

PRUEBA DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS DE SABALETAS (Brycon henni E.) PRESENTES EN EL RÍO PORCE Y EN EL EMBALSE PORCE II, ANTIOQUIA

Hurtado Alarcón, Julio¹ Solarte David, Victor A.²; López Ortiz, J.B³; Montoya Herrera F.L.³

³ Profesor Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Postgrado en Biotecnología. E-meil: jblopez@unalmed.edu.co.
jblopez@unal.edu.co

Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola
año II, vol. 2, 2007. ISSN 1909 - 8138

RESUMEN

El río Porce tiene su origen en el río Medellín, y es el principal afluente que abastece el embalse Porce II. En este río, se ha reportado la presencia de xenobióticos entre los que se encuentran metales pesados y otros contaminantes, los cuales forman mezclas complejas que pueden llegar a ser potenciales genotóxicos, para los seres vivos que se expongan a ellas. En el presente trabajo, se evaluó el potencial efecto ecogenotóxico del río Porce y del embalse Porce II, mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ejemplares de Brycon henni E. (Sabaleta). Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa entre la frecuencia de micronúcleos obtenida en ejemplares capturados en el río Porce (0.053 %) y en el embalse (0.026 %), con relación al sitio control (0.001 %). De otra parte, se observó que para cada sitio evaluado se observaron frecuencias diferenciales de micronúcleos, lo que puede estar correlacionado con la calidad del agua en estos lugares. Por último, se mostró que la Sabaleta es un buen bioindicador, el cual podría constituirse en un organismo centinela para evaluar la presencia de agentes xenobióticos con potencial efecto mutagénico en ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: Xenobióticos; Genotoxicidad; Ecogenotoxicidad; Prueba de Micronúcleos; Brycon henni; Bioindicador; Mutágeno.

INTRODUCCIÓN

A través de la historia del desarrollo humano, el hombre siempre lo ha asaltado la preocupación sobre la calidad del ambiente y todos sus componentes. Por ejemplo, Hipócrates en su libro “sobre aires, aguas y lugares” habla de la importancia de los factores ambientales sobre las enfermedades. En esta información se tiene en cuenta, entre otras, las estaciones del año, dirección y calidad de los vientos, calidad y característica del agua y el modo de vida de los seres humanos.

Como respuesta a esta preocupación histórica, surge el campo de la Genética Toxicológica, que tiene como objetivo, identificar y analizar la acción de aquellos agentes que son capaces de interactuar de manera negativa sobre los componentes de la célula y/o de manera especial sobre el material genético. A estos agentes, que pueden ser físicos, químicos y biológicos, se la denominan cito y/o genotóxicos.

Al blanco de acción de todo agente cito y/o genotóxico es la célula, como unidad funcional y estructural de los seres vivos, por lo cual, tanto los organismos unicelulares

como los pluricelulares ya sea a nivel somático o germinal pueden servir como blanco de acción de cualquiera agente que pueda actuar como factor toxico.

Los posibles efectos que se pueden detecto en un sistema experimental para evaluar compuestos cito y genotoxicos pueden ser: muerte celular en el caso que la acción sea citotóxica y efecto mutagénico, carcinogénico y clastogénico, en el caso que el efecto sea genotoxico. Es de anotar la alta correlación existente entre la mutagenicidad y los procesos de carcinogénesis debido a que el inicio de todo proceso carcinogénico casi siempre está relacionado con una mutación de un proto-oncogen. De otra parte, en los organismos pluricelulares, se podrían encontrar otros efectos como son la teratogenesis y las manifestaciones epigenética.

En el caso de organismos pluricelulares, un efecto genotoxico sobre células somáticas podrían conducir a la generación de enfermedades o a la producción de carcinomas, teratomas, sarcomas o leucemias, según el tejido. En el caso que el blanco genético sea las células germinales, las consecuencias se podrían reflejar en generaciones posteriores.

