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*), habitante de la cuenca alta del río Bogotá. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola*, 2, (2),101-115.

- Rocha, P. Luvizotto, G. Kosmehl, T. Böttcher, M. Storch, V. Braunbeck, T. Hollert, H. (2009). Sediment genotoxicity in the Tiete River (São Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (7), 1842-1848.
- Russo, R. Morescalchi, M. 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57 (2), 168–174.
- Torres, H. (Comunicación personal, noviembre, 2009). Entrevista Profesor Titular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.
- Universidad de Concepción (2007). Programa de monitoreo ecotoxicológico de los efluentes industriales en el río Cruces, Provincia de Valdivia, Chile. Capítulo 4. Evolución Ecotoxicológica mediante el uso de biomarcadores. Universidad de Concepción, Centro EULA, Chile. 39.
- Villela, I.V. Marques De Oliveira, I. Coelho, J. Ferraz, J. Pegas, J.A. Da Silva, J. (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, 628,76-86.
- Yang, X. & Baumann, P.C. (2006). Biliary PAH metabolites and hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecological Indicators*, 6, 567-574.
- Yasuhara, S. Zhu, Y. Matsui, T. Tipirneni, N. Yasuhara, Y. Kaneki, M. Rosenzweig, A. Martyn, J. (2003). Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51, (7), 873-885.
- Zalacain, M. Sierra, L. Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, 28, (2), 227-236.
- Zúñiga, G. Bulgarín, O. Aguirre, J. Rodríguez, A. Perez, A. Meda, B. Arreola, M. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467, (1), 99-103.

Anexo A. Niveles promedio y desviación estándar de Cd, Pb y Ni, expresados en mg/Kg, encontrados en órganos de individuos de Nicuro y Bocachico, colectados en cuatro puertos sobre el río Magdalena, departamento del Tolima (Tomado de Arenas y Noreña, 2009).

Especie	Metal	Órgano	Puerto			
			Purificación	Flandes	Ambalema	Honda
Nicuro	Cd	Branquia	0,018 ± 0,009	0,034 ± 0,009	0,022 ± 0,013	0,016 ± 0,004
		Hígado	0,033 ± 0,00	0,340 ± 0,402	0,081 ± 0,065	0,072 ± 0,012
	Pb	Branquia	3,516 ± 0,867	8,737 ± 1,299	6,706 ± 1,806	4,282 ± 1,185
		Hígado	1,418 ± 0,00	3,781 ± 1,968	0,420 ± 0,594	2,914 ± 0,00
	Ni	Branquia	10,920	31,69 ± 10,26	30,91 ± 9,84	16,14 ± 3,76
		Hígado	10,120	27,50 ± 26,53	10,39 ± 5,46	9,29 ± 1,68
Bocachico	Cd	Branquia	0,013 ± 0,023	0,008 ± 0,002	0,009 ± 0,004	(-)
		Hígado	0,012 ± 0,005	0,071 ± 0,022	0,037 ± 0,008	
	Pb	Branquia	0,102 ± 0,119	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
		Hígado	1,437 ± 1,109	2,423 ± 1,248	1,229 ± 0,516	
	Ni	Branquia	1,87 ± 0,65	2,70 ± 1,42	3,04 ± 2,40	
		Hígado	3,01 ± 1,38	10,36 ± 4,12	4,94 ± 1,71	

(-) No colectado.

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Leidy Ortegon-Torres, Ketty Ordoñez-Osorio, Beatriz Henao-Murillo, Antonio Guio-Duque, Carlos Pelaez-Jaramillo. Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima. Revista Tumbaga (2014), 9 vol. I, 21-53.	Día/mes/año 19/10/2013	Día/mes/año 23/03/2014