



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

PATRÓN DE PROTEÍNAS EN EL RIÑÓN DEL PEZ DULCE ACUÍCOLA  
*Colossoma macropomum* EXPUESTO A CADMIO Y A UNA TEMPERATURA DE  
35°C  
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARÍA CAROLINA CORDERO MARTÍNEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

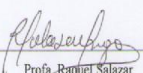
Cumaná, 2012

PATRÓN DE PROTEÍNAS EN EL RIÑÓN DEL PEZ DULCE ACUÍCOLA  
*Colossoma macropomum* EXPUESTO A CADMIO Y A UNA TEMPERATURA DE  
35°C


APROBADO POR:

PATRÓN DE PROTEÍNAS EN EL RIÑÓN DEL PEZ DULCE ACUÍCOLA  
*Colossoma macropomum* EXPUESTO A CADMIO Y A UNA TEMPERATURA DE  
35°C

APROBADO POR:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Raquel Salazar  
Asesora Académica

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Mairin Lemus  
Jurado principal

  
\_\_\_\_\_  
Profa. América Vargas  
Jurado principal

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>i</b>
Grupo experimental.....	7
Manejo y aclimatación .....	7
Bioensayo subletal .....	7
Obtención de la muestras .....	8
Obtención de la fracción soluble.....	9
Cuantificación de proteínas.....	9
Separación de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE .....	9
Preparación de los geles .....	9
Preparación de la muestra .....	10
Realización de la electroforesis.....	11
Tinción de los geles con azul brillante de Comassie.....	11
Análisis electroforético .....	11
El recuento deferencial de células.....	12
Análisis de los resultados .....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
Biomarcadores externos observados en los peces en condiciones de laboratorio ..	13
Perfil electroforético de proteínas .....	15

Porcentaje de bandas por cada condición.....	16
Concentraciones de proteínas totales en riñón del pez <i>Colossoma macropomum</i> ..	17
Distribución de células en sangre periférica en <i>Colossoma macropomum</i> .....	19
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>
<b>Hoja de Metadatos .....</b>	<b>30</b>

## DEDICATORIA

A:

Dios todopoderoso que siempre me acompaña gracias por facilitarme todos los elementos para alcanzar esta meta anhelada.

Mamá que me vigila desde el cielo y quien me ayudo incondicionalmente en vida, sé que estará muy feliz por este logro, dios te bendiga siempre viejita.

Mili quien me ha dado la fortaleza para seguir adelante en los momentos más difíciles, mil gracias por el amor que siempre me has dado, por ser mi madre y por todo el esfuerzo que has hecho para que hoy yo esté aquí, te estaré eternamente agradecida.

Iduber gracias por tu amor, comprensión y paciencia has sido un gran apoyo para culminar esta meta, te amo mi amor.

Mi hermana diana que con su cariño y apoyo ha estado conmigo en buenos y malos momentos, te quiero muchísimo hermana.

Papá pablo quien me ha brindado su cariño y ayuda desde el día que nací, dios te cuide siempre y te de larga vida mi viejo.

Papá Benito gracias por estar conmigo, he sentido mucho tu apoyo estos últimos años.

Todos mis tíos y primos que por razones de espacio se me hace imposible nombrarlos a todos, gracias por el apoyo, cariño y preocupación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A:

Ante todo, a Dios, porque gracias a su mano poderosa logré realizar este trabajo.

Dra. Raquel Salazar un agradecimiento muy especial por su asesoría, por haberme brindado su apoyo, orientación, estímulo, amistad y paciencia durante la realización de esta investigación, le estaré eternamente agradecida.

Licenciada Ivic Blanco y a la profesora América Vargas las cuales prestaron su colaboración para la realización de este trabajo.

Las profesoras Mariola Berrizbeitiay Luz Bettina Villalobos por su colaboración y la disposición de las instalaciones del Postgrado de Biología Aplicada.

Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) UDO-PROYECTO G-2005000775.

