

**USO DE BIOMARCADORES GENOTOXICOS E HISTOPATOLÓGICOS PARA
EVALUAR EL EFECTO DE LOS METALES EN LA TILAPIA (*Oreochromis
niloticus*) PRESENTE EN LA LAGUNA DE SONSO (VALLE DEL CAUCA)**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGOS.**

**ANGELA CRISTINA TELLO VALLEJO
PAOLÍN ROCÍO CÁCERES VÉLEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYAN
2009**

**USO DE BIOMARCADORES GENOTOXICOS E HISTOPATOLÓGICOS PARA
EVALUAR EL EFECTO DE LOS METALES EN LA TILAPIA (*Oreochromis
niloticus*) PRESENTE EN LA LAGUNA DE SONSO (VALLE DEL CAUCA)**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGOS.**

**ANGELA CRISTINA TELLO VALLEJO
PAOLÍN ROCÍO CÁCERES VÉLEZ**

**Director
GERARDO ANDRÉS TORRES M.Sc.
DOCENTE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**Asesores
SONIA GONZÁLEZ PINEDA M.Sc.
DOCENTE DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**SILVIO CARVAJAL M.Sc.
DOCENTE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYAN
2009**

Nota de aceptación

Director: Gerardo Andrés Torres M.Sc.

Jurado (a): Edna Orozco M.Sc.

Jurado (a): Nilza Velazco M.Sc.

Fecha de sustentación: 01 de Julio de 2009

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan los más sinceros agradecimientos a las instituciones y personas que participaron en el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación:

A la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación de la Universidad del Cauca por permitirnos entrar en sus venerables aulas y laboratorios

A la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad el Cauca por permitirnos trabajar en el desarrollo de los diferentes protocolos y actividades llevadas a cabo durante la realización de nuestro proyecto

Al M. Sc Gerardo Andrés torres por su apoyo bajo su dirección y permitirnos trabajar en el laboratorio de microscopía electrónica en el procesamiento de muestras y toma de fotografías

A la M. Sc Sonia González Pineda por su valiosa amistad y por darnos siempre consejos y sabiduría en el campo de la Histología

Al M. Sc Silvio Carvajal por su disponibilidad y orientarnos en el análisis estadístico de datos

A la Dra. Edna Orozco por su valiosa amistad y su incondicional apoyo durante mi formación académica

A la M. Sc Nilza Velasco por sus consejos para la corrección del proyecto

A la Lic. Patricia Mosquera por habernos brindado su amistad y conocimiento en Microscopía

Al Ing. Manuel Castrillón por brindarnos los conocimientos y consejos para el desarrollo del análisis digital de imágenes

A la Tc. Graciela Muñoz por su apoyo en el procesamiento de muestras

A mis amigos de la Unidad de Microscopía Electrónica por ser tan buenas personas y permitirme compartir su espacio de trabajo

A todas y cada una de las personas que nos ayudaron y permitieron compartir los mejores momentos en esta ciudad universitaria

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño...

A Dios que me brindó la oportunidad de vivir y concederme una familia maravillosa.

Principalmente a mis padres, Magola Vélez y Luis Cáceres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias padres por darme una carrera para mi futuro y por creer siempre en mis capacidades, aunque pasamos por momentos difíciles siempre me apoyaron y me brindaron todo su amor.

A mis hermanos, José Luis y Maria Camila por su comprensión en todos los momentos que dejamos de vivir juntos y por su incondicional cariño.

A mi abuelita Magola Chávarro y demás familiares, quisiera nombrarlos a cada uno de ustedes pero son muchos, eso no quiere decir que no me acuerde de cada uno, a todos los quiero mucho por haberme apoyado directa o indirectamente en el transcurso de este camino.

A todos mis amigos, muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde hemos vivido momentos felices y tristes inolvidables, gracias por ser mis amigos del alma y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

A mis profesores por confiar en mí, por ser tan buenas personas y compartir su tiempo y conocimiento, impulsando el desarrollo de mi formación profesional.

A la Universidad del Cauca y en especial a la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

Paolín Rocío Cáceres Vélez

Con el más sincero cariño y amor dedico esta tesis a:

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, brindándome salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor que me han enseñado a valorarte cada día más.

A mis padres Lilia Vallejo y Víctor Tello por haberme educado y apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores mostrados para salir adelante, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.
¡Gracias por darme la vida!

A mi hermana Sindy que es la fuente de mi inspiración para llegar hasta este lugar, le agradezco el cariño, la comprensión y la paciencia,

A todos mis familiares que me resulta muy difícil nombrarlos a todos que directamente o indirectamente participaron en el transcurso para culminar mi carrera profesional les agradezco el apoyo que me brindaron.

A mis todos mis amigos que nos apoyamos mutuamente y que formamos un equipo en nuestra formación profesional y por esto seguimos siendo amigos en especial a Árbol, les agradezco por todo lo vivido, el compartir momentos agradables y momentos tristes pero que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Siempre los recordare y llevare en mi corazón.

A mis profesores por tener la paciencia necesaria, por el gran apoyo más en los momentos difíciles y motivación para la culminación de mis estudios profesionales.
¡Gracias!

A la Universidad del Cauca y en especial a la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación que me dieron la oportunidad de formar parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

Ángela Cristina Tello Vallejo.

TABLA DE CONTENIDO

	pág
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1. Hipótesis.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo general.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. ANTECEDENTES.....	11
5. MARCO TEÓRICO.....	19
5.1. Biomarcadores.....	21
5.1.1. <u>Biomarcadores histopatológicos</u>	22
5.1.2. <u>Prueba genotóxica: prueba de micronúcleos</u>	23
5.1.3. <u>Lesión y adaptación celular</u>	26
6. METODOLOGÍA.....	29
6.1. Zona de estudio.....	29
6.2. Especie objeto de estudio.....	32
6.3. Recolección de muestras.....	33
6.4. Prueba Histopatológica.....	34
6.4.1 <u>Procesamiento de muestras para Microscopia Óptica de Alta Resolución (MOAR) y Electrónica de Transmisión (MET)</u>	34
6.4.2. <u>Procesamiento de muestras para Microscopía de luz</u>	34
6.4.3 <u>Analizador de imágenes LEICA Q550IW</u>	35
6.4.3.1. Segmentación.....	36
6.4.3.2. Morfometría y extracción de características.....	36
6.5. Protocolo para prueba de genotoxicidad (biomarcador de micronúcleos en eritrocitos de branquia).....	38
6.6. Análisis químicos.....	39
6.7. Diseño experimental.....	40
6.7.1. <u>Diseño del Muestreo</u>	40
6.7.2. <u>Diseño experimental para pruebas histopatológicas</u>	40
6.7.2.1. Factores.....	40
6.7.2.2. Variables dependientes o de respuesta.....	40

6.7.2.3. Análisis de biomarcador histopatológico.....	41
6.7.3. <u>Diseño experimental para prueba genotóxica.</u>	42
6.7.3.1 Variables independientes o factores.	42
6.7.3.2. Variables dependientes.	42
6.7.3.3. Análisis para evaluar efectos genotóxicos.	42
6.7.3.4. Prueba de análisis.	42
7. RESULTADOS	43
7.1. Registro de individuos	43
7.2. Resultados cualitativos del biomarcador histopatológico (variables independientes y de naturaleza cualitativa)	45
7.2.1. <u>Morfología e histología en branquia de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)</u>	45
7.2.1.1. Descripción histológica de la branquia de peces control.....	47
7.2.1.2. Descripción histológica de la branquia de peces expuestos.....	51
7.3. Morfología e histología en hepatopáncreas de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	62
7.3.1. <u>Descripción histológica del hepatopáncreas de peces control</u>	63
7.3.2. <u>Descripción histológica del hepatopáncreas de peces expuestos</u>	69
7.4. Resultados cuantitativos del biomarcador histopatológico (Variables dependientes o de respuesta)	72
7.5. Resultados de análisis de imágenes	80
7.6. Resultado de biomarcador genotóxico (Micronúcleos)	83
7.7. Resultados comparativos entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico	86
7.8. Resultados químicos	87
8. ANALISIS ESTADÍSTICO	90
8.1. Análisis estadístico del biomarcador histopatológico	90
8.1.1. <u>Datos Estadísticos del análisis morfológico de branquia de tilapia</u>	91
8.1.2. <u>Datos Estadísticos del análisis morfológico de hepatopáncreas de tilapia</u>	95
8.2. Comparación estadística del análisis morfológico de branquia de tilapia por medio de dos métodos de evaluación (Análisis de imágenes y observación)	97
8.2.1. <u>Test de Mcnemar</u>	97
8.3. Análisis estadístico del biomarcador genotóxico (Micronúcleos)	99
8.4. Análisis comparativo entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico	99
8.5. Análisis de datos químicos en tejidos	100
9. DISCUSIÓN	101
10. ALCANCES	106
11. RECOMENDACIONES	107
12. CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFÍA	110

LISTA DE CUADROS.

	pág
Cuadro 1. Tejidos seleccionados para los diferentes procesamientos.	34
Cuadro 2. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.	37
Cuadro 3. Lista de factores y sus niveles.	40
Cuadro 4. Lugar y fecha de los muestreos realizados.	43
Cuadro 5. Registro de especímenes muestreados en la Laguna de Sonso en época seca (19-09-08).	43
Cuadro 6. Registro de especímenes muestreados en la Laguna de Sonso en época húmeda (05-07-08).	44
Cuadro 7. Registro de especímenes muestreados en Río Patía en época seca (08-09-08).	44
Cuadro 8. Registro de especímenes muestreados en Río Patía en época húmeda (20-10-08).	44
Cuadro 9. Registro de las alteraciones histológicas de branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en el Río Patía (Peces Control) en época húmeda y seca.	72
Cuadro 10. Registro de las alteraciones histológicas de branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época húmeda y seca.	74
Cuadro 11. Registro de las alteraciones histológicas de hepatopáncreas de tilapia colectadas en el Río Patía (peces control) en época húmeda y seca.	76
Cuadro 12. Registro de las alteraciones histológicas de hepatopáncreas de tilapia colectadas en la Laguna de Sonso (peces expuestos) en época húmeda y seca.	78
Cuadro 13. Registro de las alteraciones histológicas de branquia de tilapia colectadas en el Río Patía (peces expuestos) en época húmeda y seca, comparadas con el análisis de imágenes Leica Q550IW.	81
Cuadro 14. Registro de las alteraciones histológicas de branquia de tilapia colectadas en la Laguna de Sonso (peces expuestos) en época húmeda y seca, comparadas con el análisis de imágenes. LEICA Q550IW.....	82
Cuadro 15. Registro de frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de branquia por individuo.	83

Cuadro 16. Registro de promedio de MN/2000 Células, desviación típica estándar y numero de muestra.	83
Cuadro 17. Comparación entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico.....	86
Cuadro 18. Concentraciones totales de cromo, plomo y mercurio en tejidos (mg/Kg peso) y en el agua.	88
Cuadro 19. Norma para los niveles máximos permitidos de mercurio, y plomo en peces y moluscos.	89
Cuadro 20. Datos estadísticos de presencia-ausencia de alteraciones vs. sitios de muestreo en branquia de tilapia.	91
Cuadro 21. Datos estadísticos de presencia-ausencia de alteraciones vs. épocas de muestreo en branquia de tilapia.	93
Cuadro 22. Datos estadísticos de presencia-ausencia de alteraciones vs. sitios de muestreo en hepatopáncreas de tilapia.	95
Cuadro 23. Datos estadísticos de presencia-ausencia de alteraciones vs. épocas de muestreo en hepatopáncreas de tilapia.	96
Cuadro 24. Características morfológicas normales.	97
Cuadro 25. Prueba diagnóstica de la aplicación.	98
Cuadro 26. Estadísticos de contraste entre los dos métodos de evaluación.	98

LISTA DE GRÁFICAS.

	pág
Gráfica 1. Diagrama de flujo del sistema implementado.	35
Gráfica 2. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en el Río Patía (Peces Control) en época seca.....	73
Gráfica 3. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en el Río Patía (peces control) en época húmeda.	73
Gráfica 4. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época Seca.	75
Gráfica 5. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Branquia en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época húmeda.	75
Gráfica 6. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Hepatopáncreas en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en el Río Patía (Peces Control) en época seca.....	76
Gráfica 7. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Hepatopáncreas en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en el Río Patía (Peces Control) en época Húmeda.	78
Gráfica 8. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Hepatopáncreas en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época Seca.	79
Gráfica 9. Abundancia de Alteraciones Histológicas de Hepatopáncreas en los peces (<i>Oreochromis niloticus</i>) colectados en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época Húmeda.	79
Gráfica 10. N° Promedio de micronúcleos/2000 células vs. Sitios.	84
Gráfica 11. N° Promedio de micronúcleos/2000 células vs. Época.	84
Gráfica 12. Comparación entre los biomarcadores Histopatológico y Genotóxico.....	87
Gráfica 13. Variación temporal de la concentración de cromo en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón.	88
Gráfica 14. Variación temporal de la concentración de plomo en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón. ...	89
Gráfica 15. Variación temporal de la concentración de mercurio en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón.	89

LISTA DE FIGURAS.

	pág
Figura 1. Formación de micronúcleos.....	25
Figura 2. Ubicación geográfica de la Laguna de Sonso (Gischler, 2005).....	29
Figura 3. Organismo de estudio: Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>). 1x.....	32
Figura 4. Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.	39
Figura 5. Branquia del organismo de estudio; Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>). 1x.....	45
Figura 6. Branquia de Tilapia, en donde se observa su morfología de mayor a menor orden de conformación. Estereoscopio Nikon SMZ800.....	46
Figura 7. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. H-E, 4x.....	47
Figura 8. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. H-E, 4x.....	47
Figura 9. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. H-E, 10x.....	48
Figura 10.A. Corte longitudinal de filamentos de Tilapia. H-E, 10x.....	48
Figura 10.B. Corte longitudinal de branquia de Tilapia, H-E, 10x.....	49
Figura 11. Corte longitudinal de filamento de la branquia de Tilapia H-E, 40x.....	49
Figura 12. Corte longitudinal de filamento de la branquia de Tilapia H-E, 40x.....	50
Figura 13. Corte longitudinal de un filamento de Tilapia. MOAR (Azul de Toluidina), 40x.....	50
Figura 14.A. Corte longitudinal de filamentos de una branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 10x.....	51
Figura 14.B. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 40x.....	51
Figura 14.C. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 40x....	51
Figura 14.D. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x..	52
Figura 15.A. Corte longitudinal de filamentos de una branquia de Tilapia. H- E, 40x.....	52
Figura 15.B. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 40x....	53
Figura 16.A. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x.....	53
Figura 16.B. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	54
Figura 16.C. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	54

Figura 16.D. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	54
Figura 17. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. H-E, 4x.	55
Figura 18. Corte longitudinal de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x.....	55
Figura 19. Corte longitudinal de filamentos de branquia de Tilapia H-E, 40x.....	56
Figura 20. Corte longitudinal de filamento de branquia de Tilapia H-E, 100x.....	56
Figura 21.A. Corte longitudinal de filamento de branquia de Tilapia H-E, 40x.....	57
Figura 21.B. Corte longitudinal de filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 40x.....	57
Figura 21.C. Corte longitudinal de filamento de branquia de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	58
Figura 22. Corte de una lamela de branquia de Tilapia. MET. 5000x	59
Figura 23. Corte de una lamela de branquia de Tilapia. MET. 5000x	60
Figura 24. Corte de una lamela de branquia de Tilapia. MET. 4000x	61
Figura 25. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. H- E 4x.	63
Figura 26. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. H- E, 40x.	63
Figura 27. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. A. Azul de Toluidina, 10x; B. H-E, 40x.	64
Figura 28. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. A. H-E, 10x; B. Azul de Toluidina, 10x.	65
Figura 29. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. H- E, 100x.	65
Figura 30. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. H- E, 10x.	66
Figura 31. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	67
Figura 32. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 10x	67
Figura 33. Corte transversal de la región del Páncreas de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	68
Figura 34. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. A. Azul de Toluidina, 40x; B. H-E, 100x	68
Figura 35. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x.	69
Figura 36. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x.	70
Figura 37. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 100x	70
Figura 38. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. Azul de Toluidina, 40x.....	71
Figura 39. Imagen de los tres filamentos de un individuo normal. H-E,10x.....	80
Figura 40. Imagen segmentada de los tres filamentos de un individuo normal. H-E,10x. Fuente: Manuel Castrillón.....	80
Figura 41. Eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de la Laguna de Sonso.100x.....	85

Figura 42. Micronúcleos observados en eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de la Laguna de Sonso.100x.	85
Figura 43. Eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de Río Patía.100x	85
Figura 44. Micronúcleo observado en eritrocitos de Branquia de <i>Oreochromis niloticus</i> colectadas de Río Patía.100x.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Alteraciones Adaptativas
AC: Alteraciones Citoplasmáticas
AD: Alteraciones Degenerativas
AT: Alteraciones Tisulares
ADDE: Alteraciones en la Distancia de Difusión Efectiva
Mn: Micronúcleo
F: Filamento
L: Lamela
B: Braquiespinas
AEF: Arteria Eferente del Filamento
AAF: Arteria Aferente del Filamento
D: Distal
P: Proximal
C: Cartílago
Mu: Músculo
Mn: micronúcleo
NVC: Vasos Nutricios Acompañantes
AAA: Arteria Aferente del Arco
EAA: Arteria Eferente del Arco
EL: Espacio interLamelar
EF: Espacio interFilamentar
TC: Tejido Conectivo
VC: Vaso sanguíneo Central
Er: Eritrocito
Mc: Mucosa
Pr: Pericondrio
TEP: Tejido Epitelial Plano
CP: Célula Pilar
TE: Tejido Epitelial
FL: Fusión Lamelar
Hs: Hiperplasia
Hf: Hipertrofia
At: Atrofia
Ds: Displasia

VDt: Dilatación de vasos sanguíneos

T: Tumefacción
SLs: Sustratos Lisosomales
N: Necrosis
Cr: Cariorraxis
Vc: Vacuolización
Cl: Cariólisis
Ed: Edema
If: Inflamación
LEp: Levantamiento del tejido Epitelial
CB: Conducto Biliar
V: Vena
Hp: Hepatocito
Cp: Cápsula
S: Sinusoide
A: Arteria
LH: Lóbulo Hepático
VC: Vena Central
AcH: Acino Hepático
AP: Acinos Pancreáticos
L: Luz
CC: Célula Cilíndrica
g: Gránulo
FM: Figura Mitótica
FMN: Fragmentación de la Membrana Nuclear
FMC: Fragmentación de la Membrana Celular
Ct: Citoplasma

GLOSARIO

BIOMARCADOR: alteración bioquímica o biofísica detectable, o manifestación celular ocasionada por estrés ambiental.

ERITROCITOS: células sanguíneas con núcleo encargadas de transportar oxígeno a los tejidos del organismo, estas células fueron las empleadas en el estudio para observar los micronúcleos

HISTOPATOLOGÍA: cambios morfológicos a nivel celular y tisular dados por anomalías en el metabolismo por la integración de sustancias extrañas y/o tóxicos en los organismos.

METALES: grupo de metales comprendidos entre el número atómico 21(Escandio) y 84 (Polonio) de la Cuadro periódica. Se califican como potencialmente tóxico para los seres vivos. Se tuvo en cuenta el cromo, plomo y mercurio para esta investigación.

MICRONÚCLEO: fragmento acentromérico o un cromosoma rezagado que no son alados por el huso acromático en la etapa de anafase en la mitosis, estos son envueltos por una membrana en la etapa de telofase y después de que se da la citocinesis es cuando se va a observar que una de las dos células hijas tiene el micronúcleo.

TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*): pez originario de África central y del Norte.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la exposición a metales (Cromo, Plomo, Mercurio) mediante el uso de biomarcadores histopatológicos y genotóxicos en Tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la Reserva Natural Laguna de Sonso, Valle del Cauca.

Se realizaron dos muestreos de los organismos expuestos, en la laguna de Sonso, y dos muestreos testigo en el río Patía, cubriendo las temporadas húmeda y seca, con un total de treinta y seis (36) peces. Se incluyeron en parafina y en resina, se cortaron con micrótopo y se tiñeron con Hematoxilina- Eosina y Azul de Toluidina, respectivamente. Simultáneamente, las muestras se observaron en un microscopio óptico con un aumento de 10x y se tomaron fotografías de tres filamentos de la branquia de cada individuo y se evaluaron con el software de Análisis de imágenes. Para la prueba de micronúcleos se realizaron extendidos de sangre branquial teñidos con Giemsa 5% (2000 células /pez).

Las alteraciones observadas con mayor frecuencia en branquia de Tilapia Nilotica son las Adaptativas y Tisulares; mientras que, en hepatopáncreas fueron las Citoplasmáticas y Degenerativas. Los dos métodos diagnósticos (Análisis de imágenes y Observador) coinciden en los resultados tanto negativos como positivos. La prueba genotóxica realizada fue estadísticamente significativa en la Laguna de sonso: 4.78 Micronúcleos con respecto a la encontrada en el Río Patía: 0,15 Mn. Este incremento fue independiente de la época (no hubo interacción: $p > 0.05$). Al comparar las dos épocas (seca MN 3.21 y Húmeda: Mn 3.00) no se identificó una diferencia significativa entre ellas para la inducción de micronúcleos. Al comparar los biomarcadores usados en *Oreochromis niloticus* se encontró una correlación estadísticamente significativa, complementándose.

Aunque los resultados histopatológicos y genotóxicos revelaron la presencia de alteraciones, los niveles de acumulación de los metales (Cromo, Plomo, Mercurio) reportados en los tejidos de los peces colectados NO exceden los niveles permisibles para la fauna acuática.

Palabras claves: Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*), Micronúcleos, Histopatología, Metales, Genotoxicidad, Biomarcador, Análisis de imágenes.

INTRODUCCIÓN

El uso de los metales en actividades agroindustriales ha generado un desequilibrio ambiental perturbando los ecosistemas y los organismos con efectos a corto (tóxico) y largo plazo (efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos).

Es el caso de 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 esta Reserva existen pocos reportes de investigaciones sobre los efectos de los metales en organismos como los peces, especialmente en Tilapia (*Oreochromis niloticus*); excepto, el trabajo realizado por Gischler en el 2005. De otra parte no existen estudios en el cual se utilicen biomarcadores histopatológicos y genotóxicos para evaluar los efectos de la exposición a diferentes contaminantes en la biota acuática en este ecosistema. *Oreochromis* es un género ampliamente usado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenesis por su sensibilidad (Cavas, Ergene-Gozukara. 2003). Por ello, una especial atención ha sido dada en varios estudios a los peces como posibles monitores biológicos en muchos campos de la ciencia (Bolis *et al.*, 2001) incluida la contaminación genotóxica (Al Sabti y Metcalfe, 1995). 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. Esto fue observado por De Flora *et al* (1991) en una reseña de 53 páginas en 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 (Lemos *et al.*, 2007).

Los primeros estudios realizados *in vivo* e *in situ* en sistemas ícticos, para evaluar efectos genotóxicos, teratogénicos de aguas contaminadas (Hooftman y De Raat, 1982; Al-sabti, Metcalfe.1995; Grisolia, Cordeiro. 2000) demuestran lo ventajoso que resulta el uso de organismos como los peces por la facilidad con que se adaptan y mantienen.

Otra de las razones por lo cual se seleccionó la Tilapia *Oreochromis niloticus* es por ser una de las especies mas abundantes de la Laguna de Sonso. A demás, 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). Es así como la Tilapia (*O. niloticus*) se convirtió en la especie de mayor importancia en la pesquería por encima de especies tradicionalmente importantes como el Bocachico. Su abundancia en la Laguna de Sonso 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 en la cuenca del alto Cauca, reproducción durante todo el año puesto que alcanza su madurez sexual a los tres meses, elevada fecundidad y protección de la prole (Royero y Lasso, 1992).

En la actualidad, se recomienda usar diferentes biomarcadores (Poonam, Farhat; 2004) que permitan evaluar interdisciplinariamente cualquier tipo de daño causado en un individuo por contaminantes (metales); por esta razón en el presente estudio se usaron dos biomarcadores (genotóxico e histopatológico).

Se empleó como biomarcador genotóxico la prueba de micronúcleos en eritrocitos de branquia de peces por la sensibilidad, facilidad de ejecución, lectura, bajo costo, efectividad y precisión (Hooftman y De Raat, 1982) en la evaluación del efecto genotóxico en aguas contaminadas y como biomarcador Histopatológico se aplica en la determinación de daños a nivel tisular causados por la acumulación de metales (rastreo de metales). Este último biomarcador fue una herramienta muy útil y de fácil entendimiento en el presente investigación en cuanto al rastreo de metales se refiere, lo cual es confirmado por Rabitto *et al.*, 2005.

Es de gran importancia dar a conocer los resultados de este proyecto a las comunidades y entidades de control ambiental con el fin de apoyar la toma de decisiones que ayuden a reducir el impacto ambiental generado por la actividad industrial de esa zona.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Reserva Natural Laguna de Sonso, es uno de los humedales más representativos del Valle del Cauca. Su importancia ecológica radica en su alta biodiversidad lo cual hace de ella un ecosistema estratégico en la región, además de su importancia sobre la regulación hidrológica del Río Cauca. Su conexión con el Río ha traído como consecuencia un deterioro de la calidad de sus aguas, por la influencia de la carga de contaminantes en forma de sedimentos y vertimientos agroindustriales, drenajes de la minería y aguas negras de las poblaciones humanas circunvecinas que fluyen a lo largo de la cuenca alta del Río Cauca. La actividad industrial en ciudades aledañas como Yumbo, Palmira y Cerrito son responsables en gran parte de la contaminación por metales de este ecosistema (Gischler, 2005).

Las actividades antrópicas han tenido un fuerte impacto en el ecosistema Bosque Seco Tropical Inundable y su biodiversidad por la transformación del paisaje y la fragmentación del hábitat, la introducción y el transplante de especies, sobreexplotación de los recursos y contaminación, así como a causas indirectas como la expansión agrícola, débil capacidad institucional para reducir los impactos y principalmente un desconocimiento del potencial estratégico de la biodiversidad (Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC, 2007).

Los metales son elementos esenciales para las plantas y animales, algunos de ellos requeridos en pequeñas cantidades llamados “elementos traza”, entre los cuales se encuentra Co, Cr, Cu, Mo y Zn. Sin embargo, estos pueden ser tóxicos si se presentan en exceso como en el caso del Cd, Hg y Pb que no tienen ninguna función biológica conocida y en consecuencia pueden producir serios problemas a la salud humana.

Estudios como el de Gischler en el 2005 y el Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC en el 2007, describen varias problemáticas que se presentan en la Laguna de Sonso, los cuales han servido de guía para la realización de nuestro trabajo:

- Construcción de la vía Buenaventura – Buga (1968), en donde se interrumpió en estaciones secas el flujo normal del agua de la Laguna de Sonso hacia el Río Cauca por taponamiento del Caño Carlina (obstáculo

para evacuación de sedimentos), además, perdió profundidad. Para reducir esto, se construyó un canal que sin embargo no solucionaba los problemas de sedimentos.

- Construcción de la represa La Salvajina (1983), a pesar de regular el caudal del río Cauca y generar importantes ahorros por evitar costos de inundación, se ha observado la pérdida de fertilización natural de los suelos, disminución de la renovación de las aguas en Madreviejas y desaparición paulatina de la mismas; confinamiento de la laguna de Sonso, incrementado la tasa de sedimentación en la laguna la cual redujo y limitó la cantidad total del agua de la laguna de Sonso.
- Los cultivos de caña presentes cerca de la Laguna han provocado el crecimiento excesivo del Buchón de Agua que absorbe por sus raíces residuos de fertilizantes, herbicidas y pesticidas, entre otros (población sin saneamiento básico); teniendo en cuenta que estos van directamente al río Cauca. Agregado a esto, hay excesiva eutroficación por la muerte y descomposición de los mismos en los sedimentos, provocando disminución del oxígeno disuelto del agua (condiciones anóxicas).
- Las poblaciones Puerto Bertín y Porvenir están relacionadas directamente con la Laguna, pues de ella depende su alimentación, su mantenimiento y su economía.
- Presencia de especies introducidas como la *Rana castebiana*, *Oreochromis niloticus*, *Eichhornia crassipes*, las cuales han tenido poca regulación biológica y ecológica.
- Aproximadamente el 70% de las aguas negras de Cali son descargadas directamente al río Cauca, pues las plantas de tratamiento ubicadas en Cali, Yumbo y Palmira solo hacen tratamiento primario (sólidos suspendidos).
- La construcción del Relleno Sanitario Navarro está ubicado cerca de un acuífero del río Cauca (a 5 Km). En 1969 cuando Navarro empezó a funcionar solo se trataba de un contenedor y no le hacían tratamiento a los lixiviados. Aunque actualmente se les realiza tratamiento a esta agua, constituye un riesgo para la calidad del agua subterránea.
- Limitación geográfica de la laguna y uso inadecuado de la misma: dueños de predios suelen no respetar el área de protección de la laguna (30m desde el borde), falta de reconocimiento del área que es propiedad de la laguna de Sonso, extracción ilegal de agua para riego de plantaciones, así como la utilización de motores fuera de borde en el espejo lagunar.

Uno de los grupos que se utilizan como centinelas de genotoxicidad son los peces, que de igual forma brinda información de la calidad de las aguas, por la capacidad de acumulación de contaminantes y metabolizar xenobioticos. Debido a esto, se escogió para este estudio el genero *Oreochromis*, el cual es ampliamente utilizado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogénesis (Cavas, Ergene-Gozukara. 2003). Un problema grave es la amplificación biológica (biomagnificación) de estos contaminantes en la cadena trófica, por esta razón evaluamos una especie altamente consumida por las comunidades asentadas cerca a la laguna conocida como Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Gischler, 2005; Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC, 2007).

Según el Plan de Manejo Ambiental Integral de la Laguna de Sonso (CVC, 2007), los metales son bioacumulables: a más alto en la cadena trófica más alta la toxicidad:

- **Nivel I:** Algas y detritus
- **Nivel II:** Invertebrados bentónicos y Fitoplancton
- **Nivel III:** Zooplancton
- **Nivel IV:** Ictiofauna omnívora (como tilapia y corronchos). Los piscívoros son los que acumulan mayor cantidad de metales porque se alimentan de peces contaminados (Humanos, camarones, bagres, tucunaré, etc.)

Hay tres principales tipos de peces en la Laguna de Sonso, las cuales son consumidas por la gente diariamente, estas son: La Tilapia (*Oreochromis niloticus*) la cual se escogió como organismo de estudio, Bocachico (*Prochilodus reticulates*) y Corroncho (*Chaetostoma fischeri*) (Escobar, 1998).

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 (Lemos *et al.*, 2007).

Con base en la problemática expuesta, se plantearon las siguientes preguntas de

investigación:

- ¿La exposición a metales induce micronúcleos en los eritrocitos de la branquia y daños en los tejidos de *Oreochromis niloticus*?
- ¿Existe una relación entre los biomarcadores histológicos y genotóxicos respecto a los niveles de contaminación de metales en el ecosistema?

1.1. Hipótesis

- Si la exposición a metales afecta la especie *Oreochromis niloticus*, se espera que se incremente la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de peces expuestos con relación a la frecuencia de micronúcleos de peces no expuestos.
- Los niveles de acumulación de metales se verán reflejados en la presencia de lesiones celulares y en los tejidos estudiados de los organismos expuestos en contraste con los organismos testigo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a metales (Cromo, Plomo, Mercurio) mediante el uso de biomarcadores histopatológicos y genotóxicos en Tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la Reserva Natural Laguna de Sonso, Valle del Cauca.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar una evaluación del efecto genotóxico *in vivo* por exposición a metales en eritrocitos de branquias de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) mediante la presencia de micronúcleos.
- Determinar la frecuencia de micronúcleos de los peces expuestos versus no expuestos.
- Evaluar las alteraciones histológicas de Branquia y Hepatopáncreas en *Oreochromis niloticus*.
- Relacionar los niveles de concentración de metales con los biomarcadores usados en Hepatopáncreas y branquia.

3. JUSTIFICACIÓN

El impacto sobre el medio natural creado por actividades agroindustriales, crecimiento demográfico y económico, suelen reflejarse en la pérdida de biodiversidad, en forma de empobrecimiento de los ecosistemas, contracción de las áreas de distribución de las especies e incluso extinción de razas locales o especies enteras.

La Laguna de Sonso por su cercanía a la zona industrial de Yumbo (Valle del Cauca) está expuesta a contaminación por parte de los desechos expulsados de las fábricas, emanación de gases como el dióxido de carbono, residuos orgánicos e inorgánicos producidos por la comunidad aledaña, mostrando la presencia de metales (Cromo, Plomo y Mercurio) en dicho ambiente natural. Debido a esto, los organismos que viven en dicha laguna también son afectados por las causas anteriormente mencionadas, especialmente los organismos acuáticos que metabolizan directamente esas sustancias por pertenecer a ese medio. Además Los residuos de las actividades industriales, agrícolas y mineras son los responsables del aporte de los metales a las corrientes superficiales. Los metales son muy contaminantes debido a que no son biodegradables, son bioacumulables en formas orgánicas e inorgánicas y permanecen en el ambiente por largos periodos de tiempo (Gischler, 2005; Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC, 2007).

Gischler (2005) identificó las vías de migración de metales (Mercurio, Plomo y Cromo) hacia la Laguna de Sonso por el Río Cauca. 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).

El uso de biomarcadores es muy común, en este caso se utilizó un biomarcador histopatológico que arrojó información acerca de los eventos continuos de exposición de agentes tóxicos que causan alteraciones histológicas en tejidos como el Hepatopáncreas y la branquia de la Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Algo muy importante es que estos biomarcadores son herramientas extrapolables a poblaciones humanas, lugares e individuos inaccesibles (Poonam, Farhat; 2004).

La histopatología es una herramienta útil y poderosa para estudios toxicológicos en la evaluación de metales como el Plomo, Cromo, Mercurio (de interés en nuestro estudio) y otros metales, ya que, la histopatología de un organismo representan el tiempo de integración del impacto endógeno y exógeno. Además, sirve como alarma temprana de un efecto que se expresa a largo plazo y que muchas veces es irreversible (Rabitto *et al.*; 2005).

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 evaluados (Cromo, Plomo y Mercurio), por esta razón es importante determinar lo qué se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético, realizando ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria en poblaciones de riesgo. Los organismos acuáticos como los peces han sido empleados desde muchos años para detectar la polución acuática y determinar la actividad genotóxica de diferentes sustancias en ambientes acuáticos (Hoofman y De Raat, 1982).