- La lista de agentes cito y genotoxicos que pueden afectar a la salud humana en particular y a las diferentes poblaciones de organismos en general son numerosas pero se pueden citar las más frecuente y evaluadas hasta el momento. Entre los agentes físicos tenemos las radiaciones ionizantes donde están los rayos- X y la luz ultravioleta, en las radiaciones no ionizantes se pueden contabilizar los campos magnéticos y eléctricos, las ondas de radio, las radiaciones de alta y baja frecuencias y las generadas por los hornos microondas; En cuanto a los agentes químicas, los mas frecuentemente reportados como agentes cito y genotoxicos son los usados en preservación de alimentos, los agroquímicos donde están pesticidas y los que provienen de medicamentos y de la pirolisis de la materia orgánica, sin dejar de mencionar el grupo de contaminantes denominados industriales donde se encuentran las baterías incluyendo los de celulares y los desechos de equipos electrónico como los computadores. Otra fuente de genotoxicos químicos son los metales pesados tales como el cadmio, cromo, plomo y el mercurio. Entre los agentes biológicos se pueden mencionar los virus y los radicales libre producto principalmente de la digestión de alimentos.

Los agentes tóxicos se pueden encontrar en los diferentes ecosistemas: por ejemplo, los ecosistemas acuatices son susceptible de ser contaminados por agentes tóxicos proveniente de la vida urbana, de la industria petroquímica, hidrocarburos, metales pesados, nitritos y nitratos, pesticidas, detergentes, entre otros. En el aire se puede encontrar el oxido nítrico producto de la combustión del petróleo, gasolina y carbón. A los ecosistemas terrestres recibe de aire y agua y de los entierros de desechos

Cuando se propone evaluar el riesgo de un determinado agente cito o genotoxico se debe tener en cuenta las propiedades físico-química del compuesto, su potencia y la persistencia en un determinado sistema. En este momento es donde se presenta la necesidad de saber elegir un determinado sistema de prueba que permita detectar con la mayor confianza y precisión, si el agente es cito y/o genotoxico. Para esto hay que tener en cuenta que en la actualidad no existe una única prueba que permita detectar mutágenos y carcinógenos ambientales con toda certeza, a la vez que cualquier paquete o batería de pruebas podrían resultar insuficiente para demostrar la ausencia de efecto o actividad muta carcinogénica en un determinado organismo.

Las líneas de evidencias tenidas en cuenta para evaluar una sustancia con posible efecto mutagénicos son las siguientes: registros de casos en las poblaciones, exposición crónica en animales, actividad genotoxicas en animales mediante prueba de aberraciones cromosómicas (AC) o micro núcleo (MC) actividad genotóxicas en líneas celulares establecidas usando pruebas de (AC), Intercambio entre Cromátidas Hermanas

(ICH), actividad epigenética en animales y la prueba de verosimilitud bioquímica y biofísica.

Los sistemas o pruebas para evaluar un agente tóxico se puede dividir en tres grandes grupos: In Vitro, in vivo, in vivo-in vitro y directamente en los ecosistemas o in situ.

Los estudios in vivo se lleva a cabo en animales como ratón, donde se pueden realizar evaluaciones como inducción de cáncer, (AC), (MN), Letales Dominantes. ICH, prueba cometa (TC); En insecto como *Drosophila melanogaster*, donde se pueden inducir mutaciones puntuales, rearrreglos estructurales, letales recesivos; En plantas donde se evalúan mutaciones puntuales, AC y MN.

Los estudios in vitro se realizan en bacterias usando la prueba denominadas test de Ames; En líneas celulares establecidas se pueden detectar AC, Efecto aneuploide y mutaciones puntuales usando el gen Hiposantina Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT), además se pueden aplicar pruebas de transformación celular, prueba cometa (TC), ICH y evaluación de efecto sobre el ciclo celular.

Las pruebas In vivo/ in vitro que consisten en evaluar organismos o personas que están expuestas ocupacionalmente a los agentes genotóxicos que podrían ser de gran utilidad para la evaluación de aquellas personas que por su ocupación están sometidos a exposición ya sea de manera crónica o aguda a estos agentes. En este caso se toma la muestra y se somete a cultivo para mirar todos los posibles efectos que le están causando la exposición a un determinado agente.

Existen pruebas como la evaluación de Aductos de DNA en HPLC, detectar alteraciones en el espermograma, mapeo de oncogenes y evaluación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). Todas estas pruebas mencionadas constituyen, en la actualidad, elementos que sirven de herramientas para alimentar campos de la tecnología como es la epidemiología molecular que permite establecer programas de salud preventiva en poblaciones o individuo que de una u otra manera resulten expuestos a estos agentes cito y/o genotóxicos.