Este modelo cobra importancia por la gran similitud entre el sistema enzimático del metabolismo del pez y de los vertebrados superiores, que a menudo responde a los químicos tóxicos de manera muy parecida y por lo tanto pueden emplearse para determinar el potencial efecto mutagénico, carcinogénico y teratogénico a mediano y largo plazo en el hombre.

El ensayo de micronúcleos es ahora considerado un ensayo práctico, universalmente validado y de fácil acceso, para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos (Fenech, 2000).

La combinación de biomarcadores genotóxicos e histopatológicos proporcionaron una mayor sensibilidad y precisión en los resultados del presente trabajo, sobre los efectos inducidos por contaminación ambiental, en donde se conocen las causas y las relaciones entre la exposición a los contaminantes (metales) y su respuesta a nivel biológico (Rabitto, *et al.*, 2005; Sanchez, 1998; Elahee, 2006; Raldúa, 2006; Kakkar, 2005).

En consideración a las razones anteriormente expuestas y con base a la problemática ambiental de la Laguna de Sonso se hace necesario mayor número de estudios multidisciplinarios con el uso de biomarcadores para la evaluación y monitoreo ambiental de ecosistemas de gran importancia como los humedales con el fin de desarrollar estrategias para darle soluciones seguras a esta problemática. De otra parte, este es el primer trabajo con la aplicación de biomarcadores en este ecosistema el cual se constituye un aporte preliminar en la implementación de metodologías novedosas y complementarias a las tradicionales.

4. ANTECEDENTES

Autores como Pooman *et al* (2004), Viarengo *et al* (2007) y Kakkar *et al* (2005) hicieron énfasis en los biomarcadores como herramientas indispensables en la identificación de exposición a tóxicos como los metales, 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.

Cajaraville *et al* (2000) propone el uso de biomarcadores para evaluar el impacto de la contaminación ambiental por contaminantes como metales, xenobioticos, 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 brandaris*, encontrando resultados positivos en cuando a los efectos de contaminantes.

Hay muchos científicos que usan organismos centinelas (peces) como modelos en la investigación de cultivo de tejidos, ecotoxicología, farmacología, genética, entre otros campos. Dentro de estos autores se incluyen Viarengo *et al* (2007) y Bolis *et al* (2001), quienes también propusieron el uso de biomarcadores en monitoreos ambientales teniendo en cuenta organismos (centinelas) que desarrollan síndrome de estrés por exposición a diferentes contaminantes en, desarrollando conceptos sobre los biomarcadores y su uso.

Evans (1987) sugiere que la branquia de peces puede ser usada como modelo en estudios de los efectos generales de los tóxicos en el transporte de iones en membranas epiteliales branquiales; usando el pez *Opsanus beta*.

Has-Schön *et al*(2006) realizaron una investigación sobre la concentración de metales 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) incluídos 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.

Castro *et al* (2008) realizan estudios sobre las implicaciones del consumo de peces contaminados con metales en poblaciones humanas y los problemas de bioacumulación. Mencionaron que este último dependía de diferentes factores intrínsecos (peso, edad, talla, sexo del pez) y extrínsecos (temperatura, pH, oxígeno disuelto en el agua y forma química del metal), en su estudio tuvieron en cuenta el mercurio, cadmio, plomo y arsénico en peces como Barbudo, Carpa, Salmón, Bagre y la Anguila de España y Egipto. Rabitto *et al* (2005) realizó un estudio similar pero se centró en el plomo y tributiltin en *Hoplias malabaricus* usando la microscopía de luz y electrónica de transmisión.

Rank *et al* (2007) destacó la importancia de los biomarcadores y su correlación positiva con el daño en el ADN y la inhibición de la acetilcolinesterasa por tóxicos (químicos industriales) en *Mytilus edulis* (Dinamarca).

Perry *et al* (1997, 1998) relacionó y estableció la importancia de las células cloruro de la branquia con la transferencia de gases y osmoregulación iónica en peces dulceacuícolas, estableciendo que lamelas con grosores mayores a 7 micras minimizan la eficiencia respiratoria. Pratap *et al* (1993) mencionaron lo mismo pero en *Oreochromis mossambicus* expuesta al cadmio.

The *et al* (1997) Pauer *et al* (1998) evaluaron los cambios ultraestructurales en hígado, riñón, bazo y branquia de peces. En *Salmo trutta* y *Barbatula barbatula* expuestos a contaminantes, encontraron alteraciones como dilatación del retículo endoplasmático, hiperplasia, hipersecreción, levantamiento epitelial, gran número de células mucosas; en *Lepomis auratus*, colangiomas en hígado y bazo; en *Micropterus salmoides*, hiperplasia ductular y preductular biliar, hepatocitos basófilos hiperplásicos y lipidosis.

Poleksic *et al* (1999) evaluaron bioquímica e histológicamente los efectos del Trifluralin (herbicida) en la Carpa, encontrando en hígado, riñón y branquia alteraciones como vacuolización de hepatocitos, hiperplasia, fusión lamelar, edema subepitelial e hipertrofia de células cloruro.

Pacheco *et al* (2002) se basaron en la biotransformación de los tóxicos (benzopireno, hidrocarburos aromáticos policíclicos) y sus efectos a nivel genotóxico e histopatológico en *Anguilla anguilla* L., hallando alteraciones

branquiales como hipertrofia, recubrimiento de lamelas secundarias, vacuolización, necrosis, atrofia de hepatocitos, agregados de macrófagos en órganos como la piel, hígado y bazo. En 2003, Thophon *et al.*, encontraron en el Róbalo alteraciones similares en branquia, hígado y riñón por exposición aguda y subcrónica al cadmio.

Afirmando lo anterior, Nero *et al* (2006) mencionan que los cambios histopatológicos en branquia e hígado de *Perca flavescens* y *Carassius auratus* acusados por exposición a arenas petrolíferas (Ácido naftenico, hidrocarburos aromáticos policíclicos) producen dichas alteraciones en branquia mediante el uso de índices morfométricos.

Cengiz (2006), Raldúa *et al*, Ayas *et al* (2007), Giari *et al* (2008); realizaron estudios similar en branquia, riñón, hígado, intestino y músculo de *Cyprinus Carpio*, *Barbus graellsii*, *Dicentrarchus labrax* y *Alburnus alburnus* por exposición al deltametrin y metilmercurio, respectivamente. Estos autores emplearon la microscopía de luz y electrónica de transmisión para sus estudios.

En cuanto a metales como el cadmio y cromo, Alazemi *et al* (1996), Giari *et al* (2007); evaluaron sus efectos ultraestructuralmente en cuanto al daño branquial en *Gnathonemus petersii*, *Dicentrarchus labrax*, encontrando alteraciones similares a las mencionadas anteriormente.)

En el mismo año, Zhang *et al*, evaluaron el impacto ambiental por contaminación con mercurio en China, teniendo en cuenta los efectos adversos para la salud de las poblaciones residentes en lugares contaminados con este metal.

Bernet *et al* (1999) propuso un protocolo pionero para la evaluación de cambios histopatológicos en peces. Esta publicación fue tomada en cuenta en la mayoría de las investigaciones mencionadas y relacionadas con la contaminación ambiental acuática.

Ferguson (2006) redactó un atlas sobre las patologías sistémicas presentadas en teleósteos teniendo en cuenta sus patrones normales, haciendo descripciones de órganos como branquia, hígado, riñón, bazo, entre otros.

Escobar en 1998, realizó un estudio hidrobiológico de la laguna de Sonso, con el apoyo de la Universidad del Valle y la CVC.

En el 2007 se desarrolló el Plan de manejo ambiental integral - humedal laguna de sonso - municipio de Guadalajara de buga. ASOYOTOCO, Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca dirección técnica ambiental (convenio 136 de 2005).

Gischler (2005) investigó en la Laguna de Sonso las rutas de traslado de metales como el cromo, plomo, mercurio y sus consecuencias para las poblaciones aledañas que consumen especies como la Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Rana toro, Corroncho y también tuvo en cuenta el Jacinto de agua.

En cuanto al empleo de análisis de imágenes tenemos:

De los estudios tenidos en cuenta, el más antiguo es el que realizaron Lewis *et al* en 1975, donde se evaluó morfométricamente la branquia de *Lampetra fluviatilis*, contando el número de filamentos y lamelas (por filamento) por medio de un medidor automático de área.

Posteriormente otros autores como Sanchez *et al* (1997 y 1998) plantearon algunos parámetros morfométricos como la hiperplasia, edema lamelar, inflamación, fusión lamelar, densidad de células mucosas y engrosamiento lamelar (porcentajes de extensión) en *Oncorhynchus mykiss* asociado a contaminación por cloraminas y formalina (uso en acuicultura); empleando la microscopía electrónica de transmisión y de luz.

Mondadori *et al* (2007) realizaron una caracterización morfométrica ultraestructural en folículos ováricos de *Bubalus bubalis*, usando la microscopía de luz y electrónica de transmisión para medir el diámetro de los folículos primordiales, primarios, secundarios y el oocito. En el mismo año Elahee *et al* plantearon parámetros hematológicos e histopatológicos en branquia de tres especies de peces (*Scarus ghobban*, *Epinephelus merra*, *Siganus sutor*) muestreados en una laguna localizada al oeste de Mauritius

Narváez *et al* (2005) hicieron morfomediciones en poblaciones naturalizadas y domesticadas de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) en el norte de Colombia, identificando tres morfotipos, uno para cada categoría de sistema (dulceacuícola, estuarino y alcalino).

Sanz *et al* (2006) afirmaron que la morfología de diferentes órganos y/o estructuras, mediante la valoración a simple vista o a través de una imagen,

requiere una valoración mas precisa para la cuantificación de determinadas estructuras por medio de una herramienta que brinda información adicional sobre la forma y el estado en que se encuentran los elementos en estudio, el analizador de imágenes.

Castrillón en el 2006 programó un analizador de imágenes para que realizara medidas automáticas previas a la estandarización de esta técnica de procesamiento digital de imágenes en el análisis de biopsias renales

Verján *et al* (2001) realizaron la sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana y algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente.

En el campo de la toxicología acuática inicio la experimentación con especies ícticas. Los peces son cada vez mas utilizados como modelos experimentales en estudios de biomédica.

La prueba de micronúcleos representa una herramienta importante para el diagnostico ambiental de áreas bajo la influencia humana, para detectar agentes mutagénicos (Belfiore y Anderson, 2001). Sin embargo en vertebrados acuáticos esta prueba ha sido ampliamente usada para probar la influencia de contaminación en ambientes acuáticos especialmente en peces (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Sanchez-Galan *et al.*, 1998; Ergene *et al.*, 2007; Deguchi *et al.*, 2007).

Hooftman y De Raat en el año 1982, modificaron la prueba de micronúcleos, siendo los primeros investigadores en utilizar eritrocitos de sangre periférica de peces bajo condiciones de laboratorio, evaluaron el Etilmetanosulfonato en *Umbrapygmea*, la ruta de exposición utilizada fue intraperitoneal, obteniendo resultados positivos.

En el estudio del efecto genotóxico en eritrocitos de branquia de Tilapia mossambica (*Oreochromis mossambica*) con Cloruro de Cadmio, evaluado por Manna y Sahukhan en 1986, se encontró una frecuencia de 127 micronúcleos comparado con un numero espontáneo de 10 micronúcleos en 1000 células. Simultáneamente extrajeron las células de riñón, donde encontraron frecuencias de micronúcleos significativamente más altas en los peces expuestos comparados con la frecuencia de los peces expuestos al control negativo.

Das y Nanda en 1986, estudiaron los desechos contaminantes de ríos de una fabrica de papel utilizando eritrocitos de pez gato (*Heteropneustes fossilis*), donde

se obtuvo un incremento en las frecuencia de micronúcleos a medida que aumentaban las concentraciones.

En 1987, Hose *et al*, en un estudio *in situ* investigaron la genotoxicidad de hidrocarburos clorinados DDT y PCB en eritrocitos de corvina blanca (*Genyonemus lineatus*) y en cabrilla sargacera (*Paralabrax clathratus*) encontrando en las áreas contaminadas frecuencias mas elevadas que las de las áreas menos contaminadas de California del sur.

Al-Sabti y Hardig en 1990, probaron la inducción de micronúcleos en eritrocitos de Perca (*Perca Fluviatilis* L.) expuesta a desechos industriales en el mar Báltico, los resultados de esta investigación mostraron una disminución en la inducción de frecuencia de micronúcleos con el incremento en la distancia de los sitios de muestreo de los puntos de descarga de desechos.

Para determinar si existen compuestos contaminantes De Flora *et al* en 1993, emplearon Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), encontrando que el daño citogenético fue demostrado por un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de 0.3% a 1.1%.

Los efectos genotóxicos de bajas concentraciones de Mercurio Hg⁺², Selenio VI, Cloruro de Metilmercurio (CH₃HgCl) fueron analizados por Al-Sabti en 1994, en una prueba *in vitro* con eritrocitos binucleados de Carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*), en donde se utilizó citocalasina para bloquear la citocinesis, los resultados mostraron una frecuencia de micronúcleos elevada en la dosis dependiente en todos los tratamientos comparados con los controles.

Al-Sabti en el año 1995, desarrolló la técnica del bloqueo de citocinesis de células hepáticas de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) evaluando metales como el selenio, mercurio y metil-mercurio y junto con Metcalfe, 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.

En 1996, Minissi *et al*, emplearon eritrocitos de Barbo (*Barbas perplejus*) de dos ambientes naturales y detectaron mutágenos en agua natural en riveras del Tibet y Mignone mediante un muestreo en diferentes épocas del año.

Sanchez *et al* en 1997, determinaron el numero de micronúcleos en eritrocitos de riñón de Salmón (*Salmo trutta*), expuestas a contaminantes por influencia antrópica en los diferentes ecosistemas acuáticos de Asturias (España).

Grisolia y Starling en el 2000, monitorearon tres sitios en diferentes estados de antropización del lago Paraná en Brasil, utilizando las especies Tilapia herbívora (*Tilapia rehendáis*) y Carpa común (*Cyprinus carpio*) en las cuales la frecuencia de micronúcleos fue muy baja con una diferencia estadística no significativa entre los sitios muestreados aunque la frecuencia en los peces tratados con ciclofosfamida fue muy alta.

En 2002, Grisolia y Palhares, realizaron una comparación entre la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos de riñón y branquia en Tilapia herbívora (*Tilapia rehendáis*), Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con tratamientos de mitomicina C y ciclofosfamida. La frecuencia de eritrocitos micronucleados varió significativamente entre los individuos tratados pero no entre la frecuencia de micronúcleos de riñón y branquia. Teniendo la tilapia herbívora niveles más altos de eritrocitos micronucleados en comparación con la tilapia nilótica.

La investigación del efecto cito-genotóxico de efluentes de industrias textiles en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de branquia realizado por Cavas y Ergene-Gözükara en 2003, obtuvo una frecuencia de micronúcleos significativa. En este mismo año, en la Universidad del Cauca, Muñoz y Guerrero, realizaron la inducción de micronúcleos in vivo e 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.

En el año 2004, Russo *et al.* probaron el daño biológico causado por la exposición de *Gambusia holbrooki* a agentes mutagénicos presentes en las aguas contaminadas del Río Samo. Los resultados indicaron unos valores estadísticamente más altos de micronúcleos en los individuos de Río Samo que los micronúcleos de los individuos muestreados de las aguas del cráter de la Reserva Natural de Astroni como controles negativos.

Los efectos mutagénicos de la contaminación por mercurio por la prueba de micronúcleos en tres especies de peces amazónicos realizado por Porto *et al* (2005), determinó que las frecuencias medias de micronúcleos observados en *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventris* (omnívoro) y *Hoplias malabaricus* (piscívoro) del Río Madeira (área contaminada) fueron significativamente más altos que las frecuencias de las mismas especies del Río Solimoes (área no contaminada).

Souza *et al* en el año 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 encontrando como resultado una alta incidencia en ambas pruebas.

Talapatra y Barnerjee en 2007, para la determinación de los efectos genotóxicos en la especie *Labeo bata*, utilizaron los eritrocitos de branquia y riñón para la detección de micronúcleos y núcleos anormales. En los resultados se obtuvo diferencias significativamente altas para las frecuencias de micronúcleos en la branquia y riñón de los peces experimentales.

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 como: un biomarcador de la salud individual de los peces, un biomarcador genotóxico: la prueba de micronúcleos; y biomarcadores específicos de exposición a contaminantes tales como Metalotioneína y la actividad de la acetilcolinesterasa. 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.

Hoshina *et al* en 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, utilizaron para las pruebas de micronúcleos y alteraciones nucleares los eritrocitos de *Oreochromis niloticus*, obteniendo como resultado que los tratamientos usados por la refinería disminuyen el daño citogenético, aunque no es completamente efectivo.

5. MARCO TEÓRICO

Los metales son un grupo de metales comprendidos entre el número atómico 21 (Escandio) y 84 (Polonio) a excepción el aluminio con número atómico 13 considerado como Metal Pesado, estos califican como potencialmente tóxicos para los seres vivos (Gischler, 2005).

El Mercurio 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 (Guía de Protección Ambiental, 2006). El nivel de acumulación del mercurio depende de la edad, talla y nivel trófico (Wong, 2007). Por ello, organizaciones como la EPA en 1999, establece la dosis de referencia (RfD) para el consumo de alimentos contaminados o expuestos al Mercurio (0,1 µg (Kg bw d)).

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 (Guía de Protección Ambiental, 2006). Específicamente, el Plomo inhibe o inactiva enzimas por unión al grupo sulfidrilo de las mismas (Gwaltney- Brant, 2002), a demás, se dice que una dieta baja en calcio, puede aumentar significativamente los niveles de plomo en sangre (Borden *et al.*, 1992). En el 2001 la EEC 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 (Guía de Protección Ambiental, 2006).

Los metales 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 de sólidos suspendidos (Cantera y Blanco 2001, Peña, et. al. 2001). La persistencia de metales como plomo, cromo y mercurio 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 (Silverberg, *et al*/1975; Happala, 1998), 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) 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 y b) 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. 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, *et al.*; 2007).

Se tiene información donde afirman que aún a bajas concentraciones, los metales tienen la habilidad de ser tóxicos y perjudiciales (Sato, 2000; Devlin, 2006; Hinton *et al.*, 1978; Hinton *et al.*, 1990; Alazemi, 1996; Pauer *et al.*, 1998; Topón, 2003; Mallat, 1985; Giari *et al.*, 2007; Braunbeck, 1998); además, se correlacionan positivamente las concentraciones de metales en agua con las concentraciones de los mismos en los tejidos de peces (Svobodova *et al.*, 1996).

5.1. Biomarcadores

Autores como Elahee en el 2006, Kakkar, 2005, Raldúa en el 2006, Poonam y Farhat en el 2004, entre otros, proponen el uso de marcadores biológicos a nivel molecular y celular como herramientas sensibles de “alarma temprana” para medir la calidad ambiental. Existen diferentes tipos de biomarcadores entre los cuales se tienen los de exposición que indican cuando un organismo ha sido expuesto a contaminantes y los de efecto que revelan la magnitud de la respuesta de los organismos a los contaminantes.

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 los niveles superiores de individuo, población o ecosistema. 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 (Poonam, Farhat; 2004).

Gutierrez *et al* (2003) define el termino de biomarcador como “alteración bioquímica o fisiológica detectable, o 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.

El biomonitoreo de la polución en ecosistemas con el uso de técnicas histológicas de microscopia óptica y electrónica ha recibido especial atención en los últimos años. Organizaciones internacionales tales como WHO (World Health Organization) – FAO (Food and Agriculture Organization) tienen una reconocida batería de biomarcadores celulares como herramienta útil para la evaluación de ecosistemas marinos. Estos biomarcadores representados en estudios histopatológicos e histoquímicos son de gran utilidad en la detección de diferentes tipos contaminantes entre ellos los metales (Domouhtsidou, Dimitriadis; 2004; Abdallah, 2001).

Nicholson y Lamb (2005), recomiendan estudios en tejidos de branquias, divertículos digestivos y riñones como biomarcadores histológicos, evaluando en estos la presencia de “inclusiones granulares”. La existencia de estas ha sido descrita en los tejidos en un amplio rango de animales y se sugiere que individuos en ambientes altamente contaminados contienen una alta frecuencia de estos gránulos.

5.1.1. Biomarcadores Histopatológicos. Muy utilizados como indicadores de toxicidad en órganos, especialmente en Hepatopáncreas y branquia (Sanchez *et al.*, 1997; Pooman *et al.*, 2004; Viarengo *et al.*, 2007; Cajaraville *et al.*, 2000; Evans, 1987; Rank *et al.*, 2007; Kakkar *et al.*, 2005; Bolis *et al.*, 2001; Has-Schön *et al.*, 2006) de peces, en donde, por medio de cambios morfológicos a nivel celular y tisular se pueden inferir anomalías en el metabolismo por integración de sustancias extrañas en dichos organismos expuestos a contaminantes como los metales pesados (Pacheco y Santos, 2002).

Pacheco y Santos (2002), establecen que a nivel tisular y celular se dan cambios que se pueden observar y utilizar como biomarcadores histopatológicos, entre los cuales tenemos para el hígado: agregados de macrófagos pigmentados, necrosis, atrofia de hepatocitos, alta densidad de cromatina, mala definición del núcleo de hepatocitos, autofagia celular (mitocondrias absorbidas por parte de retículo endoplasmático rugoso), desorganización citoplasmática y vacuolización de hepatocitos (Meinelt *et al.*, 1997; Oliveira- Ribeiro *et al.*, 2002; Raldúa *et al.*, 2007).

En la branquia se tiene en cuenta la mala proliferación interlamelar de células, hipertrofia de células epiteliales de lamela secundaria, hiperplasia del epitelio (fusión de lamelas secundarias), edema del espacio subepitelial y lamela secundaria rizada (Rabitto, *et al.*, 2005; Pacheco y Santos, 2002; Cengiz, 2006).

La mayoría de los cambios histopatológicos no son en gran parte específicos a un determinado tóxico, debido a la confirmada ocurrencia de alteraciones similares bajo un rango amplio de exposición a sustancias nocivas en diferentes condiciones como el hábitat, forma química del metal, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, edad, género y masa corporal (Mallatt, 1985; Hinton, 1990; Has-Schon *et al.*, 2006). La hiperplasia, fusión lamelar, edema, levantamiento epitelial, pérdida de compartimentalización celular, vacuolización, necrosis, entre otras; son típicas lesiones en respuesta a organoclorinas, derivados del petróleo, organofosfatos, carbamatos, herbicidas y metales (Alazemi *et al.*, 1996; Topón *et al.*, 2003; Giari *et al.*, 2007; Braunbeck, 1998).

Además, los trabajos desarrollados por Marigomez *et al.* (2006), evalúan cambios estructurales lisosomales como biomarcadores determinando cuatro parámetros estereológicos: densidad de volumen lisosomal, densidad de superficie, relación superficie a volumen y densidad numérica. Los mismos investigadores incluyen otros biomarcadores en tejidos de glándulas digestivas a partir de imágenes de microscopía.

En 1975 los investigadores Lewis y Potter, realizaron análisis morfométricos en cuanto a número total de Filamentos y lamelas Secundarias (con sus respectivas áreas) en los diferentes estadios de vida (larva, en metamorfosis y adultos) de *Lampetra fluviatilis* por medio de un técnica manual que consistía en poner el un filamento sobre un papel blanco para sacar el bosquejo y posteriormente, este era cortado y medido con un compás automático (Hayashi Denko, tipo AAM- 5).

Más adelante, con la ayuda de la microscopía de Luz, Sanchez, Speare y Johnson (1997 - 1998) hicieron valoraciones morfométricas en branquia de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a T- Cloraminas o Formalina, donde tuvieron en cuenta las variaciones de longitud- cantidad de filamentos y lamelas secundarias, número de células cloruro, células mucosas, entre otras. Mondadori *et al* (2007), realizaron un estudio de morfometría en folículos ováricos primordiales, primarios y secundarios de bufalos (*bubalus bubalis*). En el 2005, Narváez *et al* realizaron una valoración morfométrica en poblaciones naturalizadas y domesticadas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en el norte de Colombia, en donde se identificaron tres morfotipos, uno para cada categoría de sistema (dulceacuícola, estuarino y alcalino). Un año después, Sanz *et al* hicieron aportes a la digitalización de imágenes aplicadas a la anatomía patológica con un microscopio acoplado a una computadora utilizando el sistema morfométrico COMSDI-PLUSEI en el proceso de diagnóstico anatomopatológico.

Castrillón (2006) estandarizó una técnica de procesamiento digital de imágenes en estudios histopatológicos de biopsias renales en humanos, representando un logro y un avance en la consolidación de estas tecnologías en las técnicas de microscopía.

5.1.2. Prueba genotóxica: micronúcleos. Propuesta como una herramienta eficiente para estudiar la citotoxicidad en 20 años (Heddle *et al.*, 1991) y genotoxicidad en agua (Arkhipchuk *et al.*, 2000). Esta prueba, para el biomonitoreo 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

facilidad al desarrollarla (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Udrouiu, 2006; Ergene *et al.*, 2007).

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 mas 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 (Grisolia, 2002; Fenech *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los peces pueden actuar como organismos centinela de dicho estudio (Arkhipchuk y Garanko, 2005; Bolognesi *et al.*, 2006). Al-Sabti y Metcalfe (1995) presento una reseña extensa de estudios de genotoxicidad en peces para evaluar varios químicos como agentes mutagénicos y/o carcinogénicos (Hooftman y De Raat, 1982; Al-Sabti, 1986; Manna *et al.*, 1985; Manna y Sadhukhan, 1986; Metcalfe, 1988; e.g., Marrazzini *et al.*, 1994; Bahari, 1994; Grisolia y Cordeiro, 2000; Matsumoto y Cólus, 2000; Lemos *et al.*, 2001), efluentes industriales (Das y Nanda, 1986; Cavas y Ergene-Gozukara, 2003) y muestras ambientales.

Los estudios usan la prueba de micronúcleos para probar la exposición a diferentes organismos a situaciones de contaminación in situ (e.g., Zeng *et al.*, 1999) y en particular en peces utilizan eritrocitos y células branquiales (Hayashi *et al.*, 1998) por su alta sensibilidad a los agentes inductores de micronúcleos (Arkhipchuk y Garanko, 2005), para evaluaciones genotóxicas de ambientes acuáticos contaminados tales como ríos (De Flora *et al.*, 1993; Minissi *et al.*, 1996; Lemos, 1998; Viganò *et al.*, 2002), lagos (Grisolia y Starling, 2001), y agua marina (De Flora *et al.*, 1991), mostrando la sensibilidad de este sistema biológico (Hose *et al.*, 1987; Carrasco *et al.*, 1990; Minissi *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1998; Sanchez-Galán *et al.*, 2001; Rodríguez-Cea *et al.*, 2003).

Por su abundancia, amplia distribución, resistencia a la contaminación y buena respuesta a químicos, *Oreochromis niloticus* es considerada una buena candidata para usarla como una especie centinela en programas de monitoreo (Linde-Arias *et al.*, 2008), siendo expuesta a efluentes de fabrica de papel (Cavas y Ergene-Gözükara, 2003), para evaluar efectos de contaminación por descargas industriales, desechos urbanos no tratados y pesticidas (Linde-Arias *et al.*, 2008), por efluentes de una refinería de petróleo y planta de procesamiento de cromo (Cavas y Ergene-Gözükara, 2005).

La especie *O. niloticus* objetivo de esta investigación 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 publica 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 (Hooftman y Raat; 1982).

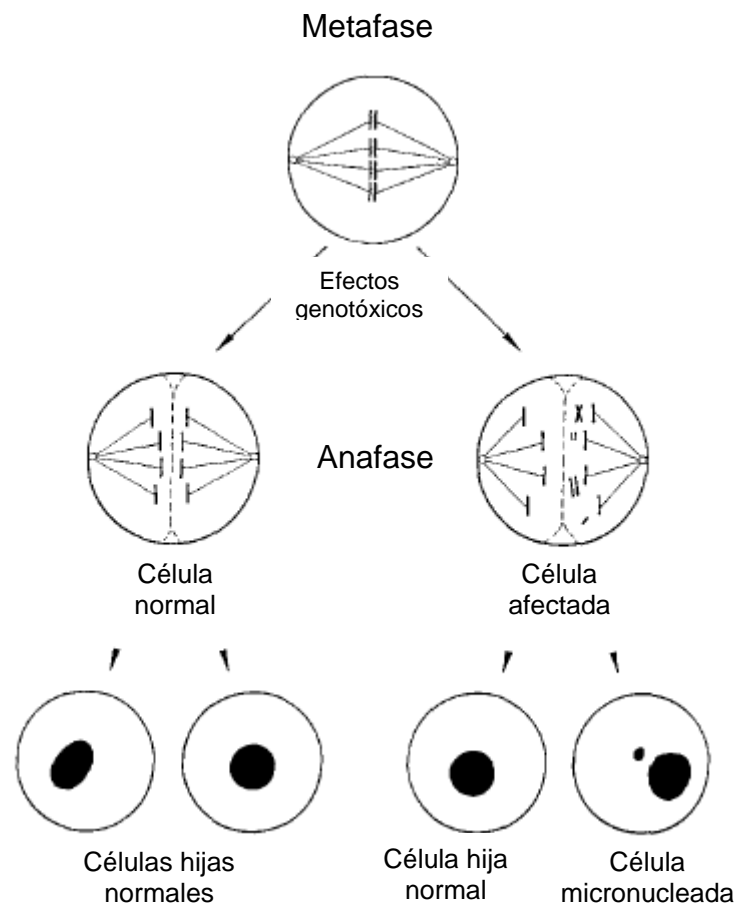


Figura 1. Formación de micronúcleos modificado de Al-Sabti y Metcalfe, 1995.

5.1.3. Lesión y adaptación celular. Según Robbins *et al.* (2005), la Patología es una ciencia que nos permite estudiar a los organismos en cuanto al origen y efectos de las enfermedades, centrándose en las consecuencias estructurales y funciones de los estímulos lesivos sobre células, tejidos y organismos. Las respuestas a diversos estímulos, permiten a células y tejidos adaptarse y vivir en armonía en su microambiente. La enfermedad surge cuando el estímulo se intensifica o la respuesta del organismo falla.

Básicamente hay cuatro procesos que constituyen la base de las patologías: a) su causa (etiología), b) los mecanismos de su desarrollo (patogenia), c) las alteraciones estructurales inducidas en las células y órganos del cuerpo (cambios morfológicos), y d) las consecuencias funcionales de los cambios morfológicos.

La lesión celular es reversible hasta cierto punto, pero si persiste el estímulo o este es lo bastante intenso desde un principio, la célula llega a un punto sin retorno y sufre lesión celular. Así pues, la adaptación, la lesión reversible y la muerte celular se consideran estadios diferentes en la evolución del deterioro de la función y estructura normal (Robbins, *et al.*; 2005).

Hay varias consideraciones generales que se deben tener en cuenta sobre la lesión celular:

- Las causas de la lesión celular son muchas, siendo las mas frecuentes la isquemia, lesión química y lesión producida por agentes infecciosos. en nuestro estudio, tendremos en cuenta la lesión celular producida por agentes químicos como los metales (cromo, plomo, mercurio).
- Aunque ha sido imposible precisar el sitio bioquímico de acción de agentes nocivos (en nuestro caso metales), son particularmente susceptibles cuatro sistemas intracelulares: respiración aeróbica, conservación de la integridad de membranas celulares, síntesis de proteínas enzimáticas, estructurales y la conservación de la integridad del aparato genético de la célula.
- Los elementos estructurales y bioquímicos de la célula guardan relación tan íntima que sea cual sea el lugar exacto del ataque inicial por el agente lesivo (metales), el daño en un sitio tiende a tener efectos secundarios muy extensos.
- Las manifestaciones morfológicas del daño mortal toman mas tiempo para aparecer que las de lesiones reversibles.

- Las reacciones de la célula a la lesión dependen no sólo de la clase de daño, sino también de la duración y de la gravedad. Para ello tomamos en cuenta sólo las concentraciones encontradas de metales.
- El resultado de la lesión celular depende no sólo del tipo, duración y gravedad del estímulo, sino también del tipo, estado y adaptabilidad de la célula.

La lesión reversible y muerte celular pueden ser causadas por una lista extensa de Agentes Químicos, algunos con alto nivel de toxicidad dependiendo de su estado y concentración. Los metales, en su mayoría, son más tóxicos cuando interactúan con otras sustancias como el agua; haciendo que el proceso de lesión y muerte celular se agilice (Guía de Protección Ambiental, 2006).

Las alteraciones que tuvimos en cuenta en el presente trabajo son:

- *Atrofia*: disminución del tamaño de la célula por pérdida de sustancia celular como respuesta de adaptación. El tejido o el órgano disminuye de tamaño, como es el caso de la pérdida lamelar en la branquia.
- *Hipertrofia*: aumento en las dimensiones de las células y, por ello aumento en el tamaño del tejido. Así pues, el tejido hipertrófico no tiene nuevas células, sino células mas voluminosas. El aumento de tamaño de las células no depende de una mayor captación de agua (tumefacción), sino de la síntesis de más componentes ultraestructurales.
- *Hiperplasia*: al igual que la hipertrofia, se presenta por una mayor demanda funcional, las células con capacidad de división mitótica pueden dividirse cuando se someten a estrés o se estimula a una mayor actividad. Así pues, la hiperplasia consiste en el aumento de número de células en un tejido u órgano. La hipertrofia y la hiperplasia coexisten.
- *Tumefacción*: aumento del diámetro de las células y peso del órgano. Es uno de los efectos más tempranos e importantes de la disminución de la concentración de ATP. En la hipoxia, la insuficiencia del transporte activo de sodio y de potasio, a causa de la disminución de ATP y ATPasa, produce acumulación intracelular de sodio con difusión de potasio al exterior de la célula. La ganancia neta de solutos se acompaña de ganancia isosmótica de agua y tumefacción celular. Es una reacción totalmente reversible.
- *Vacuolización*: hace parte del proceso Necrótico y se presenta si continúa la exposición a los agentes químicos, es una reacción que se observa principalmente en células que participan en el metabolismo de las grasas y

dependen del mismo, como hepatocito. Es una forma de acumulación celular.

- *Célula Necrótica*: la necrosis es la suma de los cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en el tejido viviente. La célula muerta suele mostrar un aumento en la eosinofilia, que depende de la pérdida de basofilia citoplásmica normal, debida a las ribonucleoproteínas del citoplasma (que se esparcen y pierden durante la muerte celular). También aparecen cambios nucleares:
 - *Picnosis*: el núcleo se contrae progresivamente y se transforma en una masa densa, pequeña y arrugada de cromatina íntimamente empacada.
 - *Cariólisis*: con el tiempo, la cromatina experimenta una disolución progresiva, al parecer como resultado de la acción hidrolítica de las DNAasas de origen lisosómico.
 - *Cariorrexis*: después de experimentar picnosis, el núcleo se disgrega en muchos acúmulos.
- *Muerte Celular*: los componentes de la célula son degradados progresivamente y hay una extensa pérdida de enzimas celulares que se pasan al espacio extracelular. A la inversa, se produce una entrada de macromoléculas extracelulares desde el espacio intersticial hasta las células muertas.
- *Inflamación*: reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. La inflamación sirve para destruir, diluir o aislar el agente lesivo, pero a su vez pone en marcha una serie de complejos procesos que en la medida de lo posible curan y reconstruyen el tejido dañado.
- *Edema*: aumento de la permeabilidad vascular; se entiende mejor, como mayor entrada que salida de líquidos a nivel tisular.