Con referencia a las pruebas de cito toxicidad, las más usadas en la actualidad son las siguientes: MTT, eficiencia de clonación, coloración donde se encuentran el azul de tripano, rojo neutro, naranja de acridina y yoduro de propidio, uso de invertebrados y la viabilidad en larvas de insectos como la *Drosophila melanogaster*.

La detección de agente tóxico presentes en los ecosistemas tanto terrestre como acuáticos son más difíciles de establecer debido a que en la mayoría de los casos corresponden a mezclas complejas o a efectos que son la sumatoria de muchos factores presente en el medio. En estos casos se deben implementar pruebas denominadas ECOGENOTOXICOLÓGICAS, que permitan evaluar en el ecosistemas la presencia de un factor o factores que estén causando el o los efectos cito y/o genotóxicos. Para ecosistemas terrestres se usa una planta del género *Tradescantia* donde se pueden observar mutaciones que están directamente relacionados con la presencia de agentes genotóxicos en el medio.

Para las pruebas ecogenotológicas en ecosistemas acuáticos se debe pensar en especies de organismos que sean sensibles a agentes genotóxicos y que además puedan resistir cambios relacionados con la contaminación. Estas dos características son las que debe poseer un organismo de ecosistemas acuáticos para constituirse en un organismo centinela de estos ecosistemas. Este proyecto se desarrollo con el fin de proponer organismos centinelas que permita identificar factores o agentes genotóxicos presentes en un determinado ecosistema acuático.

Ecosistema seleccionado.

El ecosistema seleccionado fue el embalse de la central hidroeléctrica Porce II el cual se encuentra localizado en el Nordeste Antioqueño y está abastecido principalmente por el río Porce, el cual tiene su origen en el río Medellín, además de varias quebradas que recogen el agua de toda la zona de influencia del embalse (EPM, 1993). Algunos de los diferentes caudales de agua que alimentan el embalse se encuentran contaminados con desechos industriales y domésticos, como es el caso del río Medellín y sus afluentes provenientes del área metropolitana del Valle de Aburrá (Instituto Mi Río 1997, 2001; EPM, 2005). También se hallan potencialmente contaminados con residuos de agroquímicos y de minería en el caso de varios de los diferentes afluentes que desembocan en el embalse. En el embalse Porce II se ha reportado la presencia de metales pesados tales como plomo, mercurio, cadmio, zinc, cromo, cobre, además de moléculas complejas tales como nitratos y nitritos, detergentes, cloruros, fosfatos, elementos tales como hierro, sodio y boro, provenientes de la contaminación a que se encuentra sometido el sistema río Medellín-Porce (EPM, 2005).

Las mezclas complejas de xenobióticos provenientes de ríos contaminados, pueden contener una amplia variedad de compuestos, entre los que se encuentran hidrocarburos poli cíclicos aromáticos, órgano clorados y metales pesados, entre otros (REDCAM, 2002), y pueden llegar a ser mutagénicas o genotóxicas (Minissi et al., 1996; Grisolia & Starling, 2001), para los seres vivos que se expongan a ellas (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

Unas de las posibilidades para detectar la presencia de estos agentes ganotoxicos seria usando como sistema modelo prueba en peces que se encuentran es estos ecosistemas expuestos de manera aguda o crónica a estos agentes. Las posibles pruebas que se podrían utilizar serian la prueba o ensayo cometa, (Bombail et al., 2001; Ferraro et al., 2004; Winter et al., 2004), la prueba de Micronúcleos y anormalidades nucleares (Carrasco et al., 1990; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Bombail et al., 2001; Buschini et al., 2004) ya que estas pruebas no necesitan realizar cultivos celulares como es el caso de las técnicas que usan como sistema de evaluación células en metafase como son (ICH) y aberraciones cromosómicas donde es necesario realizar cultivos celulares. Otro motivos para no realizar estas dos técnicas antes mencionadas es porque en muchas especies de peces, sus cariotipos contienen un gran número de cromosomas pequeños e irregulares. De otra parte numerosos estudios in vivo han mostrado que la prueba de micro núcleo, puede llegar a proveer estimativos de frecuencias de daño mutacional (Ulupinar & Okumus, 2002), y dado que los eritrocitos de los peces teleósteos son nucleados, pueden ser evaluados como medida de actividad clastogénica (Al-Sabti & Metcalfe, 1995)

En el río Porce y el embalse Porce II habitan diferentes especies de peces, las cuales son extraídas para su comercialización y para consumo familiar. Entre dichas especies se encuentra la sabaleta (*Brycon henni* E.), especie nativa de importancia tanto ecológica como de recurso pesquero tradicional, con presencia tanto en aguas contaminadas como limpias de la zona de influencia del embalse Porce II, tal como lo demuestran los registros obtenidos por Urán & Torrente (2001), Castellanos (2003) y por pescadores de la zona de estudio. Dados los perjuicios potenciales involucrados en la exposición in situ de peces a diferentes químicos y a ambientes contaminados, en el presente estudio se realizó una evaluación ecogenotóxica, usando como método preliminar la presencia de micro núcleos en eritrocitos de sangre periférica de sabaletas capturadas en el área de influencia del embalse Porce II.

METODOLOGÍA.

Descripción del área de muestreo:

La cuenca del río Porce abastece al embalse Porce II, el cual abarca un área aproximada de 3023 km² (EPM, 2005), y está ubicada en el departamento de Antioquia, en jurisdicción de los municipios de Amalfi, Gómez-Plata y Yolombó, aproximadamente a 120 kms de Medellín. El área de influencia del complejo hidroeléctrico Porce II está localizada en las zonas de vida Bosque Muy Húmedo Premontano de Transición y Bosque Húmedo Tropical (Holdridge, 1978). Los sitios de muestreo fueron los siguientes: río Porce antes de la cola del embalse (Guacavé); quebradas La Cáncana y El Guayabito (Afluentes); embalse Porce II, (Puente Guaduas); antiguo cauce del río Porce (Casa de Máquinas); ríos Guadalupe (Gómez Plata) y Riachón (Amalfi) (control negativo).

Fase de campo:

Se capturaron 58 ejemplares adultos o gonadalmente maduros de Sabaleta en un lapso de seis meses (diciembre/2004, febrero y marzo/2005) (tabla 1). A cada ejemplar capturado se le tomaron datos tales como sitio de captura, sexo y estado de maduración gonadal, y se les determinó el peso y las longitudes total (LT) y estándar (LE, boca hasta pedúnculo caudal). Los peces se sacrificaron inmediatamente y se sangraron en el mismo sitio, se realizaron dos extendidos de sangre por individuo y se transportaron a Medellín al laboratorio de Citogenética de la Universidad Nacional de Colombia. Allí se fijaron con metanol absoluto durante cinco minutos y se tiñeron con Giemsa al 8%.

Fase de laboratorio:

La frecuencia de micronúcleos se determinó como el conteo de células micronucleadas en tres mil (3.000) eritrocitos por individuo. Como criterio de clasificación de células con micronúcleos, se contabilizaron aquellas que poseían desprendimientos nucleares observables al microscopio y aquellas que enfocaban y teñían igual que el núcleo celular principal (Carrasco et al., 1990; Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

Análisis estadístico:

Los parámetros morfológicos peso y longitud total (LT) y frecuencia de micronúcleos (MN), se evaluaron mediante métodos no paramétricos. Se hizo comparación de medianas para la frecuencia de micronúcleos entre los sitios muestreados, utilizando la prueba Kruskal-Wallis.

RESULTADOS.

Descripción del área de muestreo:

En la tabla numero1 se muestran los datos sobre las características morfológicas longitud total y peso, y las frecuencias de MN por sitio de muestreo, Tabla 1. Longitud total, peso y frecuencias de MN en eritrocitos de sangre periférica de los ejemplares evaluados de *B. henni* en el área de estudio.