Cualquier agente susceptible a causar daño directo a la membrana celular, puede desencadenar una sucesión de acontecimientos que, en última instancia, pueden semejar a lo que ocurre en la hipoxia.

En el envenenamiento por cloruro mercúrico, el mercurio se conjuga con los radicales sulfhidrilo de la membrana celular y otras proteínas, aumenta la permeabilidad e inhibe el transporte activo que depende de ATPasa (Robbins, *et al.*; 2005).

6. METODOLOGIA

6.1. Zona de estudio

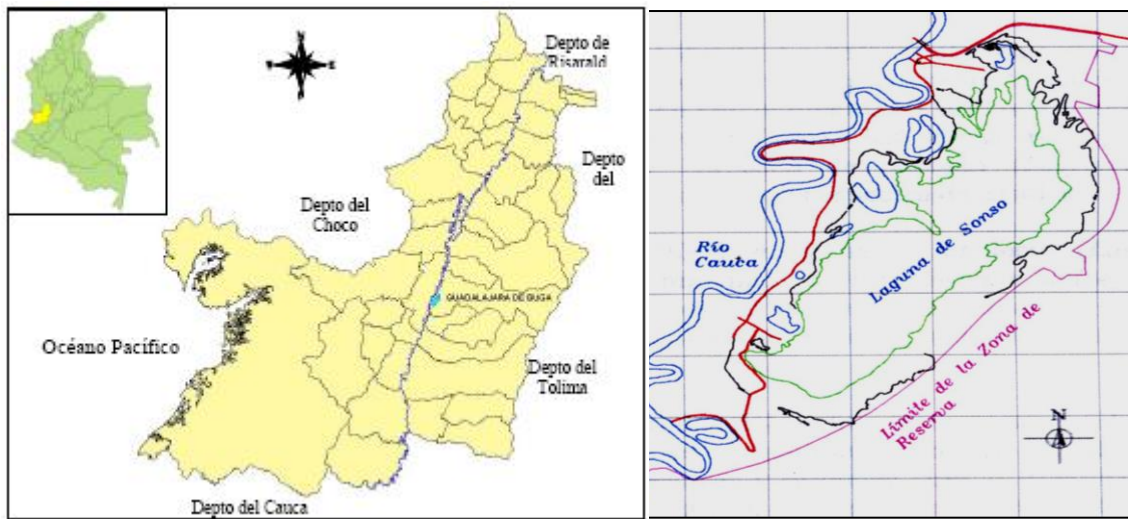


Figura 2. Ubicación geográfica de la Laguna de Sonso (Hernández, 2005).

La Reserva Natural Laguna de Sonso o del Chircal (Figura 2), está localizada en el margen derecho del Río Cauca, al suroeste del municipio de Buga, departamento del Valle del Cauca (Gischler, 2005).

Coordenadas: 4° 35'56"N, 77°04'51"W.

Área: 2045 ha.

Altitud: 935-937msnm.

La Laguna de Sonso es el principal humedal en la planicie aluvial del río Cauca y último reducto del ecosistema lagunar de extensión considerable autóctono que existe en el Valle del Cauca, y además se encuentra dentro del ecosistema estratégico Bosque Seco Tropical Inundable. La Laguna de Sonso está localizada dentro del complejo de humedales de la cuenca alta del río Cauca, subcuenca del

río Magdalena, en el centro geográfico del Valle del Cauca, municipio de Buga, entre los ríos Guadalajara y Sonso. Posee una extensión de 2045 ha, de las cuales 745 corresponden al área lagunar y las 1300 restantes al área de amortiguación. La precipitación media anual es de 1348,8 mm, y la temperatura media de 21 °C con una humedad relativa del 75%.

Actualmente la laguna se encuentra comunicada con el Río Cauca a través del Caño Nuevo, con el cual existe intercambio de aguas en ambos sentidos dependiendo de los niveles de agua y la estación climática (en época húmeda el agua del río Cauca fluye hacia la laguna mientras que en época seca la laguna evacua su agua al mismo río); además recibe aportes de aguas provenientes de las precipitaciones locales, de las aguas subterráneas y de un sistema de acequias intermitentes, que se originan en la vertiente Occidental de la cordillera Central (Gischler,2005).

La laguna presenta una notable diversidad de microhábitats. Se destaca el espejo cubierto por Buchón de Agua (*Eichornia crassipes*), llegando a cubrir completamente la superficie de la laguna. En los bordes de la laguna se encuentran juncos (*Typha angustifolia*) y tamarindillos (*Aeschynomene ciliata*), y en las zonas pantanosas se encuentran varias especies de Ciperáceas y barbasco de pantano (*Polygonum hypsidum*).

La fauna íctica principalmente está conformada por las especies: Biringo (*Sternopypus macrurus*), Bagre Sapo (*Pseudopimelodus bufonius*), Tilapias (*Tilapia rendalli*; *Oreochromis mossambicus*; *O. niloticus*) y Corronchos (*Chaetostoma fischeri* *Pterigoplichthys undecimalis*), algunas de ellas introducidas con el fin de mantener la actividad pesquera (CVC). Sin embargo la especie que mejor se ha adaptado a las condiciones actuales es la Tilapia (*Oreochromis niloticus*), constituyéndose en la de mayor consumo entre los pobladores de la región dado su mayor valor comercial. Esta especie es el organismo de estudio dado el alto riesgo que significa para la salud humana ya que a pesar que se tiene referencia de la presencia de los metales en la laguna se desconoce la transferencia e impacto en las poblaciones humanas consumidoras de estas especies (Gischler, 2005).

Este ecosistema se destaca como refugio de fauna aviar con 162 especies, de las cuales 55 son acuáticas y 107 están asociadas a hábitat más secos (Alvarez-López, 1999). La diversa avifauna acuática residente incluye a la única población reproductiva del Buitre de la Ciénaga (*Anhima corneta*). Igualmente se constituye en importante zona de reproducción de aves acuáticas, especialmente del Pato Colorado (*Anas cyanoptera*), Cormorán Neotropical (*Phalacrocorax olivaceus*),

Iguaza Maria (*Dendrocygna bicolor*), Gallito de Ciénaga (*Jacana jacana*). También se debe destacar que “Sonso” es el área de residencia temporal de varias especies migratorias del Neártico, especialmente el Águila Pescadora (*Pandion haliaetus*), el pato Careto (*Anas discors*), entre otros (Gischler, 2005; <http://lagunasonso.tripod.com/id2.html-08Nov-07>).

Las comunidades de El Porvenir, Puerto Bertín, Yotoco y Mediacanoa (poblaciones aledañas) derivan su sustento aprovechando el recurso hidrobiológico, y se realizan actividades agrícolas y pecuarias del suelo aledaño. A su vez estas actividades han afectado significativamente el ecosistema, causando un deterioro ambiental y disminuyendo su valor ecológico y económico (Muñoz *et al.*, 2002; Gischler, 2005; Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC, 2007).

Dado que la dieta es la ruta principal de exposición a metales (Castro *et al.*, 2008) en el caso de las poblaciones aledañas a la Laguna de Sonso (consumen la Tilapia), constituye un riesgo para su salud debido a que se incrementa la toxicidad por bioacumulación en niveles tróficos altos (Zhang, Wong; 2007). Esta especie es el organismo de estudio por el riesgo que significa para la salud humana ya que a pesar que se tiene referencia de la presencia de los metales en la laguna se desconoce la transferencia e impacto en las poblaciones humanas consumidoras de estas especies (Gischler, 2005; Plan de Manejo Ambiental Integral - Humedal Laguna de Sonso- CVC, 2007).

El río Patía nace en la vertiente occidental de la cordillera central en el departamento del Cauca, luego de la confluencia de los ríos Timbío y Quilcacé en la vereda el Hoyo, municipio de Timbío a 820 m.s.n.m. (Lehmann *et al.* 2005). En su recorrido que abarca los departamentos de Cauca y Nariño, alcanza una longitud aproximada de 360 km y su hoya hidrográfica cubre una extensión cercana a los 24000 km² (IGAC 1980), por lo cual es considerado el segundo río más caudaloso del litoral Pacífico colombiano y el primero en extensión de la cuenca (IGAC 1980).

El clima en la zona plana puede calificarse cálido- seco; sin embargo en las partes altas especialmente relacionadas a las estribaciones de la cordillera occidental, su carácter es progresivamente húmedo a medida que se asciende. La precipitación media multianual es aproximadamente 1763 mm; no obstante se observa una disminución de la misma en sentido Norte-Sur. La temperatura media anual es de 28° C.

El único estudio del inventario minero de las cuencas bajas de los ríos Telembi-Patía (Fase I del proyecto) realizado por Orrego y Agudelo en 1989; menciona que la economía se basa en las explotaciones mineras, forestales, actividades agrícolas, pesqueras y en menor proporción comerciales. La explotación minera se realiza por medio de métodos artesanales como: barequeo o mazamorreo, motobombas y elevadores, volquetas, retroexcavadora, Bulldozeros, dragas y canalón. Existiendo actividad minera en tierra firme y riveras.

Los principales problemas de impacto relacionados con la extracción minera son: desmonte, pérdida de suelo vegetal, sedimentación artificial de muchas corrientes y erosión. En general, los métodos de explotación minera en el área son rudimentarios, ya que en la actualidad existen los mismos que se usaron en la época colonial.

6.2. Especie objeto de estudio

El género *Oreochromis* comprende más de un centenar de especies de cíclidos africanos, repartidos por las aguas dulces o ligeramente salobres de todo el continente. Tienen cuerpo alargado, moderadamente comprimido lateralmente, la cabeza es de forma muy particular con la parte frontal del cráneo convexa, la boca grande y cavidad bucofaríngea muy desarrollada. Su aleta dorsal es larga y terminada frecuentemente en punta. La aleta anal es igualmente afilada (Figura 3).



Figura 3. Organismo de estudio: Tilapia (*Oreochromis niloticus*). 1x.

El color de su cuerpo, en este caso, es negro, con brillos metálicos y por lo general es más vivo o intenso en machos que en hembras. Su hábitat es variable, el género *Oreochromis* se encuentra en aguas cálidas, dulces a veces algo salobres, cercanas a cuevas sumergidas y fondos rocosos. Su óptimo desarrollo se logra a temperaturas superiores a los 20°C (22-26°C). Generalmente no miden más de 30cm de largo y se alimentan de fitoplancton y zooplancton. Puede estimarse que su longevidad está entre los cuatro y cinco años, dependiendo del entorno en que se encuentren.

Sus extraordinarias cualidades, como crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación al cautiverio, aceptación a una amplia gama de alimentos, resistencia a enfermedades, carne blanca de calidad y amplia aceptación, han despertado gran interés comercial en la acuicultura mundial. (http://www.rednaturaleza.com/peces_doc.asp?p=Tilapia; http://www.redesc.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/tilapia/tilapia1.htm.26/10/2008/4:00 p.m.).

6.3. Recolección de muestras

Se realizaron dos jornadas de muestreo de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) por medio de redes de arrastre, de acuerdo a las condiciones estacionales.

- En la Laguna de Sonso el primer muestreo se realizó el 05 de Julio del 2008 (n=10) correspondiente a la época húmeda y el segundo muestreo en época seca se hizo el 19 de septiembre de 2008 (n=13).
- En el Río Patía 20 de octubre del 2008 (n=7) se realizó el primer muestreo en época húmeda y el 8 septiembre del 2008 (n=6) se hizo el segundo muestreo correspondiente a la época seca.

Los peces colectados fueron transportados cuidadosamente con aireación constante hasta el laboratorio para su posterior sacrificio y realización de los protocolos de las pruebas histopatológicas y genotóxicas.

6.4. Prueba histopatológica

En el estudio se utilizaron biomarcadores histológicos para evaluar el efecto de los metales en los tejidos de Hepatopáncreas y branquia de Tilapia.

Los individuos se sacrificaron y se tomaron biopsias de hepatopáncreas y branquia, las cuales se procesaron para las técnicas de Microscopía de luz (tinción con Hematoxilina - Eosina) y Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR), y pruebas citogenéticas descritas a continuación.

6.4.1 Procesamiento de muestras para Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR y Electrónica de Transmisión (MET). Posterior al sacrificio de los individuos se procedió a tomar los tejidos descritos en la siguiente Cuadro:

Cuadro 1. Tejidos seleccionados para los diferentes procesamientos.

Espécimen	Tejido – Biopsias	Protocolo
<i>Oreochromis niloticus</i>	Branquia.	ML, MOAR
	Hepatopáncreas.	

El protocolo propuesto por Gonzales (1968) sirvió de referencia para la previa estandarización que se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca. El protocolo establecido fue el siguiente: los tejidos se fijaron en glutaraldehído al 0.2 M en Búfer de fosfatos a pH 7.4. Se postfijaron con tetróxido de osmio al 4%, posteriormente se deshidrataron en alcoholes (Etanol) con concentraciones ascendentes. Los tejidos se sometieron a una preimbibición con resina y óxido de propileno hasta inclusión definitiva en resina Epóxica. Obtenidos los bloques debidamente rotulados, se cortaron en Ultramicrótopo Ultracut Leica en grosor de 1-2 μm ; los cortes se tiñeron con azul de toluidina, se observaron en microscopio óptico de alta resolución Nikon Microphot con sistema de análisis de imágenes Leica. QWIN 505.

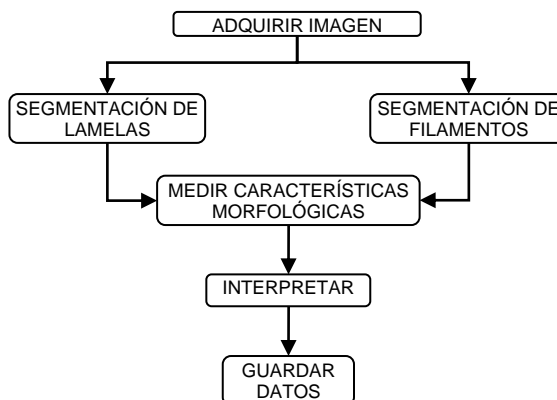
6.4.2. Procesamiento de muestras para Microscopía de luz. El protocolo propuesto por Escovar (1996) sirvió de referencia para la previa estandarización que se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca. El protocolo establecido fue el siguiente: las muestras se fijaron con una solución de Formol Bufferado al 3,7% y se deshidrataron en alcoholes con concentraciones ascendentes a partir de 50%, se aclararon con Xilol y se

incluyeron en parafina. Posteriormente se cortaron en micrótopo LKB en grosores de 4 - 6 μm y se tiñeron con Hematoxilina - Eosina.

6.4.3 Sistema de Análisis de imágenes. El sistema implementado está constituido por un microscopio óptico marca Nikon eclipse 80i que tiene acoplada una cámara digital Nikon DS-2Mv de 2Mp, estación de procesamiento y análisis de imágenes LEICA Q550IW. La aplicación software fue desarrollada en QUIPS y QWIN, constituidos por macroprogramas interactivos ejecutados en una plataforma PC. Las imágenes fueron capturadas a 10x de aumento, con determinadas condiciones de iluminación.

Se capturaron tres imágenes por cada individuo control para un total de 39 imágenes analizadas. Estas imágenes establecieron los valores de normalidad lamelar y de filamento. La aplicación software diseñada fue alimentada con los datos morfológicos de normalidad mostrados por los organismos control (Río Patía). Con base en estos valores, esta aplicación permite concluir si existe algún tipo de alteración (AA, ADDE o ambas) o si por el contrario el individuo presenta patrones de normalidad lamelar y de filamento.

Descripción del sistema: La grafica 1. Muestra el flujo de información en este sistema de visión artificial, que es alimentado por una imagen digital que muestra tres filamentos de branquia de tilapia *Oreochromis niloticus*, esta imagen es segmentada para separar las regiones correspondientes a las lamelas y a los filamentos sin lamelas, y posteriormente realizar las mediciones morfológicas de la imagen. Posteriormente se interpretaron los resultados obtenidos, con base a las características medidas, permitiendo realizar comparaciones con los valores normales establecidos y arrojar un diagnóstico preliminar.



Grafica 1. Diagrama de flujo del sistema implementado

6.4.3.1. *Segmentación*. La segmentación consiste en dividir la imagen en regiones que son de interés, denominadas objetos (filamentos y lamelas), y el fondo, constituido como la región que no presenta interés particular. Inicialmente, la imagen a color original es descompuesta en sus tres planos RGB (rojo, verde y azul, por sus siglas en inglés), se realiza una transformación de *oscurecimiento* al plano G y luego un mejoramiento de contraste, para obtener una imagen con más detalle de la zona de interés a segmentar, es decir los filamentos con sus lamelas. Luego se realiza una transformación de *aclaración* de la imagen (Leica imaging systems, 1996), para eliminar pequeños artefactos inmersos en el espacio interlamelar que pueden causar errores en las medidas. Posteriormente se realiza una binarización con un umbral predefinido, seguido de funciones de la morfología matemática binaria, tales como apertura y relleno de huecos, para mejorar el aspecto de la imagen binarizada. Con la imagen binaria de los tres filamentos completos solo falta separar las lamelas de ellos, para esto se realiza una *última erosión* seguida de una *transformación distancia* para reconstruir las lamelas y los filamentos por separado para ser medidos.

6.4.3.2. *Morfometría y extracción de características*. La composición celular y los cambios estructurales del tejido branquial fueron identificados por observación con el microscopio de luz. Para determinar el rango de las lesiones y el estado completo de la branquia, se tomaron tres filamentos completos de un arco branquial al azar y se capturaron imágenes de su parte central. Fueron utilizados algunos de los índices morfométricos basados en un método de morfometría proporcional desarrollado por Speare y Ferguson (1989) (Sánchez *et al.*, 1997), y para evaluar histopatológicamente el tejido se realizaron algunas modificaciones a las categorizaciones dadas por Bernet *et al* (1999) y Nero *et al* (2006). Cada filamento seleccionado fue evaluado por la aplicación software con los siguientes parámetros:

- 1) El número total de lamelas útiles para la cuantificación sobre los tres filamentos.
- 2) Perdida lamelar: porcentaje del número de lamelas que están por debajo del promedio del primer índice.
- 3) Ancho promedio lamelar: medido desde la membrana celular más externa de un lado de la lamela hasta su lado opuesto, medido para cada lamela cuantificable en la imagen.
- 4) Longitud promedio lamelar: medida desde la punta de la lamela hasta la base de ella.
- 5) Ancho promedio del filamento: medido desde la base de la lamela hasta la base de la lamela contraria.

- 6) Alteración de la distancia de difusión efectiva (ADDE): es una variación que surge a nivel lamelar, interviniendo en la difusión de gases como el oxígeno, medida en porcentaje del número de lamelas engrosadas.
- 7) Alteraciones adaptativas (AA): corresponden a un incremento del número celular, pueden ser irreversibles dependiendo de la severidad y extensión de la lesión. Fueron clasificadas dentro de esta clase: la hipertrofia y la hiperplasia, medidas en porcentaje de engrosamiento del filamento por tejido epitelial y en porcentaje del número de lamelas con una longitud por debajo de la mínima normal.

La siguiente Cuadro ayuda a comprender los términos empleados.

Cuadro 2. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.

RESULTADO DE LA PRUEBA	VERDADERO DIAGNÓSTICO	
	Enfermo (-)	Sano (+)
Positivo (+)	Verdaderos Positivos (vp) (a)	Falsos Positivos (fp) (b)
Negativo (-)	Falsos Negativos (fn) (c)	Verdaderos Negativos (vn) (d)

Es necesario tener en cuenta conceptos como:

Valor predictivo positivo: es la probabilidad de padecer la enfermedad o Alteración si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede evaluarse a partir del número de individuos con un resultado positivo en la prueba y que finalmente resultaron enfermos, sobre el total de resultados positivos:

$$\left[VPP = \frac{vp}{(vp + fp)} \right]$$

Valor predictivo negativo: es la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo en la prueba se halle realmente sano, se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$\left[VPN = \frac{vn}{(vn + fn)} \right]$$

Una explicación clara de lo anterior: en las celdas de el cuadro 2, *a* es el número de elementos cuya respuesta es la misma, (negativa ó 0); *b* es el número de elementos cuya respuesta es negativa (0) con el Análisis de Imágenes y positiva (1) para el Observador; *c* es el número de elementos positivos para el Análisis de Imágenes y negativo para el Observador; y *d* es el número de elementos que

mantienen la respuesta positiva. Por tanto, $(b+c)$ es el número total de elementos cuyas respuestas son diferentes entre los dos métodos de evaluación, y son los únicos que intervienen en el contraste.

Cuando la frecuencia esperada $(b+c)/2$ es pequeña la aproximación de la distribución del estadístico de prueba Chi-cuadrado no es buena y, en tal caso, el SPSS no calcula el estadístico anterior, sino que realiza la prueba binomial. El contraste se plantea en este caso de la siguiente forma: supongamos que $c < b$; la hipótesis nula es que c es un valor de una variable X con distribución binomial de parámetros $n=b+c$ y $\pi=0,5$. El nivel de significación para una prueba de dos colas es $P(X \leq c) + P(X \geq b)$ y se rechazará H_0 (las dos pruebas coinciden) para niveles de significación iguales o superiores a éste (Esper, Machado; 2008).

Las hipótesis propuestas son:

H₀: Los resultados tanto negativos como positivos para las alteraciones serán afines para los dos métodos de evaluación.

H_i: Los resultados tanto negativos como positivos para las alteraciones serán diferentes para los dos métodos de evaluación.

6.5. Protocolo para prueba de genotoxicidad (biomarcador de micronúcleos en eritrocitos de branquia)

La elaboración de este ensayo, se basó en el protocolo estandarizado por Muñoz y Guerrero (2003) en el cual se obtienen las branquias del pez, abriendo el opérculo branquial cortando con un bisturí desde la parte basal, que se identifica por su color rosado bien claro y con la ayuda de una pinza se retiró cuidadosamente. Luego, se sacó una gota de sangre de la branquia y se colocó en un portaobjetos que previamente ha sido limpiado. Con un portaobjetos se realizó un extendido muy fino para que las células no se superpongan y así obtener una buena visualización al microscopio. Luego se secan las placas por unos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se fijaron las mismas con metanol por 5 segundos. Para la tinción se esperó 1 hora y se tiñeron con Giemsa al 5% por 10 minutos. Se observaron al microscopio óptico Nikon eclipse 80i que tiene acoplada una cámara digital Nikon DS-2Mv de 2Mp y se analizaron 2000 células por pez con objetivo de 100x.

6.6. Análisis químicos

Se realizó el análisis químico por Espectrofotometría de Absorción Atómica es una herramienta primordial para los estudios en donde se determinan vestigios de metales en muestras biológicas o del medio ambiente. Con frecuencia el primer paso en el análisis de muestras biológicas es la calcinación (con ácido nítrico) para destruir la materia orgánica.

Posteriormente se lleva a un estado de excitación las moléculas de la solución acuosa mediante la aplicación de energía en forma térmica, por medio de una llama de una combinación oxígeno acetileno o bien de óxido nítrico acetileno, la muestra a alta temperatura se irradia con una luz a la longitud de onda a la cual el elemento en interés absorbe energía. Comúnmente posee un nebulizador pre-quemador (o cámara de nebulización) para crear una niebla de la muestra y un quemador con forma de ranura que da una llama con una longitud de trayecto más larga. La niebla atómica es desolvatada y expuesta a una energía a una determinada longitud de onda emitida ya sea por una Lámpara de Cátodo hueco construida con el mismo analito a determinar o una Lámpara de Descarga de Electrones (EDL).

La temperatura de la llama es lo bastante baja para que la llama de por sí no excite los átomos de la muestra de su estado fundamental. El nebulizador y la llama se usan para desolvatar y atomizar la muestra, pero la excitación de los átomos del analito es hecha por el uso de lámparas que brillan a través de la llama a diversas longitudes de onda para cada tipo de analito (<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r23189.DOC>).

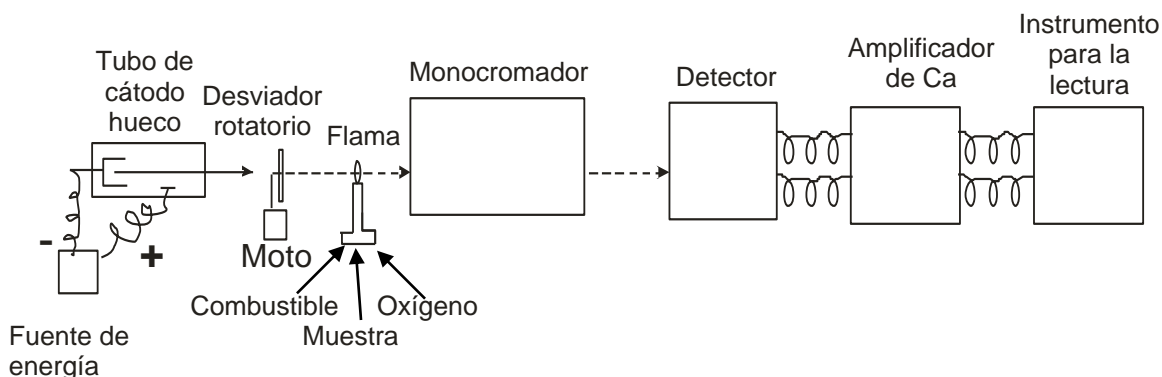


Figura 4. Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica. (La flama se puede reemplazar por un horno).

De acuerdo al protocolo descrito se analizaron los tejidos (Branquia, Hepatopáncreas) obtenidos en el Proyecto Colciencias – Universidad del Valle – Universidad del Cauca – Universidad Autónoma de Occidente, denominado “EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES EN LA ULTRAESTRUCTURA CELULAR, DE LA BIOTA ACUÁTICA Y POBLACIONES HUMANAS ASOCIADAS A LA LAGUNA DE SONSO EN EL VALLE DEL CAUCA”, con el código 1106-335-18552 CONTRATO RC N° 202-2006”.

6.7. Diseño experimental

6.7.1. Diseño del Muestreo. El estudio implicó una investigación de tipo comparativo con un experimento post- facto u observacional, con cuatro (4) mediciones, dos en el sitio expuesto (Laguna de Sonso) y dos en el sitio testigo (Río Patía) que se escogieron de acuerdo a características similares al expuesto. Esto se realizó dependiendo de las condiciones climáticas del lugar de muestreo. El número de individuos muestreados es ± 10 por sitio de muestreo, para un total de 36 individuos.

6.7.2. Diseño experimental para pruebas histopatológicas. El diseño experimental a implementar es de tipo factorial y está conformado por:

6.7.2.1. Factores. Son variables independientes y de naturaleza cualitativa:

Cuadro 3. Lista de factores y sus niveles.

FACTOR	NIVELES
TEJIDOS	Branquia e Hepatopáncreas
ÉPOCA	Seca y húmeda
TIPO DE ECOSISTEMA	Contaminado y no contaminado

6.7.2.2. Variables dependientes o de respuesta.

- *Biomarcador histopatológico: ordinal.*

Para una mejor evaluación de los tejidos seleccionados de cada individuo se realizaron modificaciones a las categorizaciones dadas por Bernet *et al.* (1999) y Nero *et al.* (2006), estableciendo tres tópicos importantes para el estudio:

1. *Tipo de alteración (TA):*

Para una mejor organización se dividieron las alteraciones en cinco grupos principales.

- *Adaptativas (AA):* Incremento del número celular, pueden ser irreversibles dependiendo de la severidad y extensión de la lesión. Ej: hipertrofia, hiperplasia, atrofia (pérdida lamelar).
- *Citoplasmáticas (AC):* Alteración del volumen celular y agregados de productos, fácilmente reversibles alteración del metabolismo. Ej: Tumefacción.
- *Degenerativas (AD):* Efecto directo del tóxico produciendo modificación de la arquitectura celular y tisular, generalmente irreversible y su persistencia y progresión pueden conducir a una pérdida parcial o total de la función del órgano. Ej: necrosis (vacuolización, cambios en la estructura del núcleo)
- *Tisulares (AT):* Alteraciones que se reflejan del daño tisular en el órgano. Ej: Edema e Inflamación.
- *Distancia de Difusión Efectiva (DDE):* Variaciones que surgen a nivel lamelar, interviniendo en la difusión de gases como el oxígeno.

2. *Diagnóstico del Tipo de alteración (DTA):*

Se asignaron valores a las alteraciones teniendo en cuenta su presencia o ausencia en el tejido.

- *Cero (0):* Ausencia.
- *Uno (1):* Presencia.

6.7.2.3. *Análisis de Biomarcador histopatológico.* Se realizó con Cuadros de contingencia, en las cuales se identificó la asociación o dependencia entre cada factor y la variable dependiente, mediante la prueba de χ^2 (Chi

Cuadrado). Se analizó el efecto de cada factor y el efecto combinado de al menos dos factores.

6.7.3. Diseño experimental para prueba genotóxica. Las variables son:

6.7.3.1. *Variables independientes o factores.*

- *Tipo de Ecosistema:* con dos categorías, contaminado y no contaminado
- *Época:* Seca y húmeda.

6.7.3.2. *Variables dependientes.* Efecto genotóxico cuyo indicador es el número de micronúcleos en 2000 células.

6.7.3.3. *Análisis para evaluar efectos genotóxicos.* Después de la captura de los peces, se llevó a cabo el protocolo explicado en la metodología; en donde de cada individuo se extrajo de la branquia, la cantidad de sangre necesaria para realizar el extendido de 2-4 placas por pez.

Antes de realizar la lectura de las placas con el extendido de la sangre del tejido branquial, se codificó, para hacer un doble ciego de las placas y de esta forma evitar sesgos que puedan alterar los resultados. Se observaron los eritrocitos al microscopio, de los cuales se analizaron 2000 células por pez, con objetivo de 100x para evaluar si hay presencia o no de micronúcleos y calcular la frecuencia de los micronúcleos por pez, tanto para los individuos expuestos como para los no expuestos o control (Muñoz y Guerrero, 2003).

6.7.3.4. *Prueba de análisis.* Los datos de micronúcleos no cumplen con el requisito de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y de Homogeneidad de varianza (Prueba de Levene), por lo tanto, el análisis se realizó por separado para la exposición y para la época, mediante una Prueba no paramétrica como la U Man-Withney, con el paquete estadístico SPSS, con un nivel de significancia máximo de 0,05.

7. RESULTADOS

7.1. Registro de individuos

Se realizaron cuatro (4) muestreos, de los cuales, dos (2) fueron en la Reserva Natural Laguna de Sonso y los otros dos (2) en el Río Patía (organismos control). En la siguiente Cuadro se muestran las fechas de cada uno de los muestreos.

Cuadro 4. Lugar y fecha de los muestreos realizados.

LUGAR	FECHA	CANTIDAD DE ORGANISMOS
Laguna de Sonso (Época Seca)	19 – 09 - 08	13
Laguna de Sonso (Época Húmeda)	05 – 07 - 08	10
Río Patía (Época Seca)	08 – 09 – 08	6
Río Patía (Época Húmeda)	20 – 10 - 08	7

A cada espécimen se le realizaron sus respectivas medidas en longitud y masa mostradas en los siguientes cuadros:

Cuadro 5. Registro de especímenes muestreados en la Laguna de Sonso en época Seca (19-09-08).

Especímen	Peso (g)	Talla (cm)
1	332.22	21.5
2	341.80	21.0
3	340.85	20.5
4	365.85	21.5
5	316.7	20.5
6	371.78	23.0
7	318.85	20.5
8	116.70	15
9	220.85	19.5
10	68.78	12.8
11	148.01	16
12	58.84	11.5
13	76.98	13
Promedio	236,8	14,7

Cuadro 6. Registro de especímenes muestreados en la Laguna de Sonso en época Húmeda (05-07-08).

Especímen	Peso (g)	Talla (cm)
1	530.65	25
2	208.4	18
3	141.06	16.5
4	231.27	19.5
5	159.83	16.5
6	156.06	17
7	240.55	19
8	163.38	17.5
9	322.98	21.5
10	372.91	23.5
Promedio	252,7	19,75

Cuadro 7. Registro de especímenes muestreados en Río Patía en época Seca (08-09-08).

Especímen	Peso (g)	Talla (cm)
1	216	18
2	217,4	18,5
3	157	17
4	66,4	12
5	119,5	15
6	73,5	14
Promedio	141,6	15,75

Cuadro 8. Registro de especímenes muestreados en Río Patía en época Húmeda (20-10-08).

Especímen	Peso (g)	Talla (cm)
1	88	15
2	75.6	13
3	101.6	14.5
4	58	12
5	77.7	13.5
6	54.8	12
7	52.9	11.5
Promedio	73	13

7.2. Resultados cualitativos del biomarcador histopatológico (variables independientes y de naturaleza cualitativa)

7.2.1. Morfología e histología en branquia de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Las branquias en peces óseos, son estructuras especializadas organizadas entre las hendiduras faríngeas, o hendiduras branquiales, orificios que comunican lateralmente el tubo digestivo con el exterior. El agua es bombeada activamente con movimientos rítmicos, desde la cavidad bucofaríngea hacia la cavidad situada debajo del opérculo, atravesando los arcos branquiales

De esta manera el agua que entra por la boca sale por las hendiduras, intercambiando gases como el oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2), entre el medio interno del animal y el ambiente. El oxígeno disuelto en el agua pasa a los fluidos internos (sangre) y es transportado a los tejidos, donde las células lo requieren para la respiración celular. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Branquia>).