CARACT. EVALUADAS	SITIOS EVALUADOS DURANTE EL MUESTREO					P<
	GUACAWE	PUEENTE	MAQS	AFLU	CONTROL	
Nº individuos	13	11	11	13	10	0,05
LT (cms)	23,81	21,74	20,11	17,69	21,85	a 0,05
PESO (grs)	210,77	165	130	136,4	170	a 0,05
FREC. MN/ 3000 cels (%)	0.0597	0.037	0.0264	0.020	0.003	a 0,05
MEDIANA (%)	0.0533	0.0266	0.0266	0.013	0.001	0,04 b
RANGO MN	8 - 43	1 - 40	0 - 18	0 - 21	0 - 4	

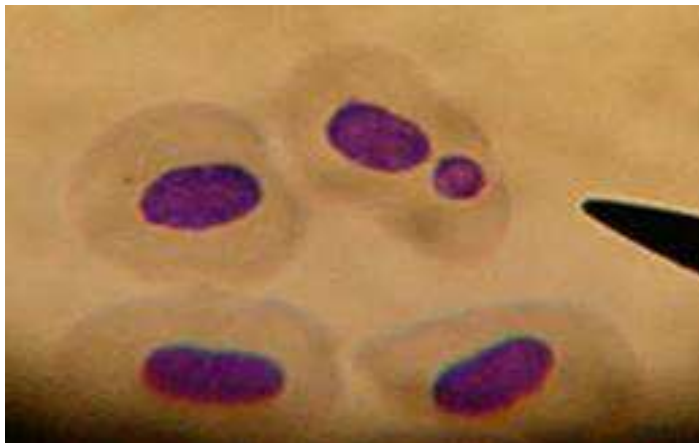
a ANOVA

b Kruskal-Wallis

Análisis estadístico:

Las frecuencias de los sitios Puente Guaduas y Casa de Máquinas fueron iguales (0.026 %), pero hubo diferencias significativas entre todos los sitios y el control negativo (0.001 %), así como entre Guacavé (0.053 %), y el resto de los sitios. También se hallaron diferencias significativas entre la frecuencia de los sitios Afluentes (0.013 %) y la del resto de los sitios (tabla 1). No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los sexos para frecuencia de micronúcleos ($p=0.05$).

Figura 1. micro núcleo obtenido de sangre periférica de una sabaleta capturada en zona contaminada del embalse Porce II



DISCUSIÓN.

El resultado más significativo en el presente estudio, fue la demostración donde se determina que existe una correlación directa entre la frecuencia de micro núcleos con la calidad del agua de los diferentes ambientes evaluados. Sin embargo, debe anotarse que las únicas informaciones sobre datos físico-químicos de las aguas de la zona de estudio, corresponden al río Medellín (Instituto Mi Río, 1997, 2001) y al embalse Porce II (EPM, 2005). Para el resto de sitios muestreados, no existe información sobre la calidad

de sus aguas. Sin embargo, se pudo apreciar que los sitios reportados como limpios (sitio Afluentes, quebradas La Cancana y El Guayabito), y los sitios tomados como control negativo (ríos Guadalupe y Riachón), eran sitios de aguas muy claras, limpios y sin olores, en los cuales no se reportan descargas de origen antrópico en gran escala tal como lo que se reporta para el río Porce. Estas fuentes de agua, por el contrario, han sido sitios tradicionales de pesca deportiva.

Los resultados de las evaluaciones realizadas sobre esta prueba de genotoxicidad, están de acuerdo con varios estudios que han encontrado frecuencias elevadas de micronúcleos y de anormalidades nucleares en peces que habitan sitios contaminados. En una investigación realizada en Italia, Minissi et al. enjaularon especímenes de *Barbus plebejus* en ríos con diferentes niveles de contaminación, con el objetivo de inferir la presencia de mutágenos en el agua. Se observó una frecuencia superior de micronúcleos en los peces enjaulados en el río más contaminado, cuando se compararon con las frecuencias de los peces que provenían del control (Minissi et al., 1996).