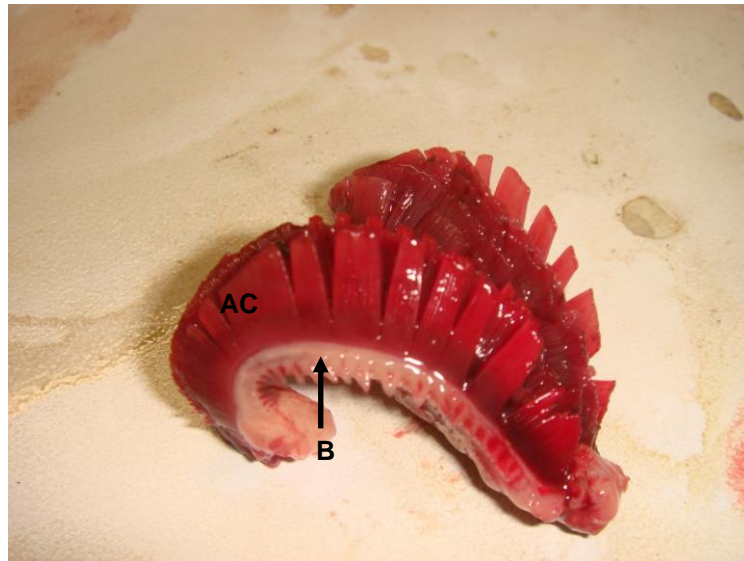


Figura 5. La Branquia de tilapia (*Oreochromis niloticus*) son prolongaciones de la piel. Se observa el arco branquial (AC) de soporte óseo (en peces jóvenes es de tipo cartilaginoso) y algunas asperezas llamadas branquiospinas (B). 1x.

La organización característica de los arcos branquiales y sus filamentos, permite mayor eficiencia en el intercambio gaseoso, que en estos casos se dá gracias al flujo contracorriente del agua respecto del flujo sanguíneo (direcciones opuestas); a demás del mecanismo Ventilación- Perfusión y la distancia de difusión del punto de contacto del agua en la lamela con la sangre que fluye por los canales pilosos (Figura 6).

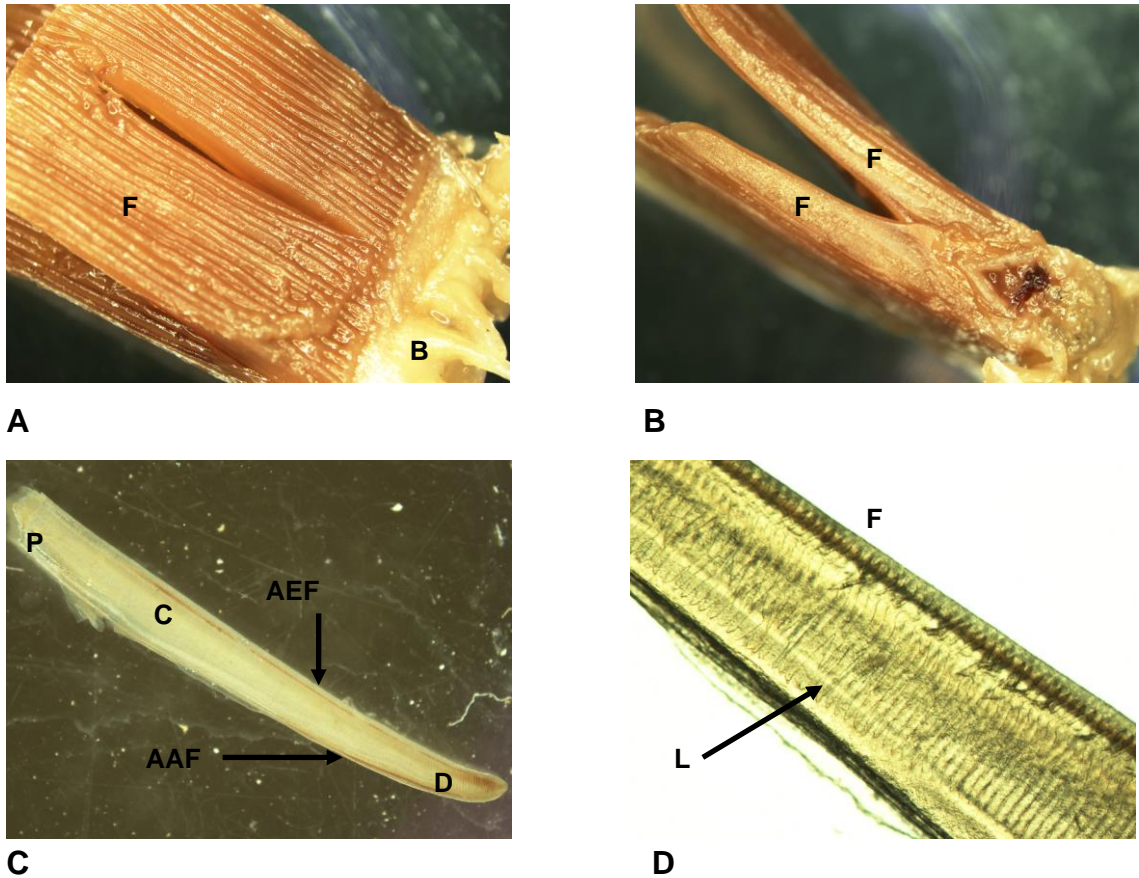


Figura 6. Branquia de Tilapia, en donde se observa su morfología de mayor a menor orden de conformación. **A)** Sección de un arco branquial en el cual se observan los filamentos (F), braquiospinas (B). **B)** Vista de un arco branquial corte transversal, nótese las dos hileras de filamentos que se disponen de manera opuesta en la base de un arco branquial. **C)** filamento de branquia, en el cual se notan por su coloración sus componentes: parte cartilaginosa (C), Arteria Eferente del Filamento (AEF), Arteria Aferente del Filamento (AAF), parte proximal (P) y la parte distal (D) que presenta una forma más afilada que la proximal. **D)** vista mas aproximada de una cara del filamento, en el cual se ve la disposición perpendicular de las lamelas (L) respecto al filamento, recorriendo cada superficie de él, de lado a lado. Estereoscopio Nikon SMZ800.

7.2.1.1. Descripción histológica de la Branquia de Peces Control.

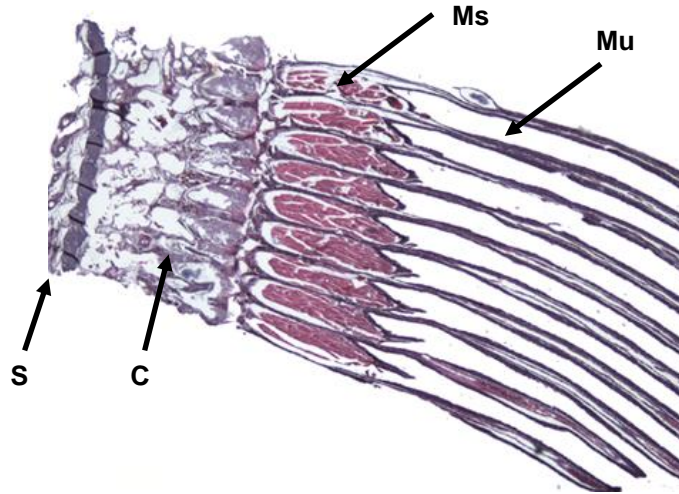


Figura 7. Corte longitudinal de branquia de Tilapia en el cual se observan de izquierda a derecha las siguientes capas que estructuran al órgano: una capa serosa (S), capa cartilaginosa (C), capa muscular (Ms), capa mucosa (Mu) que se evagina para formar los filamentos de la branquia. H-E, 4x.

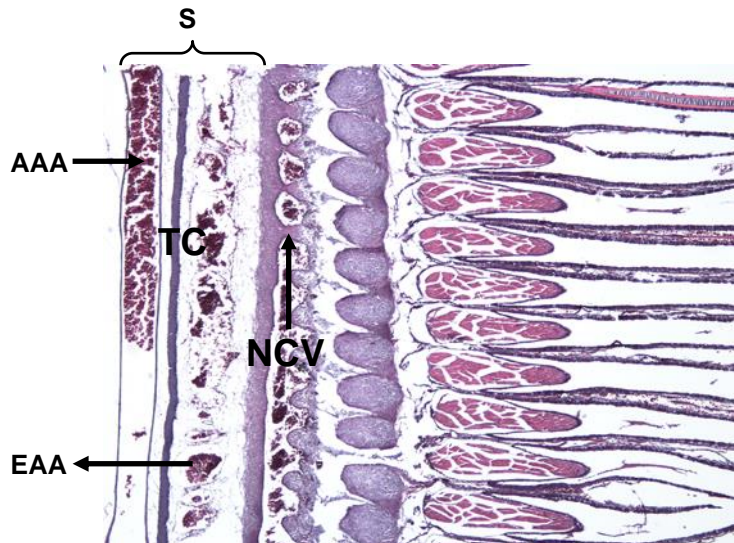


Figura 8. Corte longitudinal de branquia de Tilapia en el cual se observan a nivel de la capa serosa (S) elementos vasculares; Arteria Aferente del Arco (AAA), Arteria Eferente del Arco (EAA), estos dos vasos están unidos entre sí por Tejido Conectivo (TC). Desde estos dos grandes vasos se forman hacia la parte derecha vasos más pequeños que corresponden a Vasos Nutricios Acompañantes (NCV) los cuales irrigan a los filamentos. H-E, 4x.

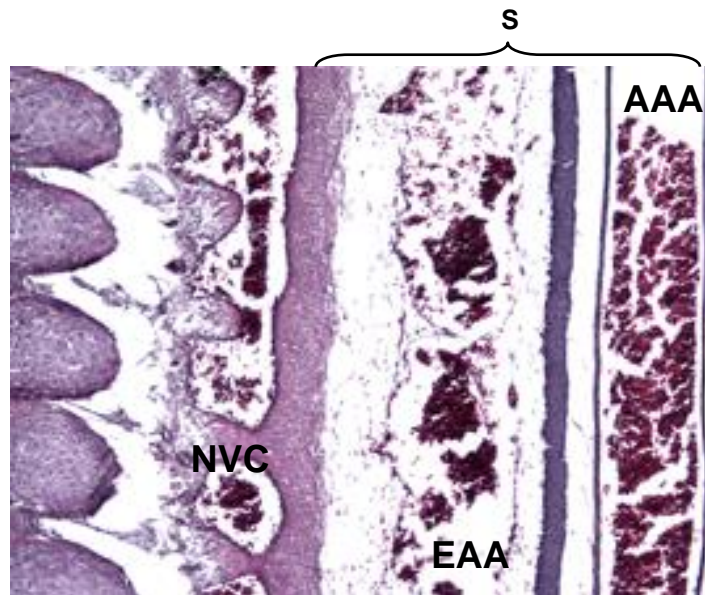


Figura 9. Corte longitudinal de branquia de Tilapia en el cual se identifican en la capa serosa (S) elementos vasculares como la Arteria Eferente del Arco (EAA), Arteria Aferente el Arco (AAA). De esta última se desprenden los Vasos Nutricios Acompañantes (NVC) en la capa cartilaginosa. H-E, 10x.

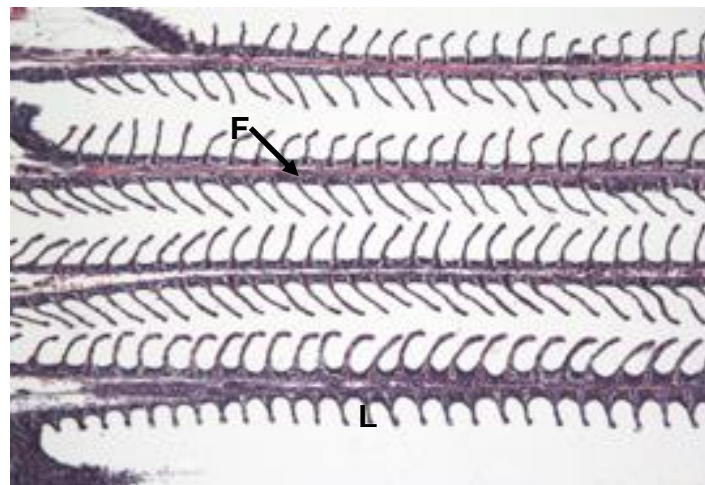


Figura 10.A. Corte longitudinal de Branquia de Tilapia, en el que se observa un conjunto de filamentos (F). Estas estructuras poseen una base ubicada hacia la izquierda de la figura, caracterizándose por ser más ancha que su parte distal. La parte media del filamento es uniforme hasta su terminación. De cada filamento emergen estructuras de forma laminar, delgadas, dispuestas perpendicularmente recorriendo cada superficie del filamento de lado a lado; denominadas lamelas (L). Por lo general la ubicación de las lamelas en el filamento es uniforme, al igual que su anchura y su altura, pero hacia la región más distal estas disminuyen en número y en longitud. H-E, 10x.

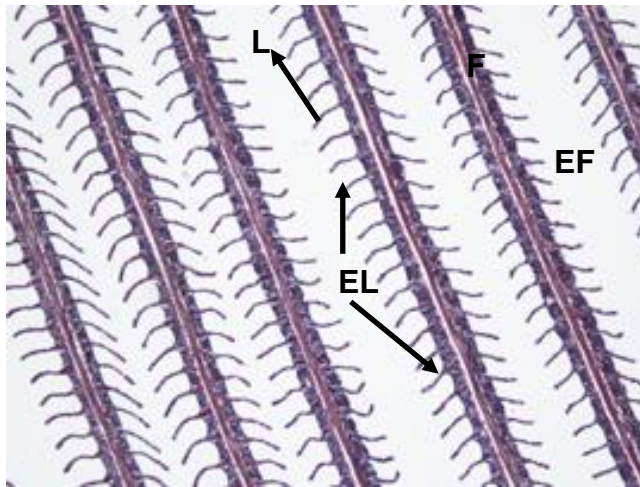


Figura 10.B. Corte longitudinal de branquia de Tilapia, donde se observan los filamentos (F) y sus respectivas lamelas (L). Los filamentos al igual que sus lamelas son estructuras que están separadas entre sí, por un espacio denominado Espacio interfilamentar (EF) y un Espacio Interlamelar (EL) respectivamente, por los cuales fluye continua y unidireccionalmente el agua y diferentes partículas. H-E, 10x.

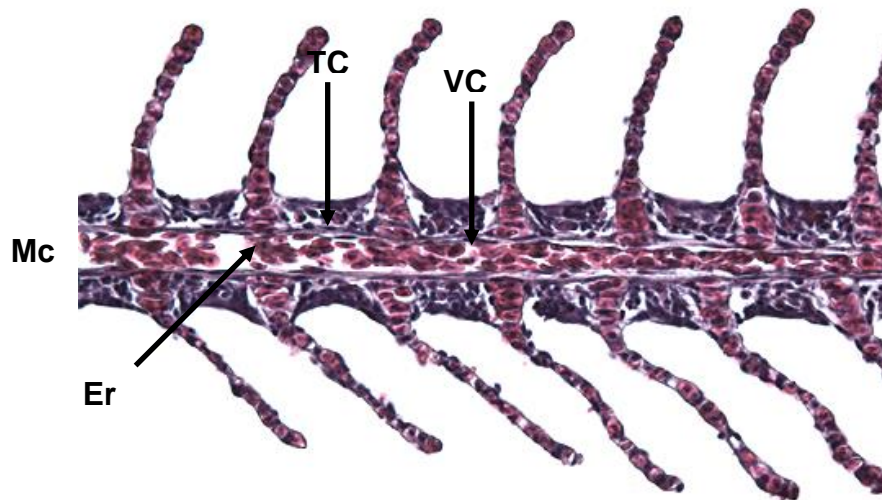


Figura 11. Corte longitudinal de un filamento de la branquia de Tilapia en el cual se aprecia su estructura histológica: En el núcleo de tejido conectivo (TC) del filamento discurre un Vaso Sanguíneo Central (VC) con sus eritrocitos (Er), el cual origina una ramificación de este para cada lamela. El tejido conectivo del filamento está compuesto por diferentes tipos celulares, este tejido está recubierto por un epitelio plano simple y así forman la mucosa (Mc). Desde el filamento se evagina el epitelio para formar la cubierta lamelar. Inmediatamente por debajo de su epitelio se observa su vaso sanguíneo con eritrocitos. H-E, 40x.



Figura 12. Corte longitudinal de un filamento de branquia de Tilapia en el cual se identifica la mucosa de un filamento descansando en la placa de cartilago, en donde se resalta en color intenso el Pericondrio (Pr). El vaso sanguíneo que se dirige hacia la lamela es de forma bulbosa y mas ancha hacia su base y hacia la parte distal de la lamela disminuye su diámetro. H-E, 40x.

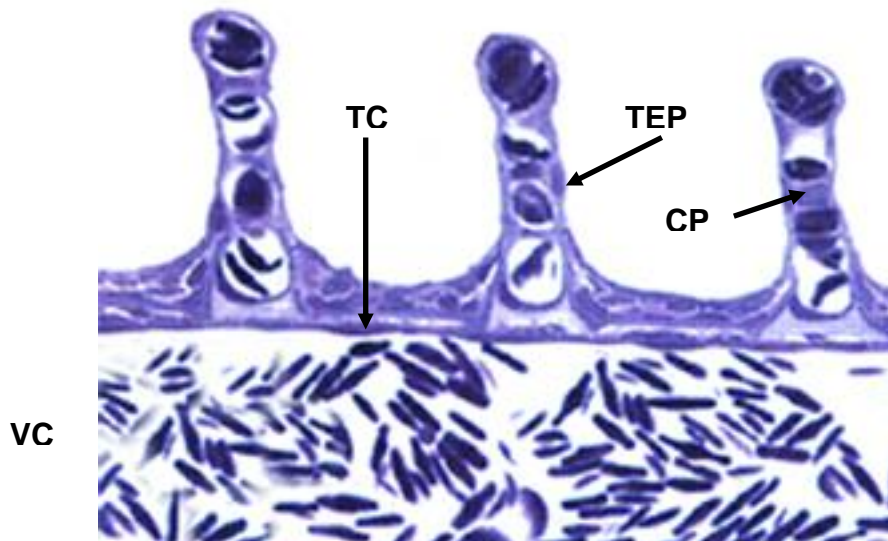


Figura 13. Corte longitudinal de un filamento de Tilapia, en donde se observan las lamelas y sus diferentes componentes: un vaso sanguíneo que se dirige hacia la lamela va disminuyendo su diámetro hacia la punta formando lúmenes venosos, en los cuales se reconocen de uno a tres (1-3) eritrocitos en su interior. En la base lamelar el seno venoso se dilata y alberga gran cantidad de eritrocitos que provienen del Vaso Central (VC) que recorre el tejido conectivo del filamento (TC) Cada lumen capilar es delimitado y separado por células con capacidad retráctil, que se apilan formando canales; llamadas Células Pilares (CP). Recubriendo la lamela se aprecia una capa de tejido epitelial plano simple (TEP). MOAR (Azul de Toluidina), 40x.

7.2.1.2. *Descripción histológica de la Branquia de Peces Expuestos.* Teniendo en cuenta la clasificación de alteraciones dada en el punto 6.7.2.2. se muestran las siguientes imágenes tomadas de los organismos expuestos (muestreados en la Laguna de Sonso) que las ilustran claramente.

Corte de branquia de Tilapia, en donde se aprecian diferentes Alteraciones clasificadas como Adaptativas.

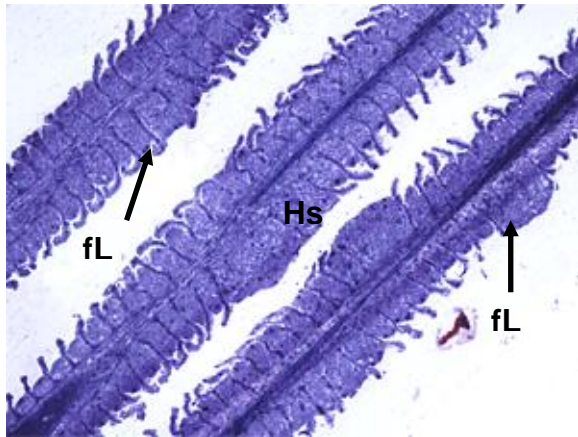


Figura 14.A. Corte de filamentos de una branquia de Tilapia, se observa el engrosamiento a nivel filamentar y lamelar, por la incrementada proliferación de células epiteliales; (Hiperplasia- Hs), la cual ocasiona la fusión lamelar (fL). Azul de Toluidina, 10x.

Figura 14.B. Corte de un filamento de branquia de Tilapia, donde se estima la pérdida o Atrfia Lamelar (At), causada por la hiperplasia que poco a poco va produciendo que las lamelas se fusionen hasta que pierden su propia identidad como estructura independiente, es decir, desaparecen. Azul de Toluidina, 40x.

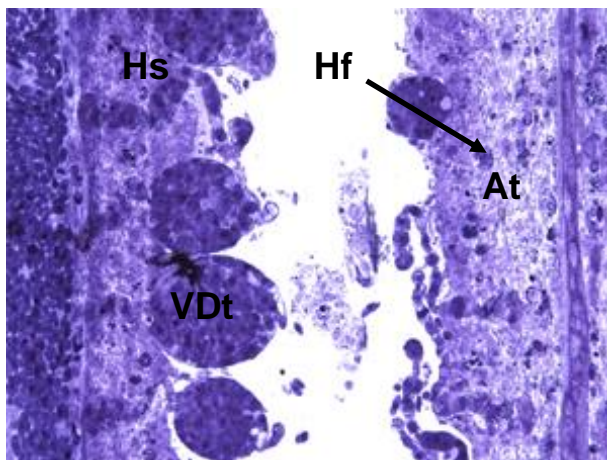
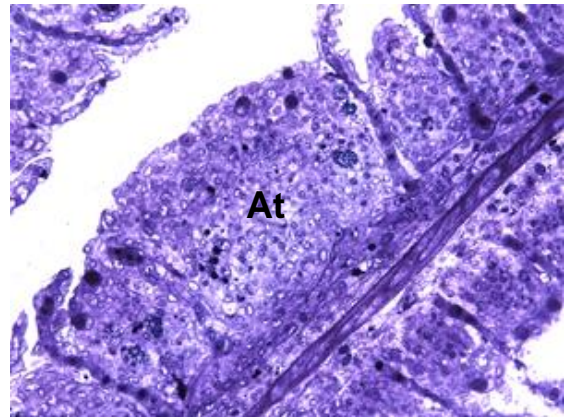
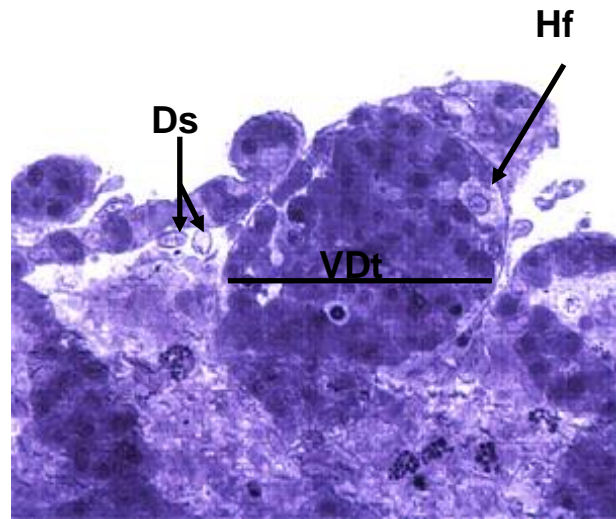


Figura 14.C. Corte de branquia de Tilapia, en donde se aprecia, a demás de la Atrfia Lamelar (At) y la hiperplasia (Hs) a nivel del filamento y de la lamela, Hipertrofia (Hf), la cual implica un crecimiento del tamaño celular. Es muy notoria la dilatación de los vasos de los filamentos los cuales se ven como estructuras globulares, en el extremo lamelar (VDt). Se observan muchos eritrocitos en su interior. Azul de Toluidina, 40x.

Figura 14.D. Corte de branquia de Tilapia, en el cual se aprecia con más detalle la hiperplasia del tejido epitelial, además de la hipertrofia (Hf) y la displasia (Ds) que se observa en algunas de ellas. También se aprecia la pérdida de la estructura lamelar (base lamelar) como tal. Se observa con detalle la dilatación del vaso sanguíneo lamelar (VDt), alterando en gran medida la estructura y función de la misma. Azul de Toluidina, 100x.



Corte de filamentos de branquia de tilapia, en los cuales se puede notar una alteración de tipo citoplasmático, en donde hay variaciones en el volumen celular; entendida como Tumefacción (T). En las siguientes figuras se destacan células de coloración muy clara y de gran tamaño, lo que las distingue de las células hipertrofiadas, en las cuales la coloración es más intensa. Se puede distinguir también células de formas atípicas conocido como displasia.

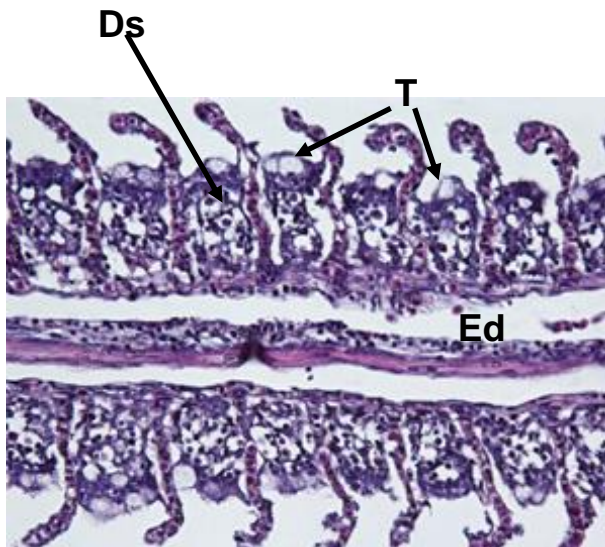
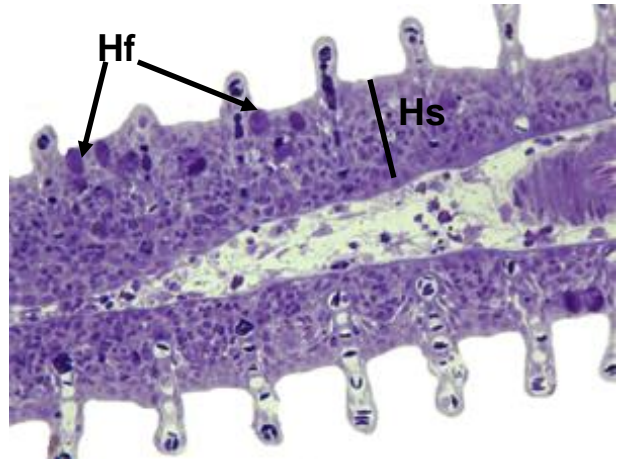


Figura 15.A En el corte de filamento de branquia, podemos observar varias células Tumefactas (T) y displasia (Ds), en el tejido conectivo, se aprecia edemas (Ed) en el espacio intersticial. H- E, 40x.

Figura 15.B. En este filamento de Branquia se aprecian células hipertrofiadas (Hf), que se pueden distinguir de las tumefactas por su intensidad en el color, a pesar de que son teñidas con el mismo colorante. Se observa hiperplasia por lo que el tejido se ha engrosado. Azul de Toluidina, 40x.



Las siguientes figuras muestran las alteraciones degenerativas que se presentan en los peces de la Laguna de Sonso por efecto directo del tóxico (metales), produciendo modificación de la arquitectura celular y tisular, generalmente irreversible y su persistencia y progresión pueden conducir a una pérdida parcial o total de la función del órgano.

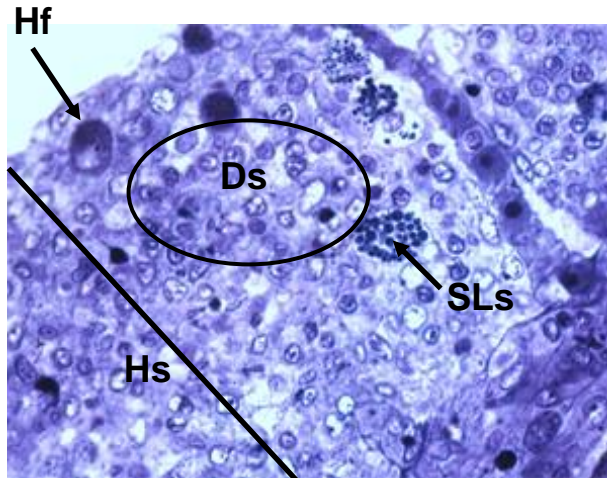


Figura 16.A. Corte de filamento de branquia de Tilapia, se identifican procesos de displasia (Ds) e hipertrofia (Hf), acompañadas de la hiperplasia (Hs) epitelial.

Se observan en algunas células acumulación de sustratos lisosomales (SLs) determinado posiblemente por el metabolismo anormal de estas células expuestas a metales. Azul de Toluidina, 100x.

Figura 16.B. Corte de filamento de branquia de Tilapia, donde se aprecia fenómenos nombrados anteriormente, además se observa el proceso de necrosis (Ns) del tejido, cambios morfológicos tales como la pérdida de la integridad de las membranas celulares, Cariorrexis (Cr), vacuolización (Vc). Azul de Toluidina, 100x.

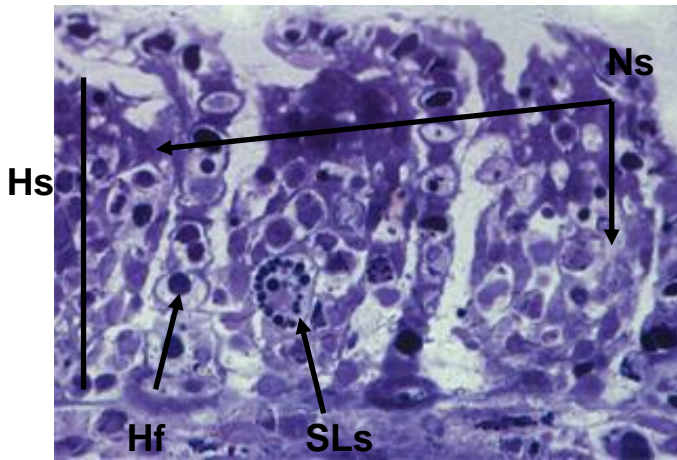
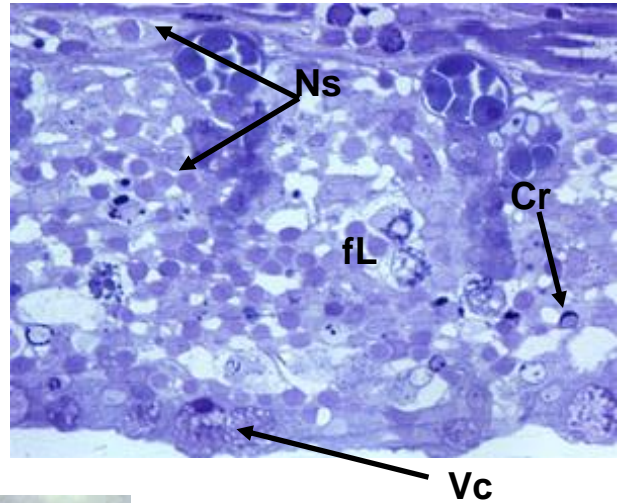
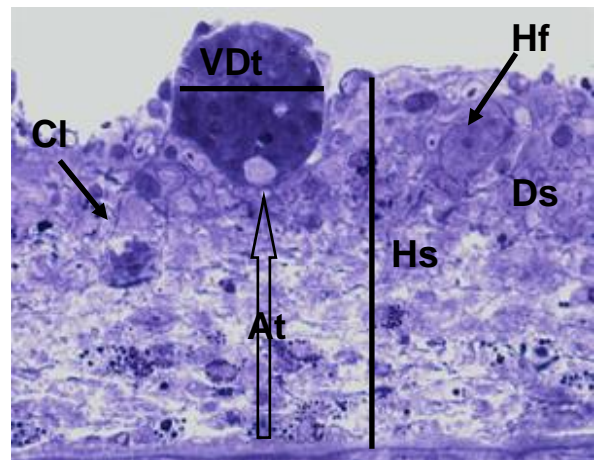


Figura 16.C. Corte de filamento de branquia de Tilapia, con hipertrofia (Hf), hiperplasia (Hs). En algunas células se visualiza procesos de cariorrexis en donde el núcleo se empieza a disgregar en acúmulos o fragmentos. También se observan células cuyos núcleos no se definen por acción de la necrosis. Azul de Toluidina, 100x.

Figura 16.D. Corte de branquia de Tilapia, con proceso necrótico avanzado en la región hiperplásica (Hs) y displásica (Ds) del tejido. Dado que no se observan límites celulares, hay muchas células necróticas (Ns) algunas de ella con cariólisis (Cl), se observan células hipertrofiadas (Hf), (At) y un vaso sanguíneo dilatado (VDt). Azul de Toluidina, 100x.



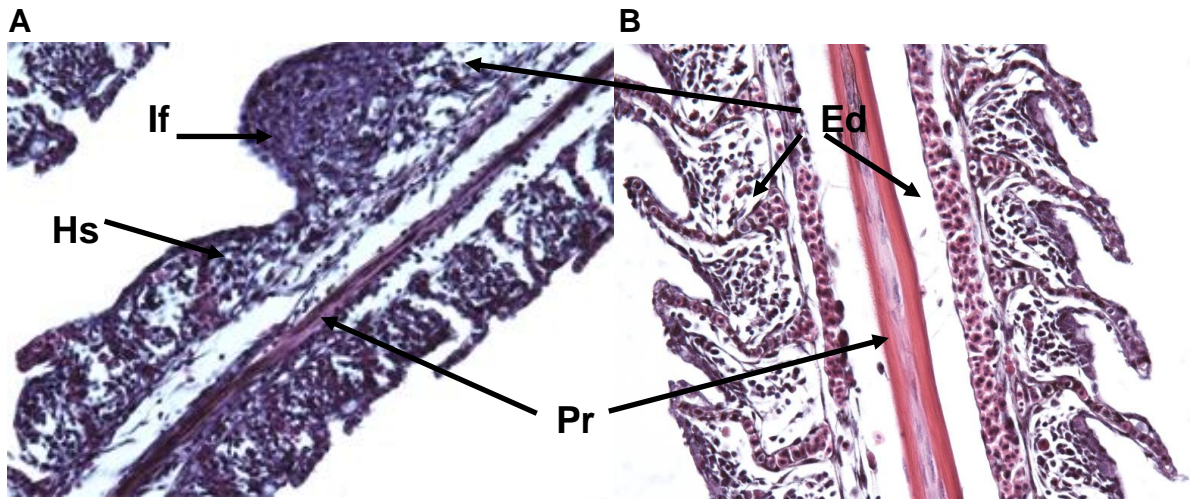


Figura 17. Corte de branquia de Tilapia, con alteraciones de tipo tisular, dadas por el daño causado en los tejidos como edema (Ed), e inflamación (If); el cual se caracteriza por el infiltrado celular, estos dos procesos son causados posiblemente por la acción de contaminantes como los metales en los órganos de la especie. Se aprecia, la proporción de tejido edematizado como franjas incolores en el tejido conjuntivo de la base lamelar, que corresponde a la gran cantidad de líquido que retiene el espacio intersticial del tejido (la formación del líquido tisular es mayor que la salida del mismo). **(A).** Es muy notoria la pérdida lamelar por fusión de las mismas, causada por la hiperplasia (Hs), hay edema y se observa claramente el proceso inflamatorio del tejido (If). **B,** Edema (Ed) en el tejido conjuntivo de la base lamelar, a lado y lado del Pericondrio (Pr) y debajo del tejido epitelial de las lamelas. H-E, 40x.

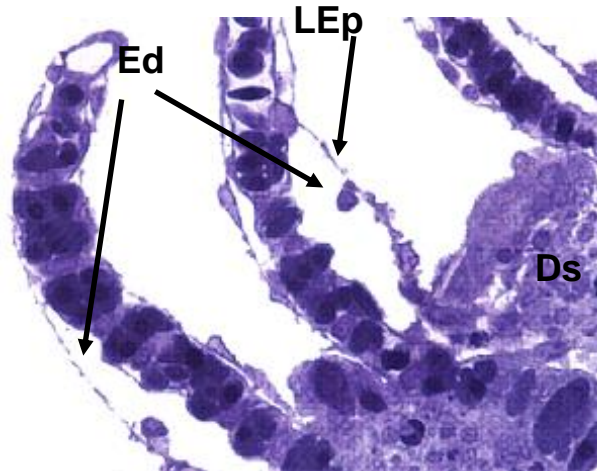


Figura 18. Corte de filamento de branquia de Tilapia, con Edema (Ed) lamelar subepitelial el cual permite que el epitelio no conserve su sitio anatómico normal y produce un levantamiento del mismo (LEp). En el tejido conectivo se presenta también edema y necrosis al igual que displasias (Ds) en el epitelio que lo recubre. Azul de Toluidina, 100x.

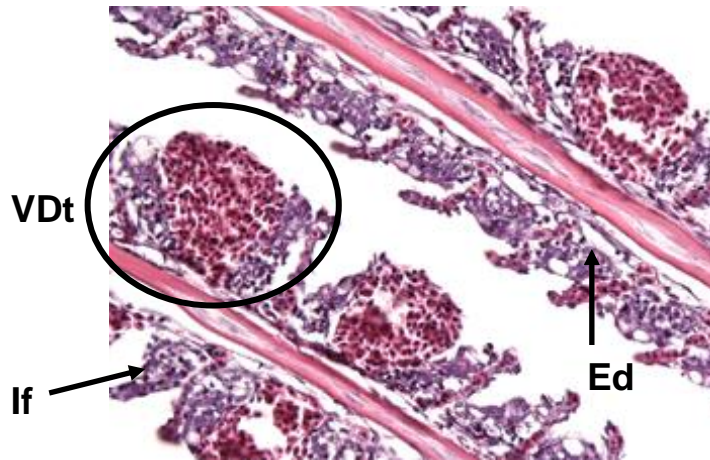


Figura 19. Corte longitudinal de filamentos de branquia de Tilapia. La dilatación de los vasos sanguíneos de las lamelas albergan gran cantidad de eritrocitos que se tiñen intensamente con este tipo de tinción. La atrofia lamelar, el tejido se presenta edematizado (Ed) y muestra procesos de inflamación (If) y tumefacción. H- E, 40x

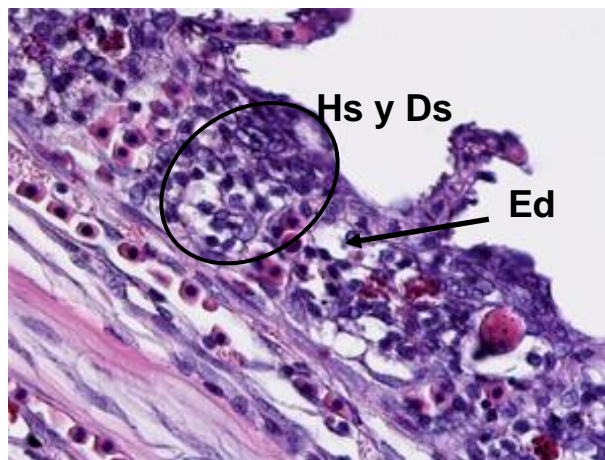


Figura 20. Corte longitudinal de filamento de branquia de Tilapia. Hiperplasia (Hs) y displasia (Ds) epitelial, además de la atrofia lamelar el tejido muestra edema (Ed). H-E 100x.

En las siguientes figuras se muestra un tipo de alteración muy marcada, siendo esta, la Distancia de Difusión Efectiva (DDE), la cual consiste en las variaciones que surgen a nivel lamelar, específicamente, el engrosamiento de las lamelas que intervienen en la difusión de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono a través del epitelio de las mismas.

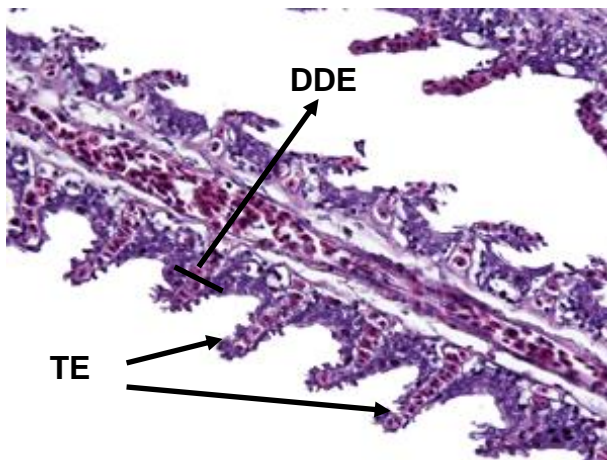
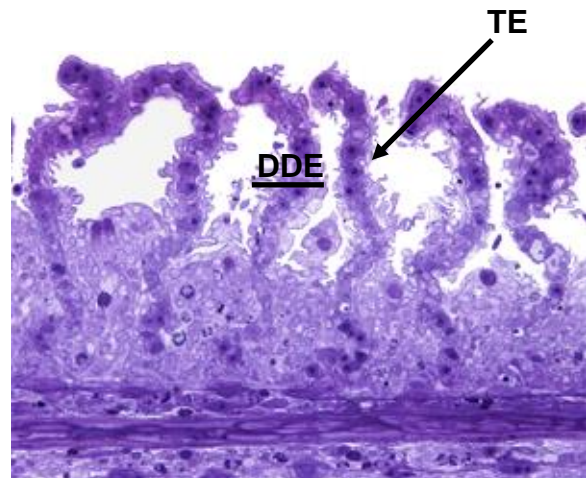


Figura 21.A. corte de un filamento de branquia de Tilapia, en donde se aprecia la excesiva proliferación del epitelio lamelar, notándose como crestas. Es de aclarar que a mayor grosor del tejido epitelial (TE) lamelar, menor eficiencia en el transporte de iones y gases de vital importancia para el pez. H-E, 40x.

Figura 21.B. Corte de filamento de branquia de Tilapia, el mal estado del tejido epitelial (TE) que afecta directamente la Distancia de Difusión Efectiva (DDE) de iones gases y otras sustancias. También se observa el daño en el tejido conectivo y su epitelio de recubrimiento, el tejido se observa displásico y necrótico. Azul de Toluidina, 40x.



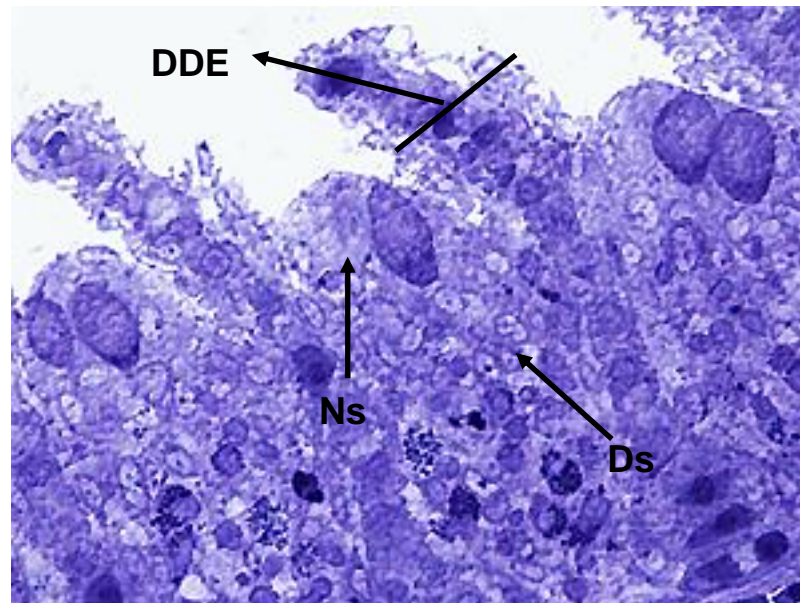


Figura 21.C. Corte de filamento de branquia de Tilapia, con varias alteraciones en el tejido hiperplásico como necrosis (Ns), displasias (Ds) y sobretodo trastornos en la Distancia de Difusión Efectiva (DDE). Lo que indica que a mayor presencia de las alteraciones anteriormente nombradas en este tejido en especial, disminuye la eficiencia en la difusión de gases y otras sustancias de gran importancia para la sobrevivencia de los peces. Azul de Toluidina, 100x.

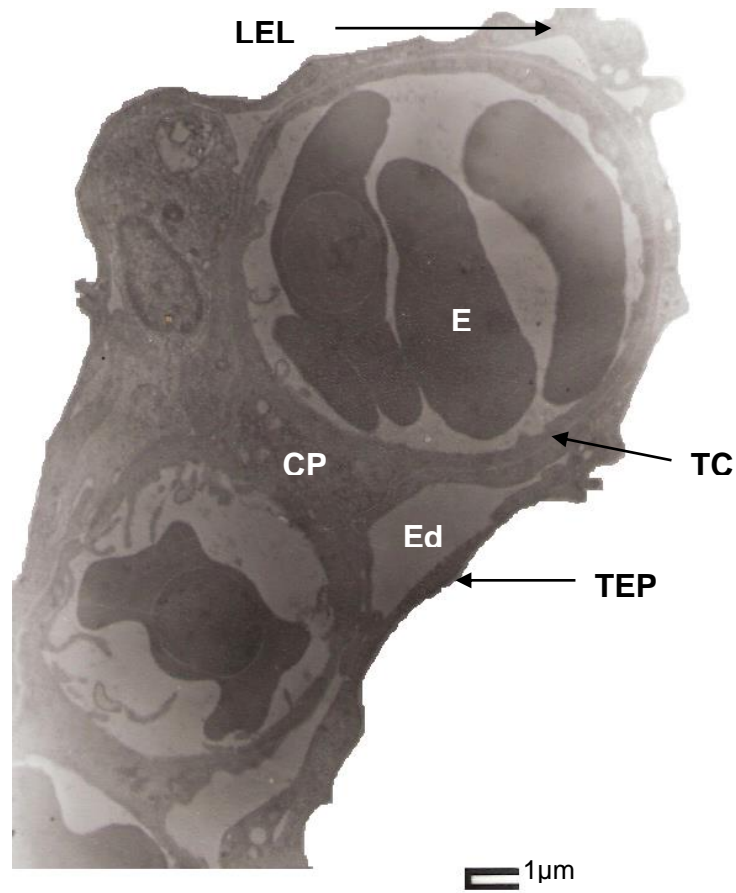


Figura 22. Corte de una lamela de branquia de Tilapia, donde se estiman las células pilares (CP) que van ubicadas entre los vasos sanguíneos que contienen los eritrocitos (E), levantamiento del epitelio lamelar (LEL) y Edema subepitelial (Ed). Además, se observa el tejido conectivo (TC) que recubre el vaso sanguíneo y el tejido epitelial plano simple (TEP) de la lamela. Microscopía Electrónica de Transmisión, 5000x.

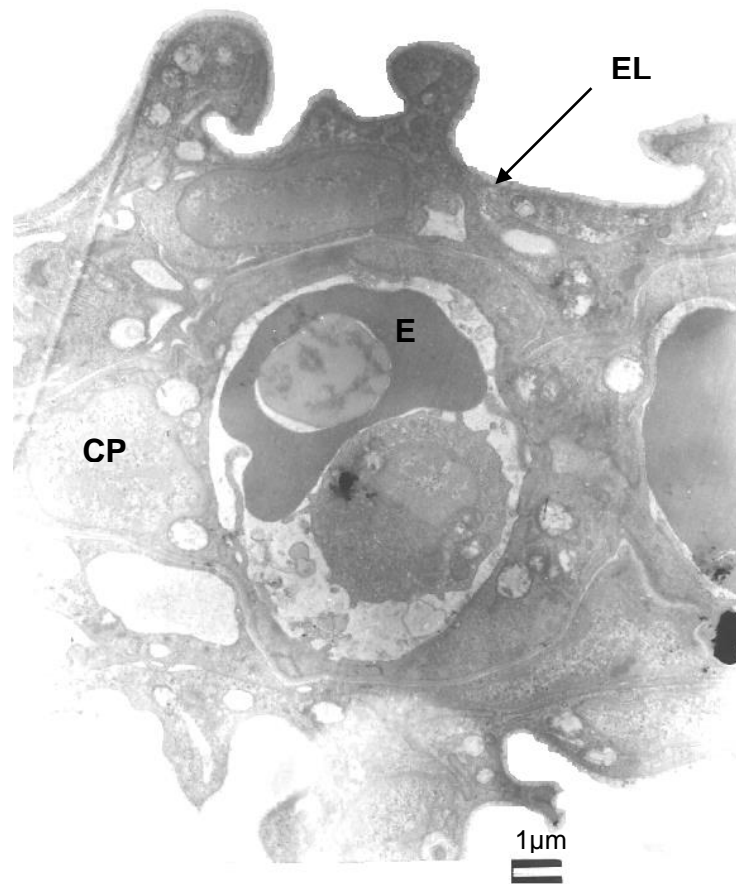


Figura 23. Corte de una lamela de branquia de Tilapia, donde se observan detalladamente las células pilares (CP), eritrocitos (E), epitelio lamelar (EL). Vale la pena aclarar que esta imagen fue tomada de un organismo colectado en la Laguna de Sonso, por lo que se explica que los eritrocitos hayan perdido su forma característica normal; además, el epitelio lamelar está engrosado y con forma irregular. Microscopía Electrónica de Transmisión, 5000x.

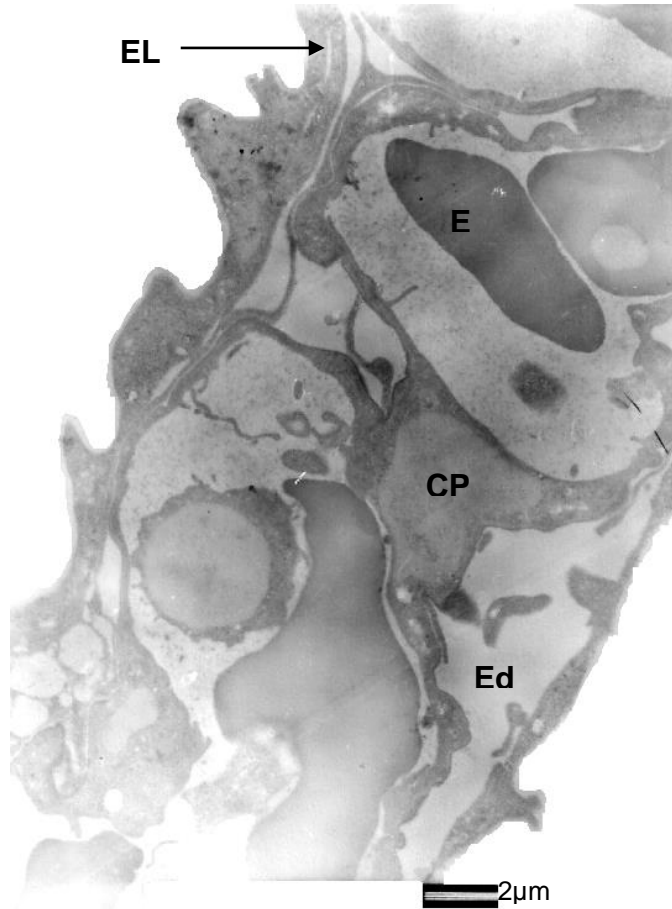


Figura 24. Corte de una lamela de branquia de Tilapia, donde se aprecian las células pilares (CP) en mal estado, eritrocitos (E), epitelio lamelar (EL), edema subepitelial (Ed). Nótese, que los vasos sanguíneos no están bien delimitados por su endotelio. Microscopía Electrónica de Transmisión, 4000x.

7.3. Morfología e histología en hepatopáncreas de tilapia (*Oreochromis niloticus*)

El hepatopáncreas es un órgano (glándula) del aparato digestivo, y es generalmente bilobulado y desemboca entre el estómago e intestino. Es común encontrarlo en artrópodos, gasterópodos y peces haciendo las funciones que los mamíferos desarrollan por separado el hígado y el páncreas. En los teleósteos no hay páncreas porque se difunde entre el estómago y los ciegos pilóricos, mientras que en los elasmobranquios sí hay páncreas. El tejido hepático es una masa de hepatocitos y no forma cordones como en otras especies (son como sinusoides desordenados), tienen glucógeno y el páncreas posee acinos pancreáticos (<http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Prodacuat/MORFOLOGIA.htm>).

La digestión se inicia en el estómago con los lípidos. El hepatopáncreas es la válvula digestiva por excelencia, distinguiéndose los siguientes tipos de células: las secretoras, que proporcionan numerosas enzimas digestivas de glúcidos, proteínas y lípidos, y las células de absorción, donde se acumula glucógeno (http://ar.geocities.com/caracolespatagonicos/el_caracol.htm).

El hepatopáncreas se localiza en los peces en la región media, anterior del diafragma; su consistencia es blanda, frágil y está constituido por un parénquima que comprende células epiteliales de origen endodérmico en el caso del componente hepático por hepatocitos y en el componente Pancreático por células acinares, y un sistema de conductos formado por células epiteliales, este parénquima descansa y es sostenido por una malla de tejido conectivo de consistencia muy laxa denominada estroma, estos dos tipos de componentes histológicos están sostenidos por una cápsula fibrosa fina que lo rodea. Macroscópicamente el hepatopáncreas se reconoce por su coloración rojo pardo que lo caracteriza.

El hepatopáncreas desempeña múltiples funciones en el organismo como son: producción de bilis (necesaria para la digestión de los alimentos); metabolismo de los carbohidratos (gluconeogénesis, glucogenólisis, glucogénesis); eliminación de insulina y de otras hormonas; metabolismo de los lípidos (síntesis de colesterol, producción de triglicéridos); síntesis de proteínas, como la albúmina y las lipoproteínas; desintoxicación de la sangre (neutralización de toxinas); transformación del amonio en urea, almacena también vitaminas y en ciertas etapas de la vida realiza hematopoyesis, entre otras. También metaboliza numerosos compuestos liposolubles, como los medicamentos, pesticidas y otras sustancias contaminantes (Metales). Muchos de los procesos denominados Detoxificantes consisten en hidrosolubilizar estos compuestos para eliminarlos en la mayoría de los casos por la orina (Geneser, 2002).

7.3.1. Descripción histológica del Hepatopáncreas de Peces Control. El hepatopáncreas posee una cápsula que lo recubre. Ésta, continúa hacia el interior de la glándula, donde divide el Parénquima Hepático en *Lobulillos* (la unidad estructural).

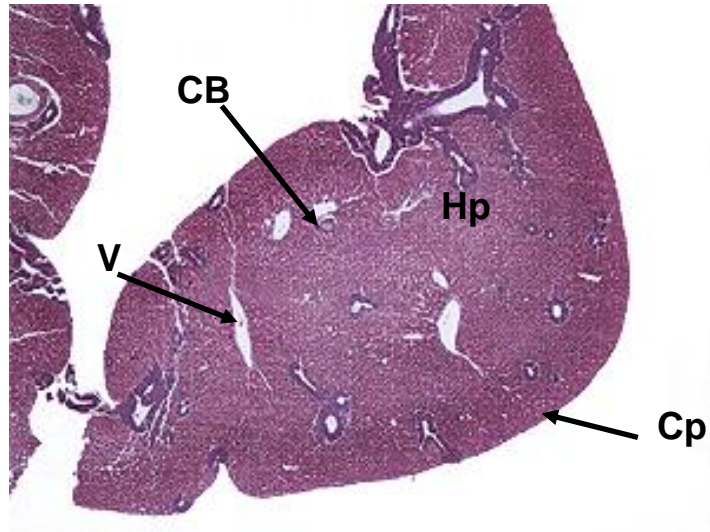


Figura 25. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia, la estructura a nivel macro, nótese principalmente las Venas (V) con su luz blanca, los Conductos Biliares (CB), las cadenas de hepatocitos (Hp) que junto con el sistema de conductos forman el parénquima Hepático. Cubriendo todo el órgano se encuentra la Cápsula (Cp). H- E 4x.

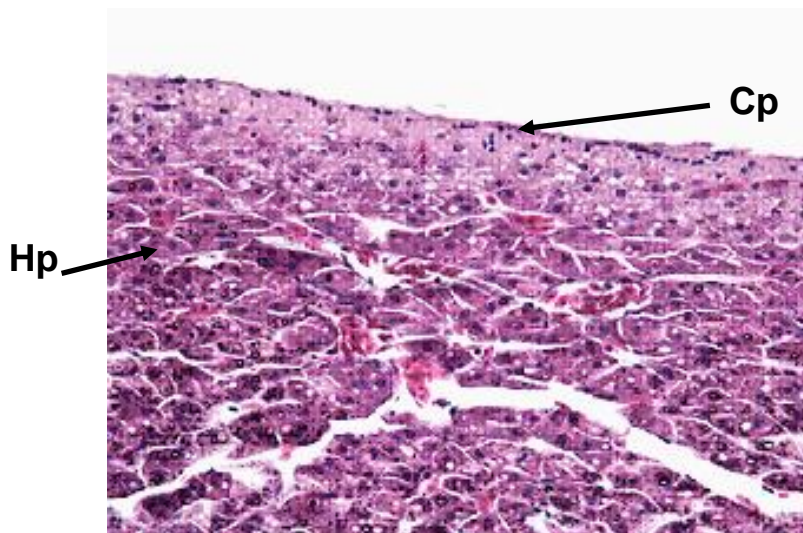


Figura 26. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia. A 40x las células que componen la Cápsula (Cp) y los cordones de Hepatocitos. H-E.

La unidad estructural hepática es el LOBULILLO HEPÁTICO, un prisma hexagonal. Los lobulillos están limitados por tejido conectivo interlobulillar y al corte transversal aparecen casi hexagonales, aunque de tamaño variable. En los vertebrados superiores como los mamíferos, se encuentran en las esquinas de los lobulillos (donde varios de ellos limitan entre sí) ramificaciones de una arteria, una vena y un conducto biliar, rodeados y sostenidos por tejido conectivo; este conjunto de elementos histológicos asociados se denominan *Triada Hepática* o *Trama Vascular*. Ferguson en el 2006 afirma que las Triadas típicas no son regularmente encontradas en peces, pero las ***Diadas Hepáticas*** pueden ser vistas más frecuentemente, compuestas por un Conducto Biliar y una Vena o una Arteria. En contraste con lo anterior, en la figura **B** se encuentran Triadas (Td) con sus respectivos elementos (arteria, vena y conducto biliar).

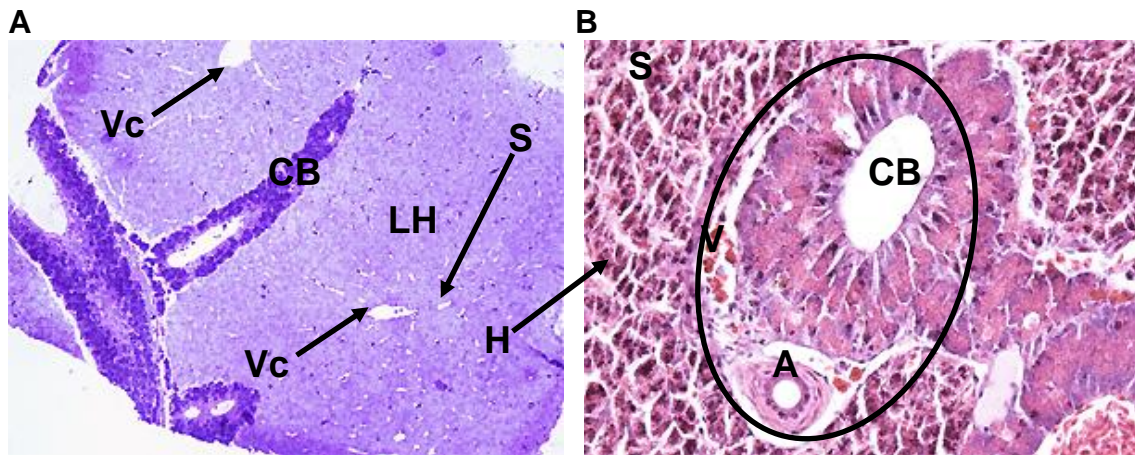
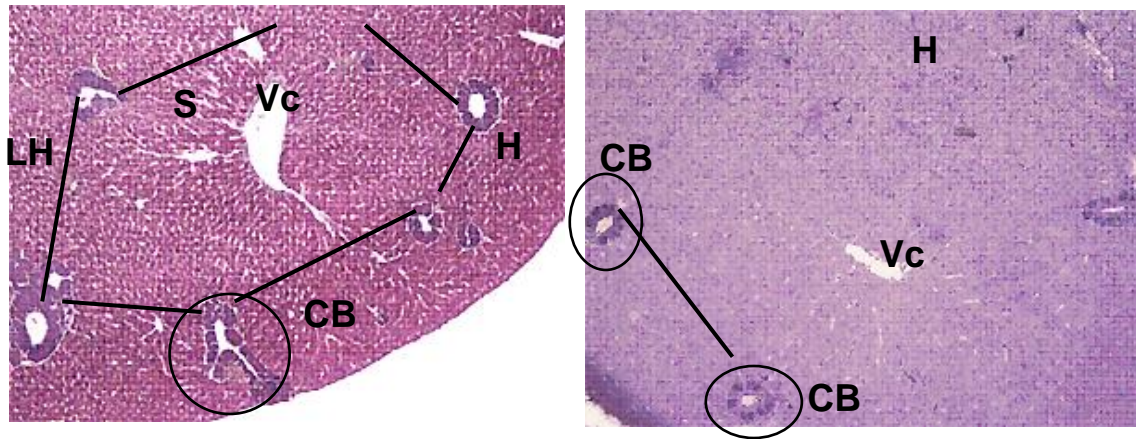


Figura 27. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, donde se observan la distribución de los elementos estructurales de la región hepática para formar los Lobulillos Hepáticos (LH) en cuyo centro se aprecia una Vena (Vc) a la cual confluyen los Sinusoides (S) y las cadenas de Hepatocitos (H). En el centro del corte se aprecia una prolongación del Conducto Biliar (CB) para formar la *Diada* en el ángulo del Lobulillo Hepático. **A.** *Diada* conformada por una Vena y un Conducto Biliar. **B.** *Triada* conformada por una Arteria (A), su Conducto Biliar y una vena (V). **A.** Azul de Toluidina, 10x; **B.** H-E, 40x.

Se tiene que al componente hepático hepatopáncreas penetran una Arteria y una Vena que se ramifican poco a poco a medida que se profundiza el órgano, mientras que el Conducto Hepático sale de él para secretar la bilis, en la vesícula biliar también abandonan el hepatopáncreas las venas hepáticas. (Geneser, 2002).

El lobulillo hexagonal con forma de prisma fue descrito por Malpighi y se denomina LOBULILLO HEPÁTICO CLÁSICO en humanos. En principio se considera una unidad estructural anatómica, pero para muchos autores también es una unidad funcional (Geneser, 2002).



A **B**
Figura 28. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia, donde se observan las diferentes estructuras que conforman el Lobulillo Hepático Clásico (LH): la Vena Central (Vc), los sinusoides (S), las Díadas (Dd) o Triadas (Td), Conductos Biliares (CB) y los hepatocitos. **A.** H-E, 10x; **B.** Azul de Toluidina, 10x.

En el corte transversal se observa que los lobulillos Hepáticos están compuestos por cordones de Hepatocitos que irradian hacia el centro desde la periferia hacia la Vena Central; separados por los sinusoides. Los sinusoides comunican las ramificaciones de terminales de la arteria y la vena nombradas anteriormente, con la vena central, que representa el comienzo de las venas hepáticas. Pero es a través de los sinusoides que los hepatocitos intercambian sustancias entre ellos y la circulación y es a través de los sinusoides que los hepatocitos envían productos que han metabolizado hacia la circulación a través de las venas hepáticas.

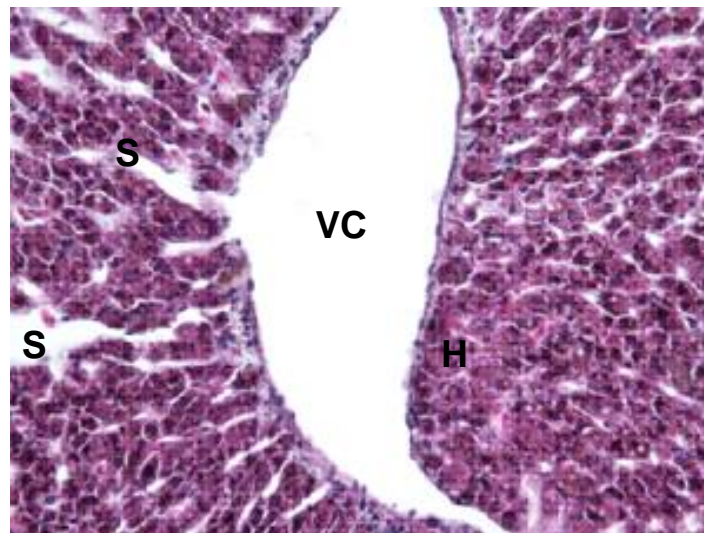


Figura 29. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia, en el que se aprecian los cordones de Hepatocitos (H), los Sinusoides (S) y la Vena Central (VC). H- E, 100x.

Una unidad más pequeña y/o subdivisión del Lobulillo Hepático (Ham, 1988) es el ACINO HEPÁTICO, que representa la mínima unidad funcional, según concepciones modernas en humanos (Geneser, 2002). El Acino Hepático se compone de la cantidad de parénquima hepático que se encuentra entre las dos venas centrales e incluye ramificaciones terminales de la arteria, vena y conducto biliar (una Díada Hepática o trama vascular).

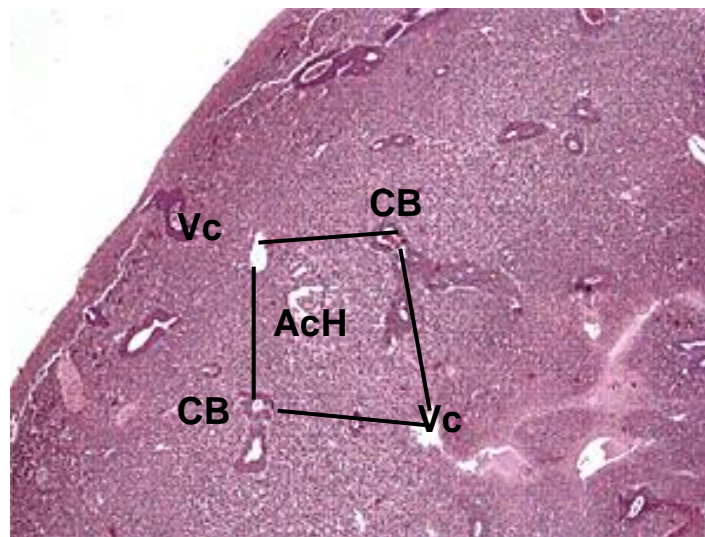


Figura 30. Corte transversal de hepatopáncreas de Tilapia, en el que se observa un Acino Hepático (AcH), nótese bien las dos Venas Centrales (VC) y las Díadas o Triadas en donde se localizan los conductos biliares (CB) que lo conforman. H-E, 10x.

De esta manera el acino recibe la irrigación sanguínea de las ramas terminales de la arteria o la vena y emite su producto de secreción exocrina al conducto biliar. Las células de cada acino forman, además, zonas funcionales concéntricas, en las cuales las células más cercanas al eje (Trama Vascular) reciben sangre más rica en oxígeno y sustancias y nutrientes que las células de las zonas más periféricas. En consecuencia las células más internas tienen mayor capacidad de regeneración que las de la periferia (es decir, cerca de la vena central) y más expuestas a concentraciones mucho mayores de productos metabólicos de desecho (Geneser, 2002; Ham, 1988).

Los Sinusoides hepáticos son más grandes e irregulares que los capilares y poseen una pared muy delgada compuesta por células endoteliales, éstas se encuentran separadas de las células hepáticas por el Espacio Perisinusoidal. En este espacio el hepatocito realiza el intercambio de sustancias con el sinusoides. Los Hepatocitos son células parenquimatosas poliédricas grandes. Por lo general los hepatocitos poseen seis superficies, el núcleo es grande de forma redondeada y de localización central; con un nucléolo muy marcado (Geneser, 2002; Ham, 1988).

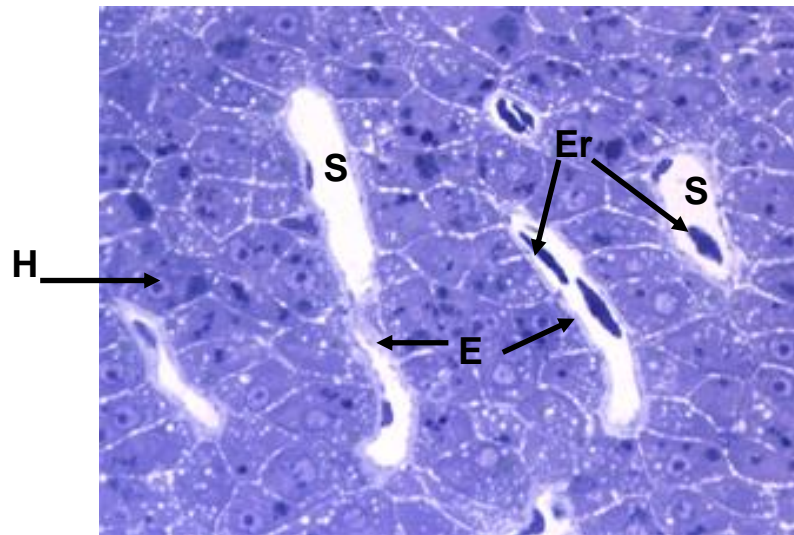


Figura 31. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, en donde se aprecian los Sinusoides (S) con su fino endotelio (E) y Eritrocitos (Er) en su interior. La estructura típica de los hepatocitos (H), forman cadenas con otros a lado y lado de cada sinusoide. El hepatocito (H) tiene forma poligonal, presenta por lo general un núcleo con un nucléolo muy marcado. Es importante aclarar que aunque esta fotografía es de un hepatopáncreas de un pez control, es patológica, pues se observa que en el interior de los hepatocitos hay vacuolización y algunas células que han perdido su núcleo, es decir, que están necróticas. Azul de Toluidina, 100x.