En la cuenca del río Amazonas, se ha reportado el uso de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de peces que habitan aguas contaminadas por mercurio procedente de minería. Porto et al. (2004), evaluaron tres especies de peces pertenecientes a tres niveles tróficos diferentes, en dos ríos con diferentes niveles de contaminación por mercurio. Las frecuencias promedio de MN observadas en *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventris* (omnívoro) y *Hoplias malabaricus* (piscívoro), presentes en el río Madeira (contaminado) (0.038, 0.037 y 0.017 %, respectivamente), fueron significativamente superiores a las frecuencias obtenidas en las mismas especies pero capturadas en el río Solimões (control, no contaminado con mercurio; 0.01, 0.01 y 0.006 %, respectivamente). Además, la frecuencia promedio de MN de la especie piscívora, fue al menos cinco veces superior que la frecuencia de MN de las especies detritívora y omnívora (Porto et al., 2004). Por otra parte, frecuencias bajas de micronúcleos no necesariamente son un indicador de ausencia de compuestos con potencial genotóxico. Esto podría deberse a poblaciones adaptadas para resistir los efectos de la genotoxicidad, a través de mecanismos tales como el incremento en las reacciones metabólicas tendientes a inactivar e incrementar la excreción de compuestos genotóxicos (Bard, 2000), además del aumento de la tasa de reparación de su ADN y de las tasas de renovación celular (Bombail et al., 2001).

En el caso de las sabaletas presentes en el embalse Porce II, su exposición crónica a contaminantes puede estar relacionada con su comportamiento reófilo y con su alimentación omnívora. Además, el presente trabajo mostró que la sabaleta (*Brycon henni* E.) es una especie sensible a agentes genotóxicos usando la técnica de micronúcleos, y podría constituirse en un buen bioindicador (centinela) del estado de contaminación en que se encuentran los ecosistemas en que habita. Además, podría incrementar su sensibilidad aplicando pruebas complementarias como el ensayo cometa.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Al-Sabti, K. & Metcalfe, C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343:121-135.
2. Bard, S.M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48: 357-389.
3. Bombail V., Aw D., Gordon E., Batty J. 2001. Application of the comet and micronucleus assay to butterflyfish (*Phollis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44:383-392.

4. Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi C., Santoro M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research* 557 (2):119-129.
5. Castellanos, L. 2003. Evaluación y manejo de los recursos ícticos en el embalse Porce II, Antioquia, Colombia. CORANTIOQUIA, Subdirección de Recursos Naturales.
6. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., & Myers, M.S. 1990. Assesment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Vol. 47:2123-2136.
7. EMPRESAS PÚBLICAS DE MEDELLÍN. 2005. Análisis físico-químicos de las aguas del embalse Porce II años 2001-2003. Área Hidrometría e Instrumentación.
8. _____. 1993. Estudio de evaluación ambiental del proyecto Porce II. Volumen 3.
9. Ferraro M., Fenocchio A., Mantovani M., Ribeiro C., and Cestari M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *Hoplias malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology* vol 27(1):103-107.
10. Grisolia, C.K. & Starling, F. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research* 491: 39-44.
11. Holdridge, L. 1978. Ecología basada en zonas de vida. IICA. SERIE DE LIBROS Y MATERIALES EDUCATIVOS. San José, Costa Rica. 216 p.
12. Instituto Mi Río. 2001. Segunda evaluación biológica del río Medellín. Colección Estado social, ecológico y ambiental del río Medellín. Tomo II.
13. _____. 1997. Aspecto biológico y fisicoquímico del río Medellín. Colección Estado social, ecológico y ambiental del río Medellín. Tomo I.
14. Minissi S., Ciccotti E., Rizzoni M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in fresh water. *Mutation Research* 367: 245-251.
15. Porto, J.I.R., Araujo, C.S.O., and Feldberg, E. 2004. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research* (in press).
16. REDCAM - Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras de Colombia. 2002. Diagnóstico Nacional. INVEMAR. Santa Marta.
17. Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* 31:9-15.
18. Ulupinar, M. & Okumus, I. 2002. Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish. *Turk. J. Zool.* 26:141-148.
19. Urán C., L.A. & Torrente P., A. 2001. Informe monitoreo de fauna íctica en el embalse Porce II, sus quebradas afluentes y comparación con la línea base. Empresas Públicas de Medellín. Gerencia de Generación de Energía, Subgerencia Ambiental – Area de gestión Ambiental.
20. Winter, M.J., Day, N., Hayes, R.A., Taylor, E.W., Butler P.J., and Chipman, J.K. 2004. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research* 552:163-17.