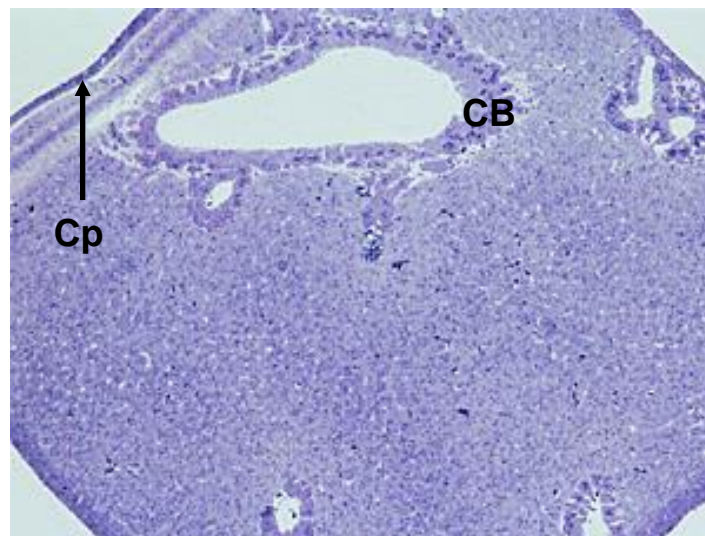


Figura 32. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, en el cual se visualiza la Cápsula (Cp), y el conducto Biliar (CB). Azul de Toluidina, 10x.

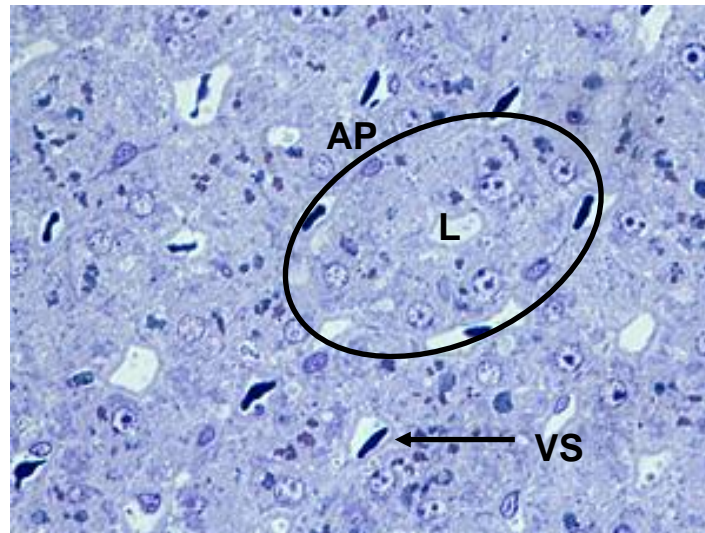
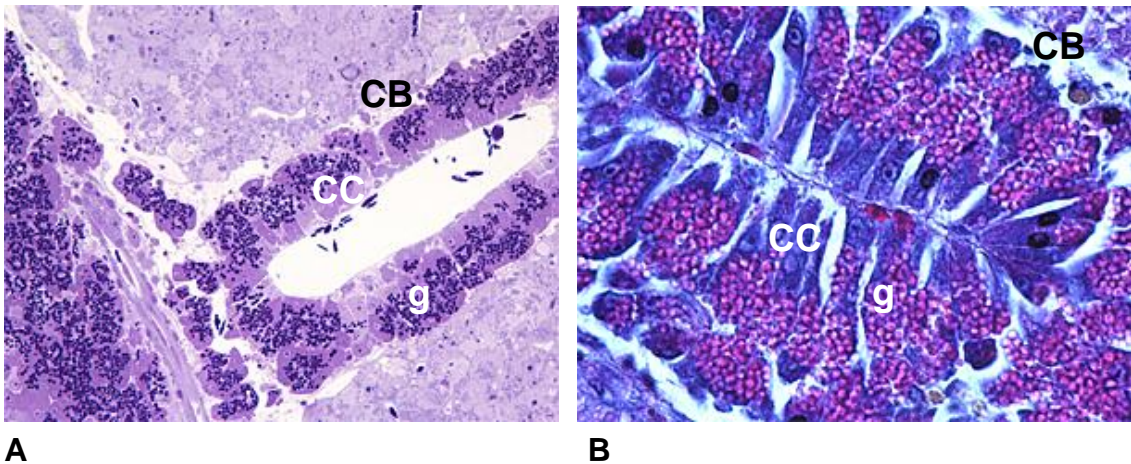


Figura 33. Corte transversal de la región del Páncreas del Hepatopáncreas de Tilapia, donde se observan a gran tamaño los Acinos Pancreáticos (AP,) estos acinos son de tipo seroso; sus células tienen forma piramidal y sus ápices convergen en una luz (L) en donde se vierte la secreción celular, cada célula se caracteriza por presentar un núcleo redondo y de disposición basal, los acinos están irrigados por vasos sanguíneos (VS). Azul de Toluidina, 100x.



A **B**
Figura 34. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, donde se aprecia el Conducto Biliar (CB) conformado por Epitelio Cilíndrico Estratificado, apreciándose sus células cilíndricas (CC) que contienen gránulos (g) de almacenamiento de sustancias en la porción apical de las mismas. El núcleo (Nu) es basal y esférico. **A.** Azul de Toluidina, 40x; **B.** H-E, 100x.

7.3.2. Descripción histológica del Hepatopáncreas de Peces Expuestos. Aunque los Mamíferos son organismos muy diferentes y alejados evolutivamente de los Peces, se pueden establecer puntos de comparación (extrapolaciones) en cuanto a patología e histología se refiere, además, se debe tener en cuenta que ambos (peces y mamíferos) pertenecen al mismo reino (Animal). En esta investigación se tuvieron en cuenta referencias bibliográficas de histología (Ham, 1998; Geneser, 2002) y patología humana (Robbins *et al.*, 2005) para identificar los cambios histológicos dados por efecto de los metales en el Hepatopáncreas de la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) particularmente.

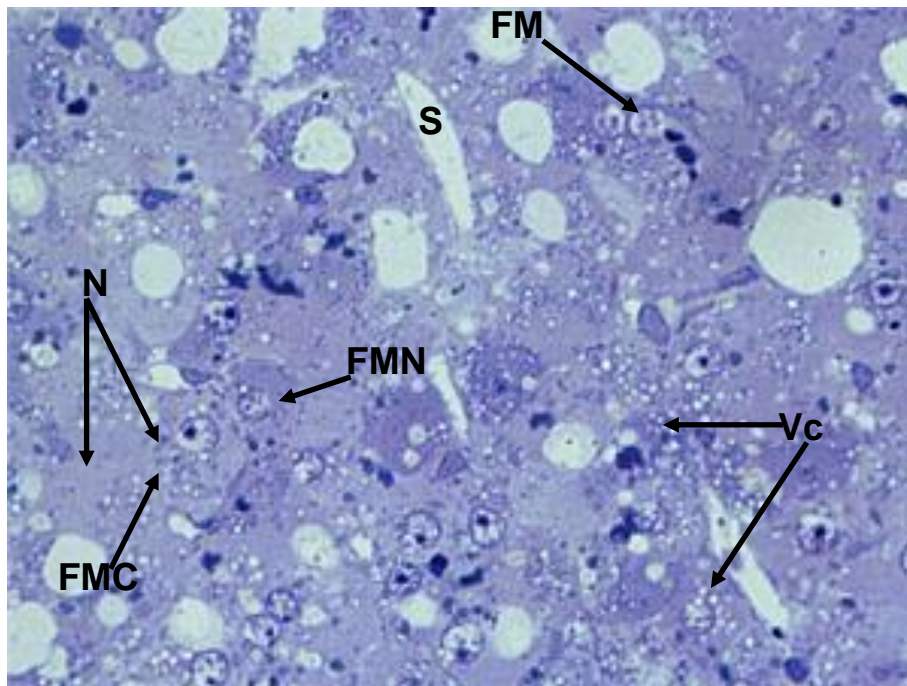


Figura 35. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la cual se observa el proceso Necrótico (N), mostrando los siguientes cambios: Fragmentación de Membrana Nuclear (FMN), Fragmentación de la Membrana Celular (FMC), Vacuolización (Vc); además, se aprecian figuras mitóticas (FM), los sinusoides (S) son de aspecto normal. Azul de Toluidina, 100x.

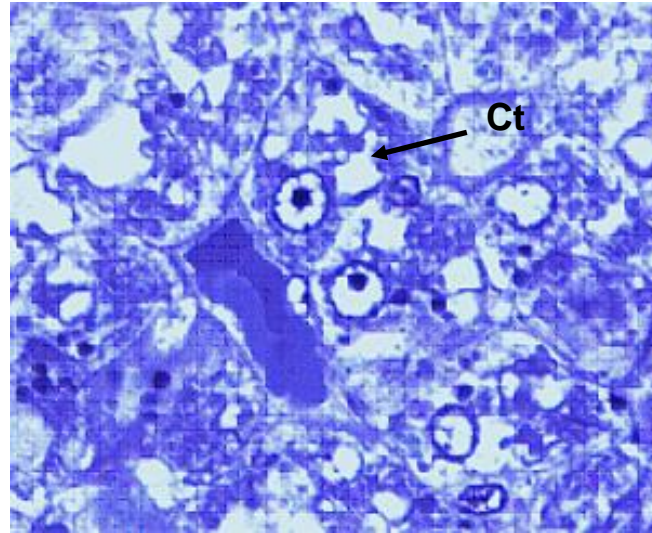


Figura 36. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, donde se aprecian las características típicas de un tejido necrótico; el citoplasma (Ct) no tiene una coloración uniforme y los hepatocitos no conservan su forma característica. Azul de toluidina, 100x.

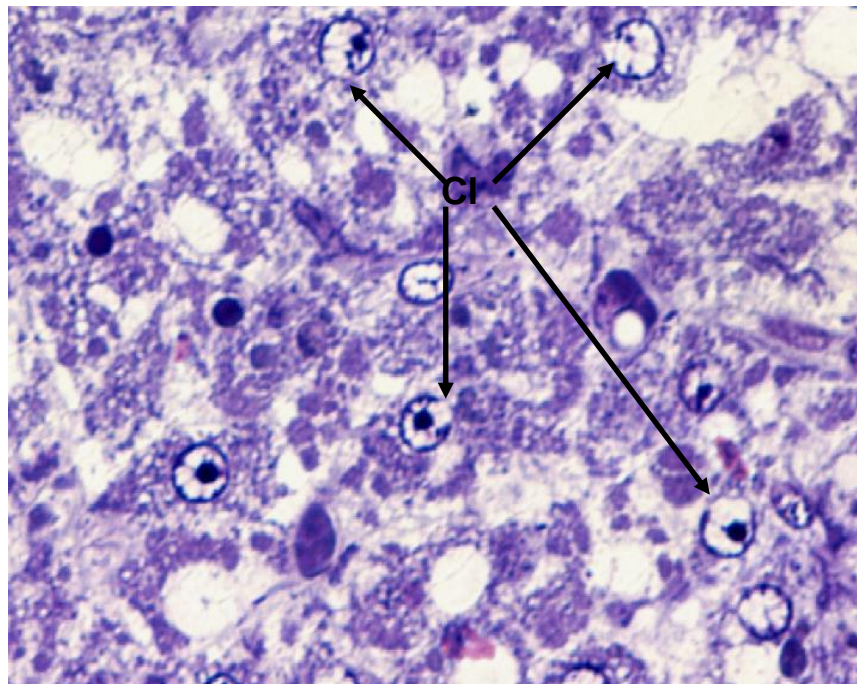


Figura 37. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, donde se observa claramente uno de los procesos típicos de la necrosis, la Cariólisis (CI) o rompimiento de membranas nucleares y pérdida de los límites celulares. Azul de toluidina, 100x.

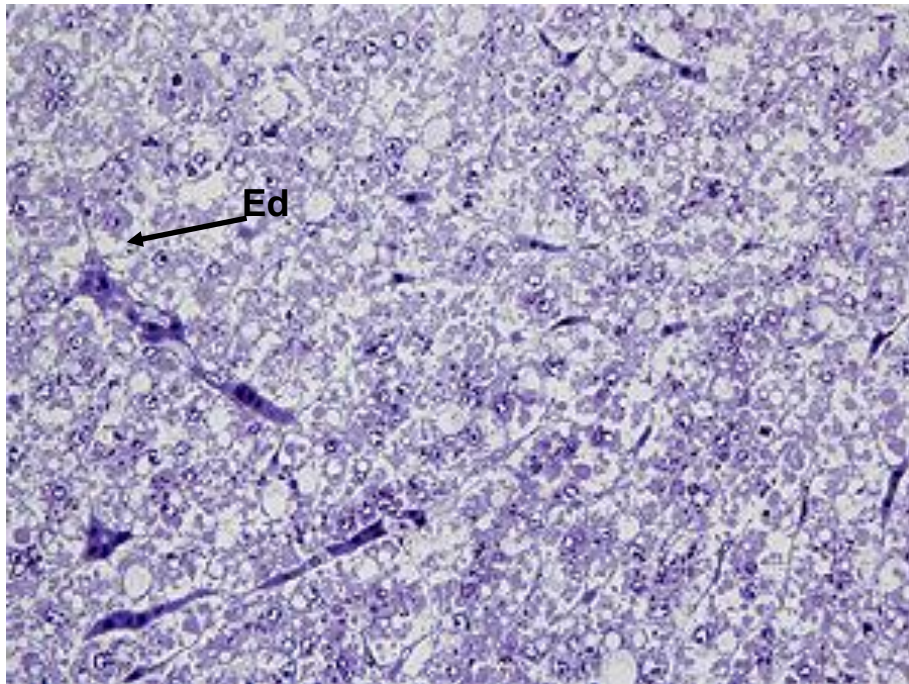


Figura 38. Corte transversal de Hepatopáncreas de Tilapia, en el cual se aprecia Necrosis en estado avanzado, notándose Edema - Ed (espacios blancos irregulares), deterioro de sinusoides y espacio perisinusoidal. Azul de Toluidina, 40x.

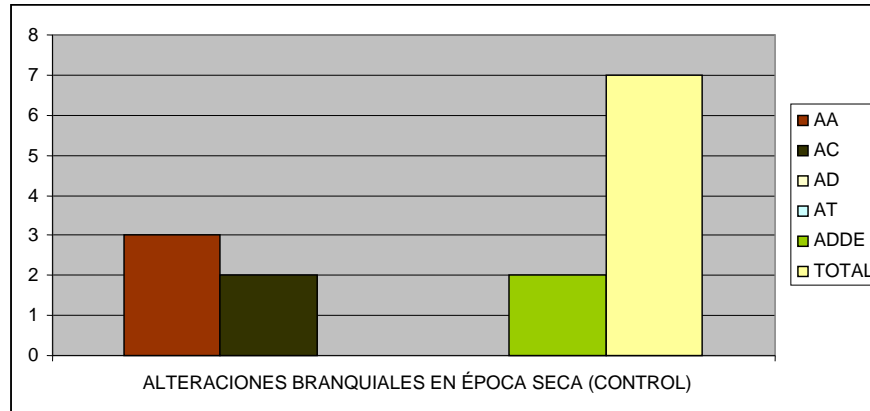
7.4. Resultados cuantitativos del biomarcador histopatológico (variables dependientes o de respuesta)

Cuadro 9. Registro de las alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en el Río Patía (Peces control) en época húmeda y seca.

CONTROLES BRANQUIA							
EPOCA	INDIVIDUO	AA	AC	AD	AT	ADDE	TOTAL
SECA	1	0	1	0	0	0	1
	2	1	0	0	0	0	1
	3	0	0	0	0	0	0
	4	1	0	0	0	1	2
	5	0	1	0	0	1	2
	6	1	0	0	0	0	1
	TOTAL	3	2	0	0	2	7
HÚMEDA	1	0	0	0	1	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
	7	1	1	1	1	1	5
	TOTAL	1	1	1	1	1	5

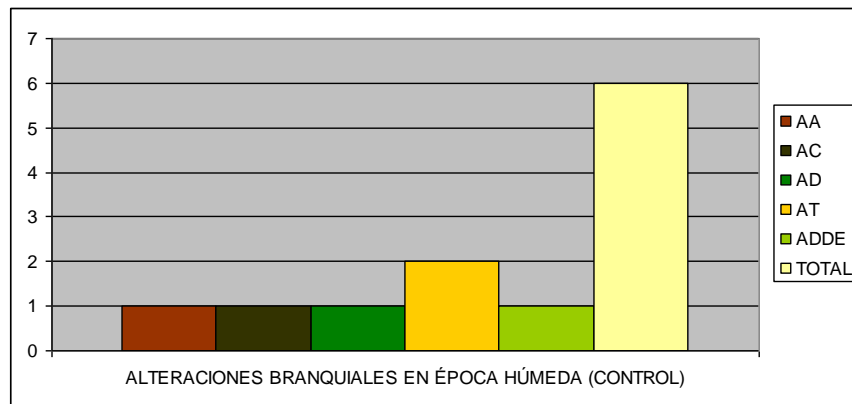
Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Gráfica 2. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en el Río Patía (Peces control) en época seca.



Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Gráfica 3. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en el Río Patía (Peces control) en época húmeda.



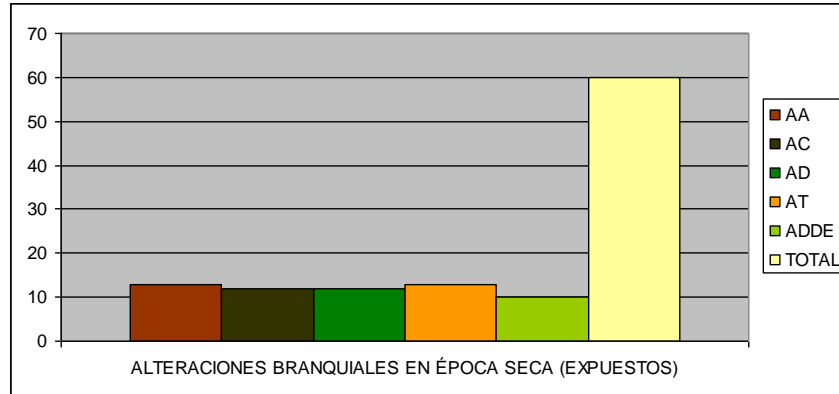
Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Cuadro 10. Registro de las alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época húmeda y seca.

EXPUESTOS BRANQUIA (LAGUNA DE SONSO)							
EPOCA	INDIVIDUO	AA	AC	AD	AT	ADDE	TOTAL
SECA	1	1	1	1	1	1	5
	2	1	1	1	1	1	5
	3	1	1	1	1	1	5
	4	1	1	1	1	1	5
	5	1	1	1	1	1	5
	6	1	1	1	1	1	5
	7	1	1	1	1	0	4
	8	1	1	1	1	1	5
	9	1	1	1	1	1	5
	10	1	1	1	1	0	4
	11	1	0	0	1	0	2
	12	1	1	1	1	1	5
	13	1	1	1	1	1	5
	TOTAL	13	12	12	13	10	60
HÚMEDA	1	1	1	1	1	1	5
	2	1	1	1	1	1	5
	3	1	1	1	1	1	5
	4	1	1	1	1	1	5
	5	1	1	1	1	1	5
	6	1	1	1	1	1	5
	7	1	1	1	1	1	5
	8	1	1	1	1	1	5
	9	1	1	1	1	1	5
	10	1	1	1	1	1	5
	TOTAL	10	10	10	10	10	50

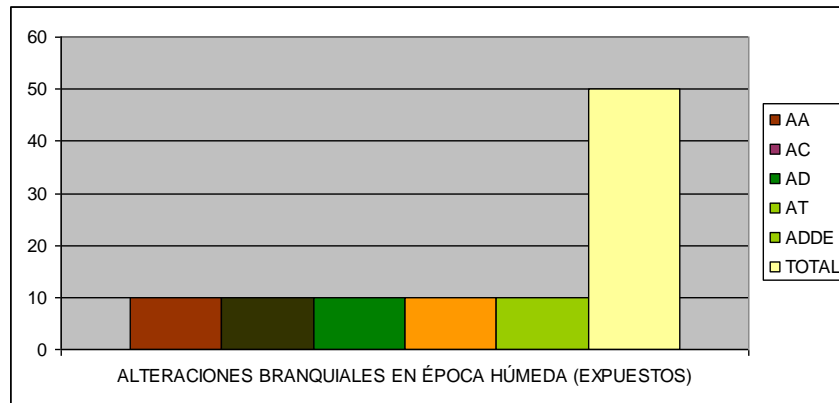
Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Gráfica 4. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época seca.



Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Gráfica 5. Abundancia de alteraciones histológicas de branquia en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época húmeda.



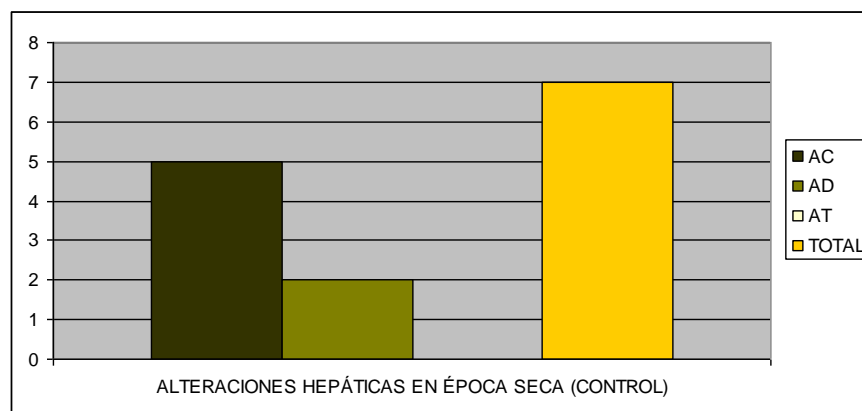
Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Cuadro 11. Registro de las alteraciones histológicas de hepatopáncreas de tilapia colectadas en el Río Patía (Peces control) en época húmeda y seca.

CONTROLES HEPATOPÁNCREAS (RÍO PATÍA)					
EPOCA	INDIVIDUO	AC	AD	AT	TOTAL
SECA	1	1	0	0	1
	2	1	0	0	1
	3	0	1	0	1
	4	1	1	0	2
	5	1	0	0	1
	6	1	0	0	1
	TOTAL	5	2	0	7
HÚMEDA	1	1	1	0	2
	2	0	1	0	1
	3	1	0	0	1
	4	0	1	0	1
	5	1	0	0	1
	6	0	1	0	1
	7	0	1	0	1
	TOTAL	3	5	0	8

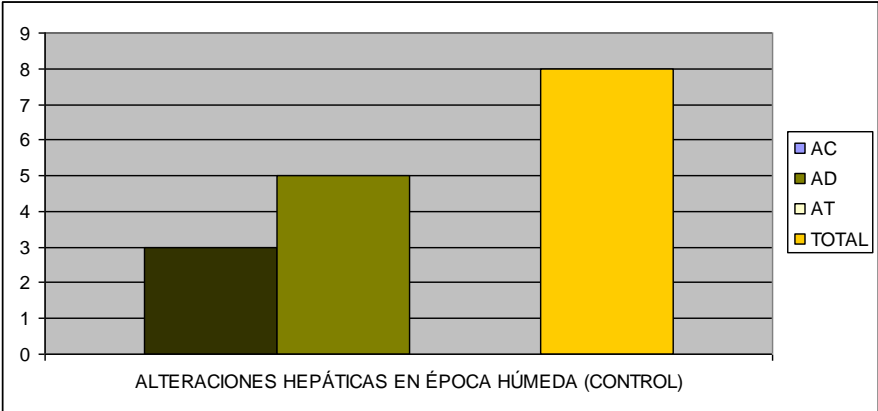
Alteraciones Citoplasmáticas (AC), Degenerativas (AD)

Gráfica 6. Abundancia de alteraciones histológicas de hepatopáncreas en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en el Río Patía (Peces control) en época seca.



Citoplasmáticas (AC), Degenerativas (AD), Tisulares (AT).

Gráfica 7. Abundancia de alteraciones histológicas de hepatopáncreas en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en el Río Patía (Peces control) en época húmeda.



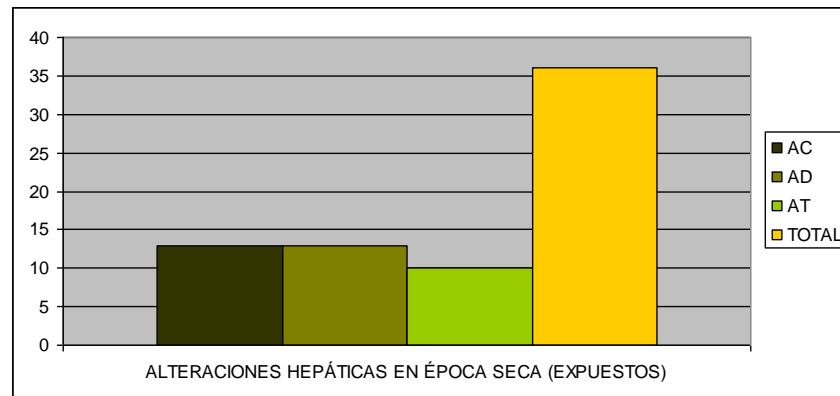
Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**)

Cuadro 12. Registro de las alteraciones histológicas de hepatopáncreas de tilapia colectadas en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época húmeda y seca.

EXPUESTOS HEPATOPÁNCREAS (LAGUNA DE SONSO)					
EPOCA	INDIVIDUO	AC	AD	AT	TOTAL
SECA	1	1	1	1	3
	2	1	1	0	2
	3	1	1	1	3
	4	1	1	1	3
	5	1	1	1	3
	6	1	1	0	2
	7	1	1	1	3
	8	1	1	1	3
	9	1	1	1	3
	10	1	1	1	3
	11	1	1	1	3
	12	1	1	0	2
	13	1	1	0	2
	TOTAL	13	13	9	35
HÚMEDA (6)	1	1	1	0	2
	2	1	1	0	2
	3	1	1	1	3
	4	1	1	1	3
	5	1	1	0	2
	6	1	1	1	3
	7	1	1	0	2
	8	1	1	1	3
	9	1	1	0	2
	10	1	1	0	2
	TOTAL	10	10	4	24

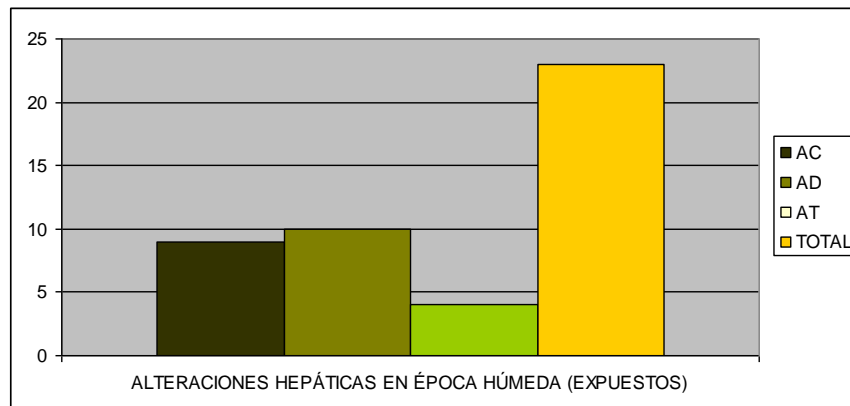
Alteraciones Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**)

Gráfica 8. Abundancia de alteraciones histológicas de hepatopáncreas en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época seca.



Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**)

Gráfica 9. Abundancia de alteraciones histológicas de hepatopáncreas en los peces (*Oreochromis niloticus*) colectados en la Laguna de Sonso (Peces expuestos) en época húmeda.



Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**)

7.5. Resultados de análisis de imágenes

La segmentación realizada por la aplicación software no presentó problemas en su proceso, gracias a que se estandarizaron las condiciones de captura de la imagen y de iluminación. La figura 34 muestra una imagen de los tres filamentos de un individuo normal, esta imagen fue tomada del banco de 39 imágenes que tiene el sistema.

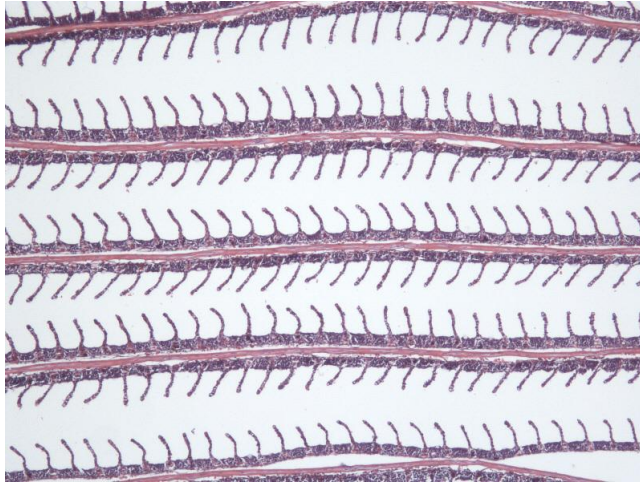


Figura 39. Imagen de los tres filamentos de un individuo normal. H-E, 10x.

La figura 40 muestra la segmentación de la imagen mostrada en la figura 39. Las zonas en rojo corresponden a las lamelas y las zonas en negro corresponden a los filamentos. Los otros filamentos que aparecen en la imagen son excluidos, así mismo las lamelas que se encuentran unidas al borde de la imagen. Luego de segmentada la imagen se extraen las características.



Figura 40. Imagen segmentada de los tres filamentos de un individuo normal. Fuente: Manuel Castrillón.

Para valorar los resultados de la aplicación software se realizó una prueba diagnóstica, probando la respuesta de la aplicación ante las patologías lamelares para la cual se diseñó. Se asignaron valores a las alteraciones teniendo en cuenta su presencia o ausencia en el tejido, el cero (0) indicó ausencia y el uno (1) presencia. La aplicación se comparó con resultados ya diagnosticados de alteraciones adaptativas (AA) y de alteración de distancia de difusión efectiva (ADDE). Se tuvieron en cuenta 13 controles y 20 individuos expuestos con diagnóstico confirmado por el observador.

Cuadro 13. Registro de las alteraciones histológicas de branquia de tilapia colectadas en el Río Patía (Peces expuestos) en época húmeda y seca, comparadas con el análisis de imágenes LEICA Q550IW.

CONTROLES BRANQUIA					
EPOCA	INDIVIDUO	AA(S)	ADDE (S)	AA(O)	ADDE(O)
SECA	1	0	0	0	0
	2	0	0	1	0
	3	0	0	0	0
	4	1	1	1	1
	5	0	1	0	1
	6	1	0	1	0
HÚMEDA	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	1	0	0
	5	0	1	0	0
	6	0	0	0	0
	7	1	1	1	1

AA (Alteraciones Adaptativas), ADDE (Alteraciones en la Distancia de Difusión Efectiva), S (Datos del Programa), O (Datos del Observador).

Cuadro 14. Registro de las alteraciones histológicas de branquia de tilapia colectadas en la Laguna de Sonso (Peces Expuestos) en época húmeda y seca, comparadas con el análisis de imágenes. LEICA Q550IW.

EXPUESTOS BRANQUIA					
EPOCA	INDIVIDUO	AA(S)	ADDE (S)	AA(O)	ADDE(O)
SECA	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1
	3	1	0	1	1
	4	1	1	1	1
	5	1	1	1	1
	6	1	1	1	1
	7	1	0	1	0
	8	1	1	1	1
	9	1	1	1	1
	10	1	1	1	0
	11	0	1	1	0
	12	1	1	1	1
	13	1	1	1	1
HÚMEDA	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1
	3	1	1	1	1
	4	1	1	1	1
	5	1	1	1	1
	6	1	1	1	1
	7	1	1	1	1

AA (Alteraciones Adaptativas), ADDE (Alteraciones en la Distancia de Difusión Efectiva), S (Datos del Programa), O (Datos del Observador).

7.6. Resultado de biomarcador genotóxico (micronúcleos)

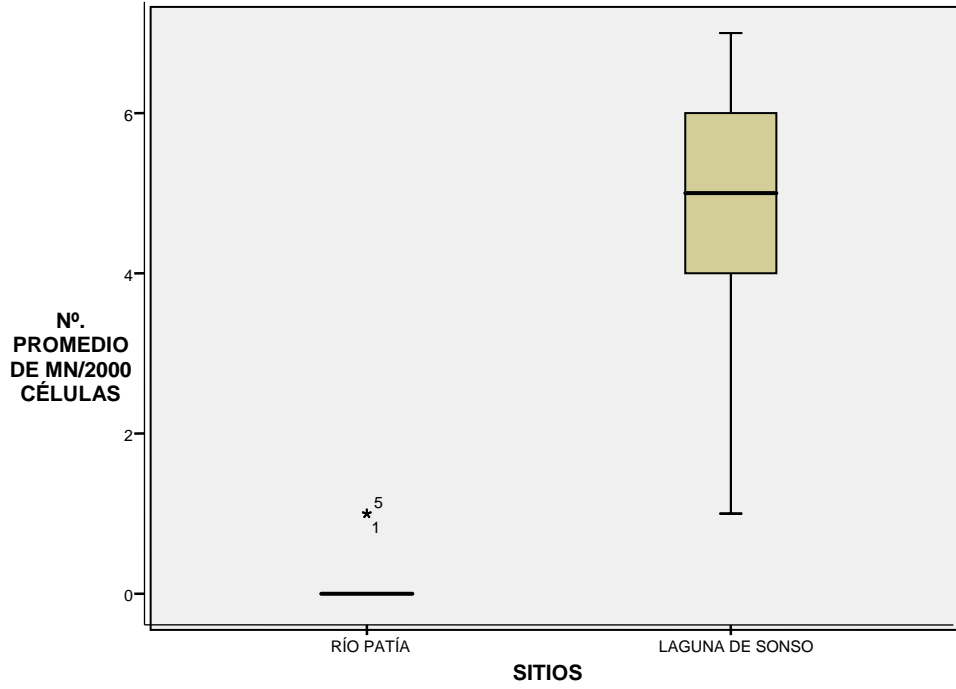
Cuadro 15. Registro de frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de branquia por individuo.

LAGUNA DE SONSO			RIO PATIA		
EPOCA	INDIVIDUO	Mn/2000 células	EPOCA	INDIVIDUO	Mn/2000 células
SECA	1	6	SECA	1	1
	2	4		2	0
	3	5		3	0
	4	6		4	0
	5	5		5	1
	6	6		6	0
	7	3		TOTAL	2
	8	5			
	9	6			
	10	5			
	11	1			
	12	4			
	13	3			
	TOTAL	59			
HÚMEDA	1	6	HÚMEDA	1	0
	2	4		2	0
	3	5		3	0
	4	5		4	0
	5	4		5	0
	6	4		6	0
	7	6		7	0
	8	5		TOTAL	0
	9	7			
	10	5			
		TOTAL		56	

Cuadro 16. Registro de promedio de MN/2000 Células, desviación típica estándar y numero de muestra.

Nº PROMEDIO DE MN/2000 CELULAS			
X± DESVIACION ESTANDAR (n DE MUESTRA)			
	SITIO		
EPOCA	LAGUNA DE SONSO	RÍO PATIA	TOTAL
SECA	4,54 ± 1,506 (13)	0,33 ± 5,16 (6)	3,21 ± 2,371 (19)
HUMEDA	5,10 ± 0,994 (10)	0,00 ± 0,00 (7)	3,00 ± 2,693 (17)
TOTAL	4,78± 1,313 (23)	0,15 ± 0,376 (13)	3,11 ± 2,493 (36)

Gráfica 10. Número promedio de micronúcleos/2000 células vs. Sitios



Gráfica 11. Número promedio de micronúcleos/2000 células vs. Época

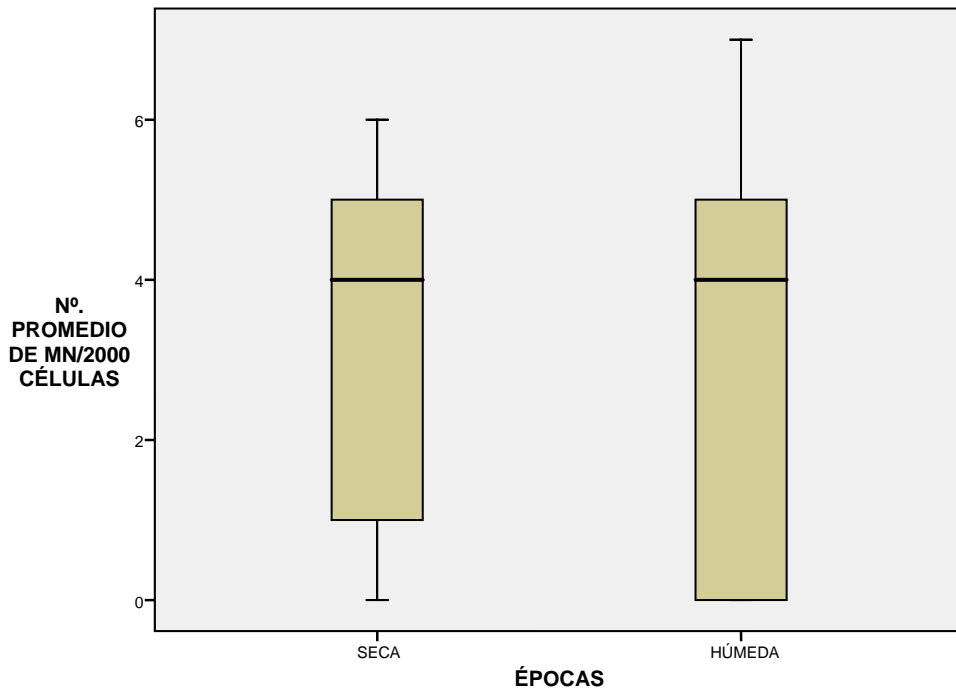




Figura 41. Eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de la Laguna de Sonso.100x

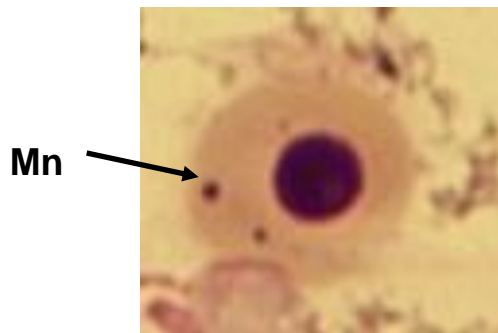


Figura 42. Micronúcleos observados en eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de la Laguna de Sonso.100x.

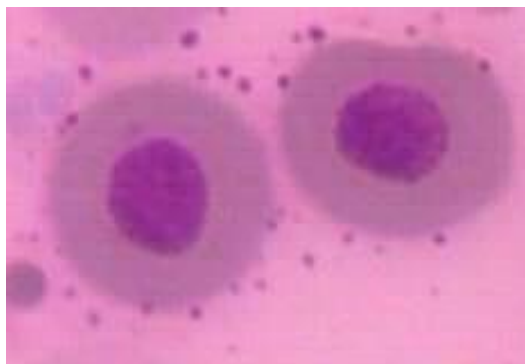


Figura 43. Eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de Río Patía.100x

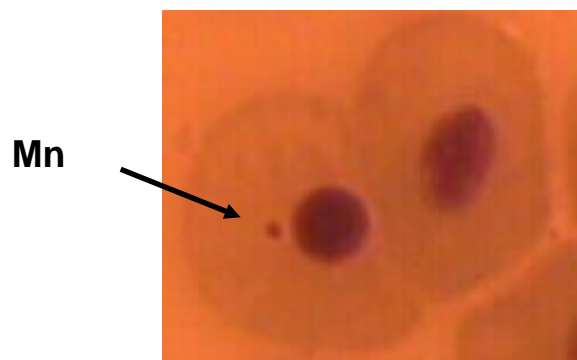


Figura 44. Micronúcleo observado en eritrocitos de Branquia de *Oreochromis niloticus* colectadas de Río Patía.100x.

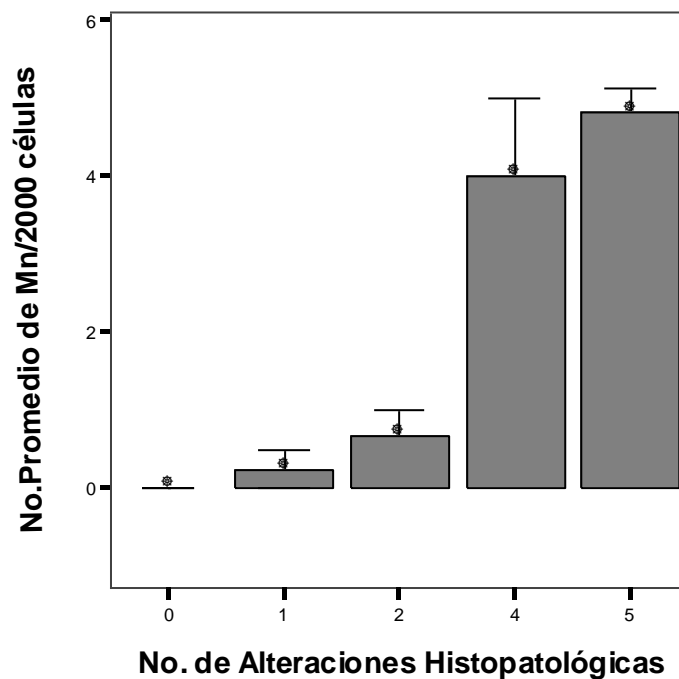
7.7. Resultados comparativos entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico

Cuadro 17. Comparación entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico.

N° DE ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS	N° PROMEDIO DE MN/ 2000 CELULAS				ESTADISTICOS DE CONTRASTE (Sig. asintótica) a
	N° DE INDIVIDUOS	MEDIA	DESVIACION TIPICA	ERROR ESTANDAR	
0	6	0.00	0.0	0.0	0.000
1	4	0.25	0.5	0.250	
2	3	0.67	0.577	0.333	
4	2	4.0	1.414	1.0	
5	21	4.81	1.470	0.321	
TOTAL	36	3.11	2.493	0.416	

a. Prueba de Kruskal Wallis.

Gráfica 12. Comparación entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico



7.8. Resultados químicos

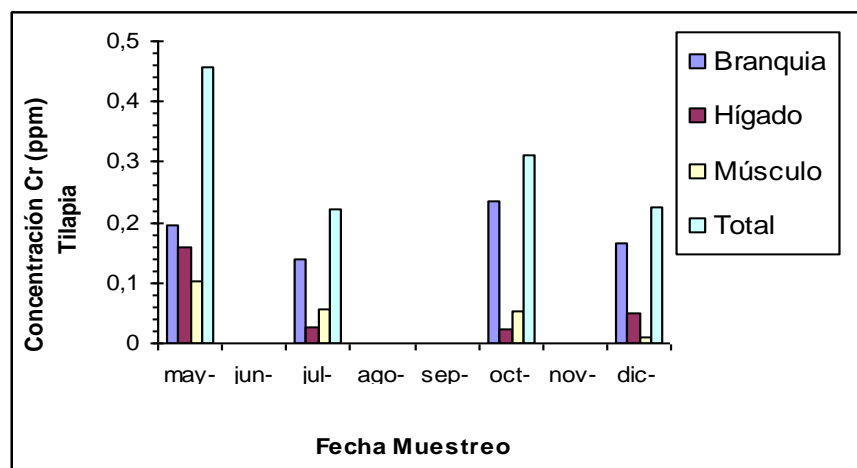
Se realizaron análisis químicos para evaluar la cantidad de metales (Cromo, Mercurio y Plomo) presentes tanto en el agua como en el Hepatopáncreas y la branquia de cada organismo muestreado en los dos lugares de interés en este proyecto. En las siguientes Cuadros se presenta un informe mas detallado sobre la cuantificación de los metales, la época o fecha y el lugar de muestreo.

Cuadro 18. Concentraciones totales de Cromo, Plomo y Mercurio en tejidos (mg/Kg peso) y en el agua

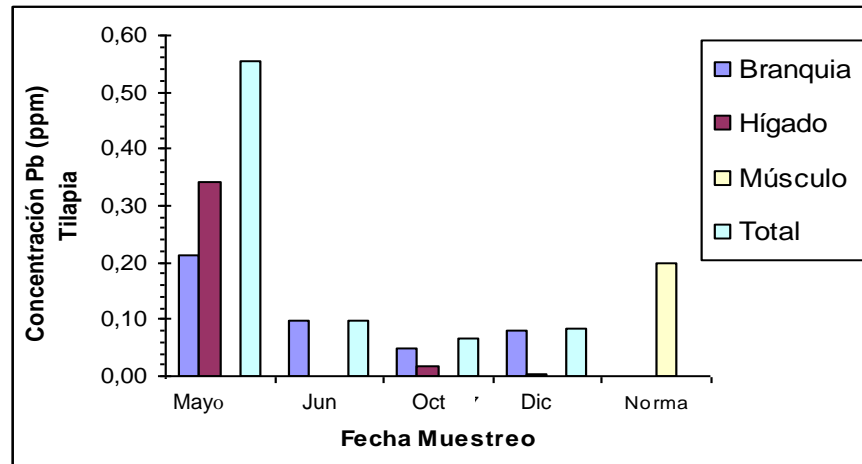
TILAPIA	Cromo		Plomo		Mercurio	
	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
Branquia	0,0543 ± 0,0001	0,027 ± 0,002	0,045 ± 0,003	0,029 ± 0,003	0,009 ± 0,001	Nd
Hepatopáncreas	0,018 ± 0,005	0,759 ± 0,081	0,037 ± 0,005	0,066 ± 0,004	0,036 ± 0,003	0,030 ± 0,003
Agua	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

* Todos los valores están expresados como el promedio de tres determinaciones (n=3) ± la desviación estándar. Nd = No detectable. Fuente: Angélica Varón.

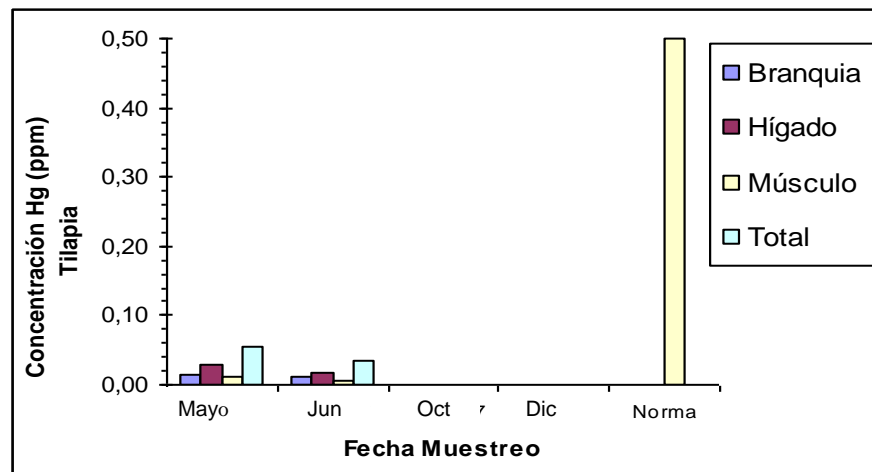
Gráfica 13. Variación temporal de la concentración de cromo en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón.



Gráfica 14. Variación temporal de la concentración de plomo en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón.



Gráfica 15. Variación temporal de la concentración de mercurio en tejidos individuales y total de Tilapia de la laguna de Sonso. Fuente: Angélica Varón.



Cuadro 19. Norma para los niveles máximos permitidos de mercurio, y plomo en peces y moluscos.

Metal	Peces	Moluscos	Fuente
Hg (mg/kg peso fresco)	0,5 no predadores* 1,0 predadores *	0,5**	Comisión Europea * Legislación Española **
Pb (mg/kg peso fresco)	0,2 – 0,4	1,5	FAO/OMS, 2000

8. ANALISIS ESTADÍSTICO

8.1. Análisis estadístico del biomarcador histopatológico

El test exacto de Fisher permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña como en el presente estudio y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test λ^2 sea adecuada. Estas condiciones exigen que los valores esperados de al menos el 80% de las celdas en un Cuadro de contingencia sean mayores de 5 (en el presente trabajo se cumple esta condición). Así, en un Cuadro 2x2 será necesario que todas las celdas verifiquen esta condición, si bien en la práctica suele permitirse que una de ellas muestre frecuencias esperadas ligeramente por debajo de este valor (Díaza y Salvador; 2004).

En otras ocasiones, una misma característica se mide en más de una ocasión para cada uno de los individuos que se incluyen en una investigación. En este caso, el interés se centra en comparar si las mediciones efectuadas con dos métodos diferentes (Análisis de Imágenes y Observación) para ver si son iguales o si, por el contrario, se produce algún cambio significativo (Díaza y Salvador; 2004).

El test de McNemar es aplicable a datos pareados como estos, existen claramente cuatro tipos de pares de observaciones, según cada individuo presente o no la característica de interés con los dos métodos con que se efectúa la evaluación. Así, los resultados obtenidos pueden mostrarse igualmente en un cuadro 2 x 2, con la salvedad de que aquí los datos son dependientes y por lo tanto no resultará adecuada la utilización del test λ^2 .

El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis de su validez puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad (Fernández y Pértigas; 2003)

8.1.1. Datos estadísticos del análisis morfológico de branquia de tilapia.

Cuadro 20. Datos estadísticos de Presencia-Ausencia de alteraciones vs. Sitios de muestreo en branquia de Tilapia

BRANQUIA (n=36)			RIO PATIA	LAGUNA DE SONSO	ESTADISTICO EXACTO DE FISHER
AA	SIN	Recuento	9	0	0,000
		Frecuencia esperada	3,3	5,8	
		% Sitio	69,2	0,0	
	CON	Recuento	4	23	
		Frecuencia esperada	9,8	17,3	
		% Sitio	30,8	100	
AC	SIN	Recuento	10	1	0,000
		Frecuencia esperada	4,0	7,0	
		% Sitio	76,9	4,3	
	CON	Recuento	3	22	
		Frecuencia esperada	9,0	16,0	
		% Sitio	23,1	95,7	
AD	SIN	Recuento	12	1	0,000
		Frecuencia esperada	4,7	8,3	
		% Sitio	92,3	4,3	
	CON	Recuento	1	22	
		Frecuencia esperada	8,3	14,7	
		% Sitio	7,7	95,7	
AT	SIN	Recuento	11	0	0,000
		Frecuencia esperada	4,0	7,0	
		% Sitio	84,6	0,0	
	CON	Recuento	2	23	
		Frecuencia esperada	9,0	16,0	
		% Sitio	15,4	100	
ADDD	SIN	Recuento	10	3	0,000
		Frecuencia esperada	4,7	8,3	
		% Sitio	76,9	13,0	
	CON	Recuento	3	20	
		Frecuencia esperada	8,3	14,7	
		% Sitio	23,1	87,0	

Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

Para el Río Patía la frecuencia esperada SIN Alteraciones es menor que la observada, al igual que para la Laguna de Sonso CON Alteración. En los otros dos casos: Río Patía – CON y Laguna – SIN es lo contrario; la frecuencia esperada es mayor que la observada. Estos resultados indican que hay una posible asociación entre el Sitio y la Presencia de las Alteraciones, es decir, en la Laguna de Sonso hay más alteraciones observadas que las esperadas y en el Río Patía menos de las mismas.

Para ver si la asociación entre el sitio de estudio y la presencia o no de alteraciones adaptativas es significativa, tenemos en cuenta el estadístico exacto de Fisher (analiza si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña), que para este caso es altamente significativo por ser menor de 0,005 ($p \leq 0,005$). Teniendo en cuenta que en la Laguna de Sonso hay mayor presencia de Alteraciones Citoplasmáticas que en el Río Patía y viceversa.

En la Laguna de Sonso las alteraciones más representativas fueron adaptativas y tisulares y en el Río Patía las adaptativas. Aunque todas las alteraciones tuvieron el mismo comportamiento estadístico para cada uno de los sitios, no indica que la una conlleva a la otra, pues, en procesos degenerativos y necróticos, cada una de ellas representan una etapa diferente, pero si se puede observar en algunos casos que los estados avanzados de necrosis se observan estadíos anteriores a la misma.

Podemos decir que el sitio posiblemente si influye con la presencia de cada una de las alteraciones (laguna de Sonso) y con la ausencia de las mismas (Río Patía).

Cuadro 21. Datos estadísticos de Presencia- Ausencia de Alteraciones vs. Épocas de muestreo en branquia de tilapia

BRANQUIA (n=36)			SECA	HÚMEDA	ESTADISTICO EXACTO DE FISHER
AA	SIN	Recuento	3	6	0,168
		Frecuencia esperada	4,8	4,3	
		% Sitio	15,8	35,3	
	CON	Recuento	16	11	
		Frecuencia esperada	14,3	12,8	
		% Sitio	84,2	64,7	
AC	SIN	Recuento	5	11	0,412
		Frecuencia esperada	5,8	11,8	
		% Sitio	26,3	64,7	
	CON	Recuento	14	17	
		Frecuencia esperada	13,2	17,0	
		% Sitio	73,7	100	
AD	SIN	Recuento	7	6	0,599
		Frecuencia esperada	6,9	6,1	
		% Sitio	36,0	35,3	
	CON	Recuento	12	11	
		Frecuencia esperada	12,1	10,9	
		% Sitio	63,2	64,7	
AT	SIN	Recuento	6	5	0,588
		Frecuencia esperada	5,8	5,2	
		% Sitio	31,6	29,4	
	CON	Recuento	13	12	
		Frecuencia esperada	13,2	11,8	
		% Sitio	68,4	70,6	
ADDD	SIN	Recuento	7	6	0,599
		Frecuencia esperada	6,9	6,1	
		% Sitio	36,8	35,3	
	CON	Recuento	12	11	
		Frecuencia esperada	12,1	10,9	
		% Sitio	63,2	64,7	

Alteraciones Adaptativas (**AA**), Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**), Distancia de Difusión Efectiva (**ADDE**).

La frecuencia de presencia de alteraciones esperada para la época seca es menor que la observada, mientras que su ausencia en la misma época es mayor que la observada; lo que nos indica que la época seca posiblemente influye en la presencia de alteraciones en los peces muestreados. Por otro lado, en época húmeda la frecuencia esperada es menor que la observada (en cuanto a la ausencia de alteraciones en peces muestreados), corroborándose con los datos de presencia de alteraciones, donde la frecuencia esperada es mayor que la observada, es decir, hay menos peces “enfermos” en la época húmeda.

Lo anterior se entiende fácilmente al tener en cuenta que el mayor porcentaje (cuadro 21) lo tiene la época seca con presencia de alteraciones. Pero, aún así, la asociación entre la época y la presencia-ausencia de los diferentes tipos de alteraciones no es significativa por ser mayor a 0,005; teniendo en cuenta el estadístico exacto de Fisher.

Las alteraciones con mayor presencia son las adaptativas y citoplasmáticas en época seca y en época húmeda las tisulares, pero esto no indica que la asociación entre estas dos variables sea significativa (Estadístico exacto de Fisher).

8.1.2. Datos estadísticos del análisis morfológico de hepatopáncreas de tilapia.

Cuadro 22. Datos estadísticos de Presencia- Ausencia de Alteraciones vs. Sitios de muestreo en hepatopáncreas de Tilapia

HEPATOPÁNCREAS (n= 36)			RIO PATIA	LAGUNA DE SONSO	ESTADISTICO EXACTO DE FISHER
AC	SIN	Recuento	5	1	0,016
		Frecuencia esperada	2,2	3,8	
		% Sitio	38,5	4,3	
	CON	Recuento	8	22	
		Frecuencia esperada	10,8	19,2	
		% Sitio	61,5	95,7	
AD	SIN	Recuento	6	0	0,001
		Frecuencia esperada	2,2	3,8	
		% Sitio	46,2	0,0	
	CON	Recuento	7	23	
		Frecuencia esperada	10,8	19,2	
		% Sitio	53,8	100	
AT	SIN	Recuento	13	9	0,000
		Frecuencia esperada	7,9	14,1	
		% Sitio	100	39,1	
	CON	Recuento	0	14	
		Frecuencia esperada	5,1	8,9	
		% Sitio	0,0	60,9	

Alteraciones Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**).

Las alteraciones presentes con mayor frecuencia en la Laguna de Sonso las degenerativas y en el Río Patía las citoplasmáticas; mientras que las de menor presencia en los dos sitios fueron las tisulares.

La relación existente entre los sitios y la Presencia – Ausencia de la alteración citoplasmática no es significativa debido al alto grado de estas alteraciones encontradas en el Río Patía; mientras que, para las degenerativas y tisulares se puede afirmar que hay una posible incidencia del sitio (estadísticamente significativo) con la presencia y cantidad de dichas alteraciones.

Cuadro 23. Datos estadísticos de Presencia-Ausencia de alteraciones vs. época de muestreo en hepatopáncreas de tilapia

HEPATOPÁNCREAS (n= 36)			SECA	HÚMEDA	ESTADISTICO EXACTO DE FISHER
AC	SIN	Recuento	1	5	0,038
		Frecuencia esperada	3,2	2,8	
		% Sitio	5,3	29,4	
	CON	Recuento	18	12	
		Frecuencia esperada	15,8	14,2	
		% Sitio	94,7	70,6	
AD	SIN	Recuento	4	2	0,386
		Frecuencia esperada	3,2	2,8	
		% Sitio	21,1	11,8	
	CON	Recuento	15	15	
		Frecuencia esperada	15,8	14,2	
		% Sitio	78,9	88,2	
AT	SIN	Recuento	9	13	0,073
		Frecuencia esperada	11,6	10,4	
		% Sitio	47,4	76,5	
	CON	Recuento	10	4	
		Frecuencia esperada	7,4	6,6	
		% Sitio	52,6	23,5	

Alteraciones Citoplasmáticas (**AC**), Degenerativas (**AD**), Tisulares (**AT**).

Los resultados para los anteriores casos fueron similares y se puede hacer un análisis general. Para las dos épocas (Seca y Húmeda) la presencia de alteraciones fue mayor. Además, la época seca también tuvo un porcentaje de asociación más alto que para la época Húmeda, excepto para las alteraciones Degenerativas, en donde la época húmeda tuvo un mayor valor, pero con mínima diferencia.

El valor de la prueba de Fisher reveló que aunque los porcentajes de alteración fueron altos para la época Seca, no hay asociación estadísticamente significativa entre la época y la alta presencia de alteraciones.

En época seca las alteraciones más frecuentes son las citoplasmáticas y en la húmeda las degenerativas; mientras que, las menos frecuentes son las tisulares para ambas épocas

Vale la pena aclarar que los altos porcentajes presentados para la época, tanto en branquia como en hepatopáncreas, no indican asociación estadísticamente significativa entre estas variables.

8.2. Comparación estadística del análisis morfológico de branquia de tilapia por medio de dos métodos de evaluación (análisis de imágenes y observación)

8.2.1. Test de McNemar. Teniendo en cuenta que la evaluación morfométrica de branquia se realizó por medio de dos métodos, el primero por Observación y el otro con el Analizador de Imágenes LEICA QWIN550IW, basados en las características morfológicas normales (cuadro 24) y se aplicó el Test McNemar para compararlos y ver la especificidad y sensibilidad de cada prueba (cuadro 25).

Cuadro 24. Características morfológicas normales

Característica morfométrica	Máximo	Mínimo	Promedio
Longitud de lamela (µm)	107,363	40,718	76,535
Ancho de lamela (µm)	9,476	5,383	7,264
Ancho de filamento (µm)	57,584	50,603	54,214
Número de lamelas	186	142	162

El cuadro 25 muestra el resultado de la prueba diagnóstica para ambas patologías y la especificidad y sensibilidad de la prueba.

Cuadro 25. Prueba diagnóstica de la aplicación

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico (AA)		Sensibilidad = 0,916
	Patológico	Sano	
Positivo	22	0	Especificidad = 1,000
Negativo	2	9	
Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico (ADDE)		Sensibilidad = 0,950
	Patológico	Sano	
Positivo	19	4	Especificidad = 0,692
Negativo	1	9	

Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica de las AA son sobresalientes comparados con los de la prueba diagnóstica de la ADDE, esto se debe a que en el aumento utilizado de 10x es más fácil detectar patologías asociadas con aumento celular del epitelio en los filamentos tanto para la visión subjetiva del especialista como para la visión artificial objetiva de la aplicación software, mientras que para detectar la ADDE es más difícil para el especialista manejar un aumento de 10x, debido a que es necesario utilizar aumentos de 40x y en algunas ocasiones de 100x para establecer un diagnóstico acertado relacionado con la alteración de la DDE. Debido a estas diferencias para medir la presencia de la ADDE, se puede notar la aparición de cuatro falsos positivos en la prueba, lo que determina la disminución del valor de especificidad para esta.

Cuadro 26. Estadísticos de Contraste entre los dos métodos de evaluación.

	ALTERACIONES ADAPTATIVAS (SISTEMA) Y ALTERACIONES ADAPTATIVAS (OBSERVADOR)	ALTERACIONES DDE (SISTEMA) Y ALTERACIONES DDE (OBSERVADOR)
N	33	33
Sig exacta	0,500 ^a	0,375 ^a

- a. Distribución binomial usada
- b. Prueba McNemar

Teniendo en cuenta que la Hipótesis nula ó Ho (Los métodos coinciden) se rechaza para valores mayores a 0,5 ($p \leq 0,5$); asumimos que por ser en este estudio menores a este valor, se dice que los dos métodos coinciden en la obtención de resultados tanto negativos como positivos, coincidiendo aún más en la evaluación de Alteraciones en la Distancia de Difusión Efectiva (ADDE).

8.3. Análisis estadístico del biomarcador genotóxico (micronúcleos)

En el cuadro 15. se registraron los datos de frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos por pez, posteriormente fueron ingresados al programa Excel de la forma correspondiente y se transfirieron al paquete estadístico SPSS (Statistical Package for to Social Scientific) con un nivel de significancia máximo de 0.05, para el análisis estadístico y referencial se aplico pruebas de normalidad (Shapiro-wilk $p < 0,05$) y homogeneidad de varianza (Levene $p > 0,05$), como los datos no se ajustaron a la distribución normal ni a la homogeneidad de varianza y por ser las muestras muy pequeñas, se realizó un análisis principalmente mediante pruebas no paramétricas como la de U Mann Whitney.

El número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos con su respectiva desviación estándar y el tamaño de la muestra (N° 36) correspondiente a la época (seca y humedad) y sitio de muestreo (Laguna de Sonso y Río Patía) se presenta en la cuadro 16. y desde la gráfica 41 hasta 44.

En el sitio de la Laguna de Sonso el número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos fue significativamente mayor de 4.78 Mn que el registrado en el Río Patía 0,15 Mn. Este incremento fue independiente de la época (no hubo interacción: $p > 0.05$). Al comparar las dos épocas (seca MN 3.21 y Húmeda: Mn 3.00) no se identificó una diferencia significativa entre ellas para la inducción de micronúcleos.

Con base al análisis de estadísticas realizadas, se pudo concluir que posiblemente los contaminantes del agua como los metales de la Laguna de Sonso tienen un efecto genotóxico en *Oreochromis niloticus* debido a que se incrementa la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos en la branquia sin importar la época.

8.4. Análisis comparativo entre los biomarcadores histopatológico y genotóxico.

Los datos se codificaron en una base de datos fueron sometidos a una prueba de normalidad (Shapiro Wilk $p < 0,05$) y de homogeneidad de varianza (Levene $p < 0,05$) ya que los datos no se ajustaron a estos requisitos y por ser muestras muy pequeñas fueron analizados mediante una prueba no paramétrica como la de Kruskal Wallis, con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for to Social Scientific) con un nivel de significancia máximo de 0,05.

El número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos vs. Número de alteraciones con su respectivo tamaño de la muestra, media, desviación estándar y el error típico se registraron en la cuadro 17 y gráfica 12.

Al comparar el número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos con el número de alteraciones Histopatológicas presentes en la branquia de la tilapia *Oreochromis niloticus* se encontró una correlación estadísticamente significativa entre estos dos biomarcadores.

Los biomarcadores se complementan al establecer con sus resultados que hay mayor número de alteraciones tanto genotóxicas como histopatológicas en la Reserva de la Laguna de Sonso respecto los individuos colectados en el Río Patía.

8.5. Análisis de datos químicos en tejidos

De acuerdo con los resultados obtenidos en muestras biológicas y las gráficas, se puede observar una tendencia de acumulación para cada metal analizado en la Tilapia, se resume de mayor a menor concentración:

- CROMO: Branquia > Hepatopáncreas
- PLOMO: Branquia > Hepatopáncreas
- MERCURIO: Hepatopáncreas > Branquia

Estos resultados muestran de manera generalizada, una mayor tendencia de acumulación de los metales en la branquia de Tilapia que en el Hepatopáncreas.

Por otro lado, se observa que las concentraciones halladas de plomo y mercurio en los peces (cuadro 18), no superan los límites establecidos para esta especie por distintas organizaciones ambientales, mostrados en el cuadro 19.

9. DISCUSIÓN

La contaminación por mercurio en ecosistemas acuáticos ha recibido gran importancia desde el descubrimiento de la enfermedad MINAMATA en Japón (1950s) causado por el mismo (Raldúa *et al.*, 2007) y ahora con el crecimiento industrial y su alto uso en las mismas, ha desencadenado problemas de impacto ambiental como el observado en la Laguna de Sonso por la expulsión del mismo en forma orgánica (Arriberé *et al.*, 2003; Raldúa *et al.*, 2007). 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 (Spry, Wiener; 1991; Raldúa *et al.*, 2007) y posteriormente ser bioacumulado, desencadenando alteraciones tanto a nivel Genético como Histológico.

La presencia de metales tóxicos puede llevar a riesgos en la salud de vertebrados superiores y por ultimo en humanos después del consumo de peces y puede ser directamente adquirido solo por la ingestión (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

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 *et al.*, 2006). Generalmente la genotoxicidad es un asunto de gran interés porque existe un riesgo de exposición de vertebrados en relación a la cadena alimenticia y es de gran importancia en las dietas diarias de las poblaciones locales (Power, 1989) como la comunidad aledaña a la Reserva Natural de la Laguna de Sonso.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto confirman lo dicho por Hinton y Lauren en 1990, quienes expresaron que los biomarcadores indican cambios fisiológicos y modificaciones bioquímicas (entre otros) que repercuten en la formación de estructuras modificadas (Lesión) en las células, tejidos u órganos.

Sanchez *et al* 1997 y 1998 afirman por sus resultados que el epitelio branquial es muy vulnerable en ambientes contaminados por el contacto directo con el medio, pues, se encarga del intercambio gaseoso, excreción de amoniaco y regulación iónica. Estos autores, al igual que en la presente investigación, hallaron más concentración de metales en branquia que en hepatopáncreas y por ende, mayor frecuencia de alteraciones en este último.

En el 2006, estudios como el de Ferguson, Elahee, Cengiz, Raldúa y Evans en 1978, afirman que las lesiones hepáticas y sobretodo branquiales son indicadores de exposición a contaminantes. Esta aseerción, sirve de soporte en la actual investigación para establecer que las lesiones encontradas a nivel histológico en la Tilapia, son causadas posiblemente por la presencia de metales (Hg, Pb, Cr) en la Laguna de Sonso. Además, la descripción histológica normal tanto de branquia como de hepatopáncreas descrita por ellos, coincide con la observada en este estudio.

Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en la Branquia respecto a la época, en la mayoría de los casos el porcentaje es mayor en la época Seca y Húmeda CON Alteración, siendo mayor aún para la época SECA. Lo que nos indica que las Alteraciones Adaptativas y Citoplasmáticas están posiblemente más asociadas con la época Seca, aunque esta asociación no es significativa.

Aunque todas las alteraciones tuvieron el mismo comportamiento estadístico en Branquia para cada uno de los sitios, no indica que la una conlleva a la otra, pues, en procesos degenerativos y necróticos, cada una de ellas representa una etapa diferente. Pero, sí se puede observar en algunos casos estadíos anteriores a la necrosis. El sitio si influye en la presencia de las alteraciones (laguna de Sonso) y con la ausencia de las mismas (Río Patía).

Verján *et al* 2001 probaron que la cachama blanca clínicamente sana de cultivos comerciales presenta un alto índice de lesiones en el sistema respiratorio directamente relacionada con una baja calidad del agua, por lo que corrobora o explica que en la presente investigación se encontraran alteraciones en branquia y hepatopáncreas de los peces colectados en el Río Patía, a pesar de ser del grupo Control.

Hasta el momento se han realizado estudios morfométricos que usan como herramienta principal la microscopía en la branquia de peces (Lewis *et al.*, 1975; Sánchez *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1998) y en otros órganos como el Folículo ovárico de los Búfalos (Mondadori *et al.*, 2007); pero sin la utilización de análisis de imágenes. Mientras que, en el presente estudio se tuvo en cuenta, ayudando al observador a dar un diagnóstico mas acertado, constituyéndose en un estudio pionero en la aplicación del análisis de imágenes en estudios morfométricos.

Los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas son el instrumento adecuado para obtener determinada información. No obstante, no se debe olvidar que existen determinados aspectos en el diseño de este tipo de investigaciones que

pueden afectar la precisión y la validez de las estimaciones realizadas. La población de estudio, la estrategia de muestreo, la selección del criterio de referencia y la forma de aplicación de las pruebas diagnósticas serán algunos de los elementos a evaluar para evitar la presencia de sesgos (Fernandez, 2003; Castrillón, 2006).

La prueba de micronúcleos confirma que esta especie de pez puede ser usada en biomonitoreos genéticos para detectar el estado de la calidad de agua para el área de la Laguna de Sonso.

En este estudio el número promedio de micronúcleos (Nº de Mn/2000 eritrocitos) fue estadísticamente significativo en los peces colectados en la Laguna de Sonso expuestos a metales (4.78 Mn) respecto al grupo control del Río Patía (0,15 Mn), de acuerdo con Kligerman (1982) quien afirma que las frecuencias de micronúcleos en peces tienen un incremento cuando habitan agua contaminada. Aunque entre las dos épocas (seca: Mn 3.21 y Húmeda: Mn 3.00) no se identificó una diferencia significativa,

La correlación entre las altas frecuencias de micronúcleos en peces del sitio contaminado (Laguna de Sonso) comparado con el sitio de control (Río Patía) es comparable a los resultados obtenidos por Porto *et al.* (2005), en los cuales ellos obtuvieron que las frecuencias medias de micronúcleos observadas en *Prochilodus nigricans* (detritivoro), *Mylossoma duriventris* (omnívoro) y *Hoplias malabaricus* (piscívoro) del sitio contaminado por mercurio debido a la alta actividad minera de oro (Río Madeira) fueron significativamente más altas (Prueba U: $P < 0,001$) que las frecuencias de las mismas especies del Río Solimoes o sitio no contaminado.

El análisis de frecuencias basales de micronúcleos interespecies (*Cyprinus Carpio* o *Oncorhynchus mykiss*) varían en un rango de 0-13, debido a la competencia metabólica, mecanismos de reparación del DNA y la expresión del micronúcleo en cada especie, (Landolt y Kocan, 1983; Al-Sabti, 1986; Nepomuceno *et al.*, 1997; Llorente *et al.*, 2002; Grisolia y Starling, 2001; Gustavino *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 1993; Castano *et al.*, 1998; Ayllon y Garcia-Vazquez, 2001). Sin embargo la gran mayoría de estas investigaciones reportan datos en un rango de 0 a 1, concordando con los resultados obtenidos en este estudio (Micronúcleos: 0,15).

Es de gran aporte para la comunidad científica como para la comunidad de la región esta investigación de un análisis biológico con una referencia de micronucleación para detectar genotoxicidad hace un gran aporte y los resultados

son de gran interés. Se han reportado pocas investigaciones en las cuales se empleara la prueba de micronúcleos en eritrocitos de branquia de peces *Oreochromis niloticus* a nivel nacional y ninguna en la Reserva Natural de la Laguna de Sonso.

Tal como lo afirman Rabitto en el 2005, Poonam y Farhat; 2004; las pruebas de genotoxicidad e histopatológicas en organismos acuáticos como los peces son importantes complementarlas con la medición y análisis de los parámetros químicos hídricos universales para poder entender de mejor forma la dinámica de los metales dentro del sistema acuático que se está estudiando. No se puede asegurar que en este caso la disminución de la calidad del agua incida en la genotoxicidad de la fauna íctica directamente, pero esta última puede ser indicativa del deterioro de la calidad del agua por la contaminación con metales.

Los biomarcadores usados en este proyecto (Genotóxico e Histopatológico) coincidieron en sus resultados significativamente, comprobando que es mas preciso un estudio cuando se usa mas de un biomarcador, como lo afirma Kakkar en el 2005 y Viarengo en 1996, los cuales resaltan la importancia de la aplicación de biomarcadores para monitorear ambientes contaminados, al igual que el uso de organismos centinelas como los peces.

En cuanto a los resultados químicos, muestran de manera generalizada que no superan los límites establecidos para esta especie por distintas organizaciones ambientales, pero se tiene información donde dice que, aún a bajas concentraciones los metales tienen la habilidad de ser tóxicos y perjudiciales (Satoh, 2000; Devlin, 2006; Hinton *et al.*, 1978; Hinton *et al.*, 1990; Alazemi, 1996; Pauer *et al.*, 1998; Topón, 2003; Mallat, 1985; Giari *et al.*, 2007; Braunbeck, 1998).

Hubo mayor tendencia de acumulación de los metales en la branquia de Tilapia que en el Hepatopáncreas. Por lo que podemos afirmar, que la branquia con toda su organización, sirve de barrera para que estos metales no pasen o lleguen al interior del organismo; pero los metales que logran distribuirse en él, afectan en gran medida la estructura del hepatopáncreas. Es necesario aclarar que este último se observó afectado en gran medida tanto en los peces control como los expuestos, corroborando lo dicho por Verján *et al* (2001).

Según Alazemi *et al* (1996), Topón *et al* (2003), Giari *et al* (2007), Braunbeck (1998), Mallatt (1985), Hinton (1990), Has- Schon *et al* (2006), la hiperplasia, fusión lamelar, edema, levantamiento epitelial, pérdida de compartimentalización

celular, vacuolización, necrosis, entre otras; son típicas lesiones en respuesta a organoclorinas, derivados del petróleo, organofosfatos, carbamatos, herbicidas y metales. Coincidiendo con lo mencionado anteriormente, cerca a laguna de Sonso hay cultivos de caña en donde se usan diferentes fertilizantes, herbicidas e insecticidas, haciéndose necesario e indispensable afirmar que la mayoría de los cambios histopatológicos no son en gran parte específicos a un determinado tóxico, debido a la confirmada ocurrencia de alteraciones similares bajo un rango amplio de exposición a sustancias nocivas en diferentes condiciones como el hábitat, forma química del metal, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, edad, género y masa corporal.

Aunque esta investigación no se enfocó en el proceso de acumulación de metales sino en las alteraciones dadas a causa de estos, es necesario decir que los peces acumulan mercurio, plomo y cromo directamente de su alimento y el agua que lo rodea bioconcentrándose en grandes cantidades tanto en su organismo como en las especies que los consumen; confirmando lo mencionado por Clarkson (1997), Raldúa *et al* (2007), Rainbow, (1985), Raldúa *et al* (2007).

Otro estudio en donde se tuvieron en cuenta los mismos metales (Pb, Hg, Cr) para evaluar su incidencia en ambientes naturales como la Laguna de Sonso fue el realizado por Gishler en el 2005, el cual utilizó para el análisis químico el músculo de la Tilapia, encontrando para el mercurio y cromo valores no detectables (ND) en ese año y el plomo si lo pudo cuantificar, mientras que, en esta investigación se tuvo en cuenta para la cuantificación de estos metales el hepatopáncreas y la branquia de la misma especie, encontrando valores detectables para todos ellos (metales), excepto para el mercurio en la branquia de peces muestreados en época húmeda. Es importante mencionar que el estudio realizado por Gishler es el más aproximado a este estudio, aunque no se evaluaron las épocas ni los mismos tejidos.

Dado que la dieta es la ruta principal de exposición a metales (Castro *et al.*, 2008), la Tilapia constituye un riesgo para la salud de las poblaciones aledañas a la Laguna de Sonso que la consumen, debido a que se incrementa la toxicidad por bioacumulación en niveles tróficos altos (Zhang, Wong; 2007).

10. ALCANCES

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

Con este tipo de trabajo se puede incentivar a la comunidad científica a desarrollar mas estudios relacionados con la histología y patología de peces; sirviendo de pauta para posteriores trabajos en los cuales se pueda aplicar el análisis de imágenes para el diagnostico de alteraciones branquiales causadas por contaminantes, complementando la observación tradicional.

Con los resultados de este trabajo se puede diseñar estrategias de prevención, control y reducción de las actividades que desencadenan la contaminación de metales no solo en esta área de estudio sino a nivel nacional y/o internacional.

Puede aplicarse este estudio en proyectos piscícolas, de control y saneamiento ambiental por parte de las entidades que controlan y vigilan el medio ambiente.

11. RECOMENDACIONES

Sería de gran importancia evaluar los efectos histopatológicos de los metales 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 consumidos por las poblaciones aledañas.

Para la validación de la prueba diagnóstica con análisis de imágenes en posteriores investigaciones es de gran importancia incrementar el número de individuos de forma significativa.

12. CONCLUSIONES

La especie *Oreochromis niloticus* por su capacidad de adaptación, se cataloga como un factor de riesgo para estas poblaciones aledañas a la Laguna de Sonso, debido a que los metales son de difícil eliminación y por ende muy fáciles de bioacumular.

Con el desarrollo de la microscopía (luz y electrónica) y sus técnicas, se realizaron observaciones de branquia y hepatopáncreas de Tilapia, logrando la valiosa descripción histológica (no incluida en los objetivos de la presente investigación) que complementa la documentación existente para la *Oreochromis niloticus*.

Aunque los metales (Cr, Pb, Hg) se hallaron en bajas concentraciones, hubo una alta y significativa prevalencia de las alteraciones histológicas en la Laguna de Sonso respecto al Río Patía. Teniendo en cuenta que en branquia las alteraciones más representativas fueron adaptativas y tisulares, mientras que para hepatopáncreas fueron las degenerativas y citoplasmáticas.

Aunque la asociación entre las variables época y presencia de alteraciones no fue significativa; en época seca las alteraciones más presenciadas en branquia y hepatopáncreas de Tilapia fueron las adaptativas y citoplasmáticas, mientras que, en época húmeda fueron las tisulares y degenerativas, respectivamente.

Se estableció que los dos métodos de evaluación (Observación y Análisis de imágenes) coinciden en la obtención de resultados tanto negativos como positivos, concordando aún más en la evaluación de Alteraciones en la Distancia de Difusión Efectiva (ADDE).

Con base en los valores morfométricos de los individuos normales, la aplicación desarrollada es capaz de otorgar un diagnóstico preliminar de apoyo al observador, pues tiene la ventaja de ser rápida, económica y objetiva al evaluar la presencia o ausencia de alteraciones adaptativas y en la distancia de difusión efectiva.

Esta investigación es un estudio pionero en cuanto a la comparación de dos métodos de diagnóstico (analizador de imágenes y observación) en branquia de Tilapia. Además, no se propuso como objetivo en este estudio.

In vivo se demostró que los metales son genotóxico para *Oreochromis niloticus* presente en la Laguna de Sonso.

El número promedio de micronúcleos en eritrocitos de branquia de pez es mayor en la laguna de Sonso (expuesto), que en Río Patía (control) sin importar la época de muestreo (seca - humedad).

Al comparar las dos épocas (seca: Mn 3.21 y Húmeda: Mn 3.00) no se observó una diferencia significativa entre ellas para la inducción de micronúcleos.

Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos con el número de alteraciones Histopatológicas presentes en la branquia de la tilapia *Oreochromis niloticus*.

Los biomarcadores se complementan al afirmar con sus resultados que hay mayor número de alteraciones tanto genotóxicas como histopatológicas en la Reserva de la Laguna de Sonso respecto con los individuos colectados en el Río Patía.

En cuanto a los resultados químicos, muestran de manera generalizada que no superan los límites establecidos para esta especie por distintas organizaciones ambientales; además, una mayor tendencia de acumulación de los metales en la branquia de Tilapia que en el Hepatopáncreas.

Debido a que el hepatopáncreas se observó afectado en gran medida tanto en los peces control como los expuestos; afirmamos, que la branquia con toda su organización, sirve de barrera para que estos metales no pasen o lleguen al interior del organismo; pero los metales que logran distribuirse en él, afectan en gran medida la estructura del hepatopáncreas.

Los niveles de acumulación de los metales (Cromo, Plomo, Mercurio) reportados en los tejidos de los peces colectados no exceden los niveles permisibles para la fauna acuática, aunque se encontraron alteraciones tanto histopatológicas como genotóxicas.

BIBLIOGRAFÍA

ALAZEMI, B.M., LEWIS, J.W. y ANDREWS, E.B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. En: Environ. Technol. Vol: 17 (1996), 225–238.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic–mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. En: Comp. Biochem. Physiol. Vol: 85C (1986); p. 5–9.

AL-SABTI, K y HARDIG, J. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. En: comparative biochemistry and Physiology: Comparative Pharmacology. Vol: 97(C) (1990); p. 179-182.

AL-SABTI, K. Micronuclei induction in pike (*Exos lucius*) in Swedish Lakes contaminated with radiocesium. En: Cytobios. Vol. 70 (1992); p. 101-106.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. En: Mutation Research. Vol: 320 (1994); p.157-163.

AL-SABTI K y METCALFE C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. En: Mutat Res. Vol: 343 (1995); p. 121–35.

ANJOS, A., RANDI, M.A.F. y OLIVEIRA, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. En: Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol: 60 (2005); p.147–156.

ARKHIPCHUK, V.V., MALINOVSKAYA, M.V. y GARANKO, N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. En: Environ. Toxicol. Vol: 15 (2000); p. 338–344.

ARKHIPCHUK, V.V. y GARANKO, N.N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. En: Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol: 62 (2005); p. 42–52.

ARRIBERÉ, M.A., RIBEIRO, G.S., SANCHEZ, R.S., GIL, M.I., ROMÁN, R.G., DAURADE, L.E., FAJÓN, V., HORVAT, M., ALCALDE, R. y KESTELMAN, A.J.

Heavy metals in the vicinity of a chlor-alkali factory in the upper Negro River ecosystem, Northern Patagonia, Argentina. En: *Sci. Total. Environ.* Vol: 301 (2003); p.187- 203.

AYAS, Z., EKMEKCI, G., OZMEN, M. y YERLI, S. V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol: 3 (2007); p. 242-249.

AXELROD, H., BURGUESS W., EMMENS C., PRONEK N., WALLS J. y HUNZIKER, R. *Mini Atlas de peces de acuario.* T.F.H. Publications. Editorial Hispano Europea S.A. Barcelona, España. (1992); p. 700.

BAHARI, B. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. En: *Mutat. Res.* Vol: 313 (1994); p. 1–5.

BELFIORE, N.M. y ANDERSON, S.L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. En: *Mutat Res.* Vol: 489 (2001); p. 97–122.

BERNET, C.; SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P. y WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. En: *Journal of fish diseases.* Vol: 22 (1999); p. 25- 34.

BOGDEN, J.D., GERTNER, S.B., CHRISTAKOS, S., KEMP, F.W., YANG, Z., KATZ, S.R. y CHU, C. Dietary calcium modified concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. En: *J. Nutr.* Vol: 122 (1992); p. 1351–1360.

BOLIS, C.L., PICCOLELLA, M., DALLA VALLE, A. y RANKIN, J.C. Fish as model in pharmacological and biological research. En: *Pharmacol. Res.* Vol: 4 (2001); p. 265–280.

BRAUNBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination. En: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology.* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. (1998); pp. 61–140.

CAJARAVILLE, M., BEBIANNO, M., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C. y VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. En: *The Science of the Total Environment.* Vol: 247 (2000); p. 295-311.

CANTERA, J.R. y BLANCO J.F. The estuary ecosystem of Buenaventura Bay, Colombia. In Seeliger, U., Kjerfve, B. (Eds.) *Coastal Marine Ecosystems of Latin America.* En: *Ecological Studies.* Vol: 144. Springer-Verlag, New York. (2001); pp.265 – 280.

CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L. y MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. En: Aquat. Sci.* Vol: 47 (1990); p. 2123–2136.

CASTRILLÓN-FERNÁNDEZ, M.J. Estandarización de la técnica de procesamiento digital de imágenes en el análisis de biopsias renales. Popayán, Colombia. 2006. Tesis (Ingeniería Física). Universidad del Cauca.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M.. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *En: Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol: 26 (2008); p. 263–271.

CAVAS, T. y ERGENE-GOZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *En: Mutat. Res.* Vol: 538 (2003); p. 81–91.

CAVAS, T y ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *En: Aquatic Toxicology.* Vol: 74 (2005); p. 264–271

CENGİZ, E.I., Gill and kidney histopathology in the fresh water fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *En: Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol: 22 (2006); p. 200- 204.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. *En: Crit. Ref. Clin. Lab. Sci.* Vol: 34 (1997); p. 369- 440.

DAS, R.K. y NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *En: Mutat. Res.* Vol: 175 (1986); p. 67–71.

DE FLORA, S., BAGNASCO, M. y ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *En: Mutat. Res.* Vol: 258 (1991); p. 285–320.

DE FLORA, S., VIGANO, L., D'AGOSTINI, F., CAMOIRANO, A., BAGNASCO, M., BENNICELLI, C., MELODIA, F. y ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *En: Mutat. Res.* Vol: 319 (1993); p. 167–177.

DEGUCHI, Y., TOYOIZUMI, T., MASUDA, S., YASUHARA, A., MOHRI, S. y YAMADA, M. *et al.* Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites

bymicronucleus test and comet assay using goldfish. En: *Mutat Res.* Vol: 627(2007); p. 178–85.

DÍAZA, S. y FERNÁNDEZ, S. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de Mcnemar. *Metodología de la Investigación.* Coruña (España). 2004.

EEC, 2001. Regolamento no. 466/2001 della Commissione dell' 8 marzo 2001 che definisce I tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentarie. *Gazzetta Ufficiale delle Comunita Europee*, L77.

ELAHEE, K.B. y BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol: 68 (2007); p. 361-371.

Environmental Protection Agency. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. *Method EPA 3052.*

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

ERGENE, S., CAVAS, T., CELIK, A., KOLELI, N., KAYA, F., KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. En: *Ecotoxicology*; Vol: 16 (2007a); p. 385–391.

ERGENE, S., CAVAS, T., CELIK, A., KOLELI, N. y AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. En: *Environ Mol Mutagen.* Vol: 48 (2007b); p. 421–429.

ESCOBAR J.C. Estudio Hidrobiológico de la laguna de Sonso. Universidad del Valle – CVC, Convenio 012, Cali-Colombia. 1998.

ESCOVAR, G. y VASSEUR, O. Métodos histológicos aplicables al estudio de las células y los tejidos. Fondo Editorial Cooperativo de la Universidad de Antioquia. Medellín, (1996); p. 17- 55.

ESPER, R. y MACHADO, R. La investigación en medicina (Bases teóricas y prácticas Elementos de Bioestadística). La Prensa Médica Argentina. Primera edición. Buenos Aires. 2008.

EVANS, D. The fish gill: site of action and model for effects of environmental pollutants. En: *Environmental Health Perspectives.* Vol. 71 (1987); p. 47- 38.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. En: Mutat. Res. Vol: 455 (2000); p. 81–95.

FENECH, M., CHANG, W.P., KIRSCH-VOLDERS, M., HOLLAND, N., BONASSI, S. y ZEIGER, E. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated lymphocyte cultures. En: Mutat. Res. Vol: 534 (2003); p. 65–75.

FERNÁNDEZ, P. y DIAZ, P. Pruebas diagnósticas. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España). Cad Aten Primaria; Vol: 10 (2003); p. 120-124.

FERGUSON, H. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. Scotian Press. Second Edition. London. (2006); p. 25-58, 201-215.

GENESER, F. Histología. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Buenos Aires, Argentina. (2002); p. 518-531.

GIARI, L., MANERA, M., SIMONI, E. y DEZFULI, B.S. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. En: Chemosphere. Vol: 67 (2007); p. 1171–1181.

GIARI, L., SIMONI, E., MANERA, M. y DEZFULI, B.S. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposures. En: Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol: 70 (2008); p. 400–410.

GISCHLER, C. Pathways of heavy metals and implications for stakeholders, Sonso Lagoon, Colombia. En: Architecture and the Build Environment. 2005.

GONZALES, R. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Editorial Aguilar. Madrid, España, (1968); pp. 3- 43, 99-118.

GRISOLIA C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. En: Mutation Research. Vol: 518 (2002); p. 145–150

GRISOLIA, C.K. y CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. En: Genet. Mol. Biol. Vol: 23.1 (2000); p. 235–239.

GRISOLIA, C.K y PAHARES, D. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia, following mitomycin C treatment. En Mutation Research. Vol: 3 (3) (2002); p. 281-284.

GRISOLIA, C.K. y STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranao, under influence of sewage treatment plant discharges. En: *Mutat. Res.* Vol: 491 (2001); p. 39–49.

Guía de Protección Ambiental: Material auxiliary para la identificación y evaluación de impactos ambientales. Eschborn. 1996.

GUTIERREZ, J.C., GONZÁLEZ, A., DÍAZ, S. y ORTEGA, R. Silliates as a potential source cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. Universidad Complutense. España. (2003); p. 39, 461-467.

GWALTENEY-BRANT, S.M. Heavy metals. En: Haschek, W.M., Rosseaux, C.G., Wallig, A.M. (Eds.), *Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press, New York. (2002); p. 701–732.

HAAPALA, H. The use of SEM/EDX for studying the distribution of air pollutants in the surrounding of the emission source. En: *Environmental Pollution*. Vol: 9 (1998); p. 361–363.

HAM, D. *Histología de Ham*. Novena Edición. Editorial Mexicana. México. (1988); p. 638- 659.

HAS-SCHÖN, E., BOGUT, I. y STRELEC, I. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol: 50 (2006); p. 545–551.

HAYASHI, M., UEDA, T., UYENO, K., WADA, K., KINAE, N., SAOTOME, K., TANAKA, N., TAKAI, A., SASAKI, Y.F., ASANO, N., SOFUNI, T. y OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. En: *Mutat. Res.* Vol: 399 (2) (1998); p. 125–133.

HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P.H. y MACGREGOR, J.T. Micronucleus test as an index of cytogenetic damage: present, past and future. En: *Environ. Mol. Mutagen.* Vol: 18 (1991); p. 277–291.

HINTON, D.E., KLAUNIG, J.E. y LIPSKY, M.M. PCB-induced alterations in teleost liver: a model for environmental disease in fish. En: *Mar. Fish. Rev.* Vol: 40 (1978); p. 47–50.

HINTON, D.E. y LAUREN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. En: McCarty, J.F., Shigart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton. (1990); p. 15–57.

HOOFTMAN, R.N. y DE RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethylmethanesulphonate. En: *Mutat. Res.* Vol: 104 (1982); p. 147–152.

HOLDRIDGE, L. E. Ecología basada en las zonas de vida. Editorial IICA. San José de Costa Rica. 1979.

HOSE, J.E., CROSS, J., SMITH, S.G. y DICHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. En: *Mar. Environ. Res.* Vol: 22 (1987); p. 167–176.

HOSHINA, M., DE FRANCESCHI, D. y MARIN-MORALES, M. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. En: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* Vol: 656 (1-2) (2008); p. 44-48.

IGAC. Diccionario geográfico de Colombia. Subdirección de Investigación y Divulgación Geográfica, División de Difusión y Enseñanza Geográfica. (1980); pp: 1812 pp

International Organization for standardization. Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia. ISO 11466: 1995.

KAKKAR, P. y JAFFERY, F.N. Biological markers for metal toxicity. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol: 19 (2005); p. 335–349.

LEHMANN, P., VEGA, M. A., MUESES, H. Listado de las especies de peces para la cuenca alta y media del río Patía. En: *Colombia Novedades Colombianas.* 8(1) (2005); p: 27-39.

LEICA IMAGING SYSTEMS. Leica QWIN Reference Guide and Leica QUIPS Reference Guide. Cambridge, England. 1996.

LEMOS, C.T. 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. 1998.

LEMOS, C.T., ROEDEL, P.M., TERRA, N.R. y ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. En: *Environ. Toxicol. Chem.* Vol: 20.6 (2001); p. 1320–1324.

LEMOS, C., RODEL, P., TERRA, N., D'AVILA, N. y ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol: 66 (2007); p. 391–401.

LEWIS, S. V. y POTTER, I. G. Gill Morphometrics of the ampreys K (L and *Lampetra planeri* Bloch). School of Biological Sciences, University of Bath, Claverton Down. Bath, Avon, .K. 1975.

LINDE-ARIAS, A.R., INÁCIO, A.F., DE ALBURQUERQUE, C., FREIRE, M.M y MOREIRA, J.C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. En: Science of the total environment. Vol: 399 (2008); p. 186–192.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. En: Aquat. Sci. Vol: 42 (1985); p. 630–648.

MANNA, G.K., BANERJEE, G. y GUPTA, S. Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish, *Oreochromis mossambica*. En: Nucleus. Vol: 28 (1985); p. 176–179.

MANNA, G.K. y SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). En: Curr. Sci. Vol: 10 (1986); p. 498–501.

MARRAZZINI, A., BETTI, C., BERNACCHI, F., BARRAI, I. y BARALE, R. Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. En: Mutagenesis. Vol: 6–9 (1994); p. 505–515.

MARYGOMEZ, I., SOTO, M., TANCIO, I., ORVEA, A., GARMENDÍA, L., y CAJARAVILLE, M. Cell and tissue biomarkers in mussel and hystopathology in Hake anchovey from Bayo Biscay after the prestige oil spill. En: Elsevier marine pollution bulletin. Vol: 53 (2006); p. 287-304.

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P.V., DECORDER, I. y KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. En: Biochimie. Vol: 88 (2006); p. 1515–1531.

MATSUMOTO, F.E. y COLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. En: Genet. Mol. Biol. Vol: 23.2 (2000); p. 489–492.

MEINELT, T., KRUGER, R., PIETROCK, M., OSTEN, R. y STEINBERG, C. Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues. En: Environ. Sci. Pollunt. Pes. Vol: 4 (1997); p. 32- 36.

METCALFE C.D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). En: Bull. Environ. Contam. Toxicol. Vol: 40 (1988); p. 489–495.

MINISSI, S., CICCOTTI, E. y RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. En: *Mutat. Res.* Vol: 367 (1996); p. 245–251.

MONDADORI, R.G., LUQUE, M.C.A., SANTIN, T.R. y BAO, S.N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. En: *Animal Reproduction Science.* Vol: 97 (2007); p. 323–333.

MORO-RODRIGUEZ, J.E. Introducción a la patología diagnóstica cuantitativa y sus aplicaciones. VIII Congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica. Disponible en URL: <http://conganat.cs.urjc.es>. 2006.

MUÑOZ, E. y ANGEL, A. Diversidad de la vegetación en un gradiente altitudinal del flanco Oriental de la cordillera Occidental de los Andes Colombianos. En: *Memorias XXVII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.* Pasto. Vol. 1 (2002); p. 228-228.

MUÑOZ, D. y GUERRERO, N. Inducción de MN in vivo en eritrocitos de branquias de *Oreochromis niloticus* por efecto de ROUNDUP. Popayán, 2003. Tesis (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales exactas y de la educación.

NARVÁEZ, J., ACERO, A. y BLANCO, J. Variación morfométrica en poblaciones naturalizadas y domesticadas de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) en el norte de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 2005.

NERO, V., FARWELL, A., LISTER, A., VAN DER KRAAK, G., LEE, L.E.J., VAN MEER T., MACKINNON, M.D. y DIXON, D. G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* Vol: 63 (2006); p. 365–377.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A, BLEGER, L., PELLETIER, E. y ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). En: *Environ. Res.* Vol: 90 (2002); p. 217-225.

ORREGO, A Y AGUDELO, A. Inventario minero de las cuencas bajas de los ríos Telembi- Patía (Fase I del proyecto). Popayán. 1989. p: 1-17.

ORTEGA-LARA., A; USMAS., J; BONILLA, P Y SANTOS., L. Peces de la cuenca del río Patía, Vertiente del Pacífico Colombiano. En: *Biota Colombiana* 7 (2) (2006); p: 179 – 190.

- PACHECO, M. y SANTOS, M. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol: 53 (2002); p. 331–347.
- PAWERT, M., MULLER, E. y TRIEBSKORN, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. En: *Tissue Cell*. Vol: 30 (6) (1998); p. 617–626.
- PEÑA, E.J., CANTERA, J.R. y PALACIOS, M.L. Nutrient dynamic in the Dagua river estuary, Pacific Coast of Colombia. *Memorias IX Congreso Latinoamericano en Ciencias del Mar-Colacmar*. San Andres Isla, Colombia. (2001); p. 13-17.
- PERRY, F. THE CHLORIDE CELL: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. En: *Annual Review of Physiology*. Vol: 59 (1997); p. 325-347.
- PERRY, F. Relationships Between Branchial Chloride Cells and Gas Transfer in Freshwater Fish. En: *Elsevier Science. Biochem. Physiol.* Vol: 119A, No. 1 (1998); pp. 9–16.
- PLAN DE MANEJO AMBIENTAL INTEGRAL - HUMEDAL LAGUNA DE SONSO - MUNICIPIO DE GUADALAJARA DE BUGA. ASOYOTOCO, CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL VALLE DEL CAUCA DIRECCIÓN TÉCNICA AMBIENTAL (convenio 136 DE de 2005). Santiago de Cali, Agosto de 2007.
- POLEKSIC, V. y KARAN, V. Effects of Trifluralin on Carp: Biochemical and Histological Evaluation. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol: 43 (1999); p. 213-221.
- POOMAN, K y FARHAT, N.J. Biological markers for metal toxicity. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol: 19 (2004); p. 335-349.
- PORTO, J., ARAUJO, C. y FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. En: *Environmental Research*. Vol: 97 (3) (2005); p. 287-292.
- PRATAP, H. y WENDELAAR BONGA, S. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. En: *Aquatic Toxicology*. Vol: 26 (1-2) (1993); p. 133-149.
- RABITTO, I.S, COSTA, J. R. M., SILVA DE ASIS, H. C., PELLETIER, É., AKAISHI, F. M., ANJOS, A., RANDI, M. A. F. y RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol: 60 (2005); p. 147–156.

RAINBOW, P. S. The biology of heavy metals in the sea. En: Int. J. Environ. Stud. Vol: 25 (1985); p. 195- 211.

RALDÚA, D., DíEZ, S., BAYONA, J. M. y BARCELÓ, D. Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor- alkali factory. En: Chemosphere. Vol: 66 (2007); p. 1217- 1225.

RANK, J., LEHTONEN, K.K., STRAND, J. y LAURSEN, M. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. En: Aquatic Toxicology. Vol: 84 (2007); p. 50–61.

REGOLI, F. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy- metal pollution. En: Marc. Ecol. Prog. Ser. Vol: 84 (1992); p. 63- 69.

ROBBINS, L y COTRAN, S. Patología Estructural y Funcional. Elsevier España, S.A. Séptima Edición. Madrid, España. (2005); p. 1-67.

RODRIGUEZ-CEA, A., AYLLON, F. y GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. En: Ecotoxicol. Environ. Saf. Vol: 56 (2003); p. 442–448.

ROYERO, R. y LASSO, C. Distribución Actual de la Mojarra de Río, *Caquetaia kraussi*, (Steindachner, 1878) (Perciformes, Cichlidae) en Venezuela: Un ejemplo del Problema de la Introducción de Especies. En: Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle. Vol: 52 (138) (1992); p. 163–180.

RUSSO, C., ROCCO, L., MORESCALCHI, M.A. y STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. En: Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol: 57(2004); p. 168-174.

SANCHEZ, J.G., SPEARE, D.J. y JOHNSON, G.J. Morphometric and histochemical assessment of the branquial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramines- T treatment. En: J. Comp. Path. 1997.

SANCHEZ, J.G., SPEARE, D.J., SIMS, D.E. y JOHNSON, G.J. Morphometric Assessment of Epidermal and Mucous- biofilm Changes Caused by Exposure of Trout to Chloramine- T or Formalin Treatment. En: J. Comp. Path. Vol: 118 (1998); p. 81- 87.

SÁNCHEZ-GALÁN S, LINDE A.R, IZQUIERDO J.I, GARCÍA-VÁZQUEZ E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*):

complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. En: *Mutat Res.* Vol: 412 (1998); p.219–25.

SANCHEZ-GALÁN, S., LINDE, A.R., AYLLON, F. y GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. En: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol: 49 (2001); p. 139–143.

SANZ, N., RÍOS, N., SEGUÍ, M., DÍAZ, P. y FERNÁNDEZ, P. La digitalización de imágenes aplicadas a la anatomía patológica. En: *Revista Cubana de Investigación Biomédica.* Vol: 25(4) (2006).

SILVERBERG, B.A. Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (Chlorophyceae, Ulotric hales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. En: *Phycologia.* Vol: 14 (1975); p. 265–274.

SOUZA, T y FONTANETTI, C. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. En: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* Vol: 605 (1-2) (2006); p. 87-93.

SPRY, D.J. y WEINER, J.G. Metal bioavailability and toxicity to fish in low alkalinity lakes: a critical review. En: *Environ. Pollut.* Vol: 71 (1991); p. 243-262.

SVOBODOVA, Z., BEKLOVA, M., MACHALA, M., DRABECK, P., DVORAKOVA, D., KOLAROVA, J., MARSALEK, B. y MODRA, H. Evaluation of the effect of chemical substances, preparation, wastes and waste waters to organisms in the aquatic environment. En: *Bull. VURH Vodnany.* Vol: 32 (1996); p. 76–96.

TALAPATRA, S.N. y BANERJEE, S.K. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farm. En: *Food and Chemical Toxicology.* Vol: 45 (2) (2007); p. 210-215.

TEH, S.J., ADAMS, S.M. y HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral fresh water fish populations exposed to different types of contaminant stress. En: *Aquatic toxicology.* Vol: 37 (1997); p. 51- 70.

THOPHON, S., KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E.S., POKETHITIYOOK, P., SAHAPHONG, S. y JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. En: *Environ. Pollut.* Vol: 121 (2003); p. 307–320.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. En: *Aquat Toxicol.* Vol: 79 (23) (2006); p. 201–204.

VERJÁN, N., IREGUI, C.A., REY, A.L. y DONADO, P. (2001). Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. En: Revista Acuática, Vol:15.

VIGANO, L., CAMOIRANO, A., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., POLESELLO, S., FRANCISCI, C. y DE FLORA, S. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. En: Mutat. Res. Vol: 515 (2002); p. 125–134.

VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI, C., FABBRI, E. y KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2- tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. En: Comparative Biochemistry and Physiology. Vol: 146C (2007); p. 281-300.

WINTER, M., ELLIS, L. y HUTCHINSON, T. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. En: Mutation Research. Vol: 629 (2007); p. 89–99.

ZENG, D., LI, Y. y LIN, Q. Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou city, People's Republic of China. En: Mutat. Res. Vol: 426 (1999); p. 159–161.

ZHANG, I., WONG, M.H. Environmental mercury contamination in China: sources and impacts. En: Environ. Int. Vol: 33 (2007); p. 108–121.

http://www.rednaturaleza.com/peces_doc.asp?p=Tilapia; http://www.redesc.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/tilapia/tilapia1.htm

<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r23189.DOC>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Branquia>

http://es.wikipedia.org/wiki/Arco_branquial

<http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Prodacuat/MORFOLOGIA.htm>

http://ar.geocities.com/caracolespatagonicos/el_caracol.htm