ALMA C.A por haber donado los peces y por su colaboración prestada al proyecto UDO-PROYECTO G-2005000775.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comportamiento de los organismos controles .....	13
Tabla 2. Comportamiento de los organismos expuestos a cadmio .....	14
Tabla 3. Comportamiento de los organismos expuestos a 35°C.....	14
Tabla 4. Comportamiento de los organismos expuestos a cadmio y 35°C.....	15
Tabla 5. Rango de proteínas expresadas por el pez <i>Colossoma macropomum</i> .....	17
Tabla 6. Valores promedios de la concentración de proteínas de riñón del pez <i>Colossoma macropomum</i> .....	19
Tabla 7. Distribución porcentual de células del pez <i>Colossoma macropomum</i> .....	19

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de proteínas.A y B. Electroforesis de proteínas de la fracción soluble del riñón en organismos expuestos a cadmio, 35°C , Cd/ 35°C y su grupo control. (Abreviaciones: Cd: cadmio; 35°C: temperatura; Cd/35°C: cadmio y temperatura; C: control). En el circulo rojo se observa la posible inducción de HSP47. ....	16
Figura 2. Variaciones en las concentraciones de proteínas solubles en riñón de <i>Colossoma macropomum</i> expuestos a cadmio, 35°C, Cd/35°C y su grupo control. Figuras: 2A: control versus cadmio; 2B: control versus 35°C; 2C: control versus Cd/35°C, (P<0,05).....	18
Figura 3. Variaciones en las concentraciones de proteínas solubles en riñón de <i>Colossoma macropomum</i> expuestos a cadmio, 35°C, Cd/35°C y su grupo control....	19
Figura 4. Extendidos sanguíneos de alevines de <i>Colossoma macropomum</i> . A: controles; B: Cadmio; C: 35°C. ( ) Reticulocitos redondeados con daños en la membrana nuclear; D: Cd/35°C. ( ) Reticulocitos de tipo punteado. ....	20



## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del cadmio, la temperatura de 35°C y la combinación de ambos (Cd/35°C) sobre el perfil de proteínas en el riñón de alevines del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*; así como comparar los posibles cambios en el patrón de proteínas del tejido expuesto a estas condiciones. Los peces fueron aclimatados durante 20 días antes de la realización de los ensayos. Posteriormente, se expusieron por 21 días a 0,01 mg/l de cloruro de cadmio y a 8 días a 35°C de temperatura y a Cd/35°C, una vez finalizada la exposición, se les tomó muestras de sangre para realizar los frotis sanguíneos y luego, fueron sacrificados y disectados para obtener el riñón para la realización del perfil de proteínas. La fracción citoplasmática del riñón se obtuvo por centrifugación diferencial y las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE, reveladas y cuantificadas. Los resultados indicaron que la exposición a cadmio indujo algunos cambios en el comportamiento de los alevines, se evidenció una disminución en la alimentación, en la última semana del grupo expuesto a cadmio, a diferencia de los expuestos a 35°C y a Cd/35°C, quienes manifestaron cambios en la respuesta de huida y se observaron activos desde el primer día de exposición; el perfil electroforético reveló la inducción de una proteína de 49 kDa en los peces expuestos a cadmio; el grupo expuesto a Cd/35°C presentó un aumento significativo en la concentración de proteínas totales respecto al control. El recuento diferencial en sangre periférica, reveló un aumento en los reticulocitos de peces expuestos a 35°C y Cd/35°C. El cadmio induce la posible expresión de una proteína de choque térmico en el riñón de alevines de *C. macropomum*; la temperatura y el cadmio afectan la hematopoyesis en estos organismos.

## INTRODUCCIÓN

La síntesis y reparación de proteínas en respuesta a estresores ambientales, conduce a un sustancial costo energético que puede reducir la disponibilidad de energía para otras funciones orgánicas, tales como, crecimiento y reproducción; además de comprometer la función inmune que se basa en procesos de traducción y transcripción (Kassahnet *al.*, 2007). En organismos como el bacalao *Gadus morhua*, los cambios de temperatura son normales, pero si los cambios son más rápidos que la compensación fisiológica, éstos responden con típicas respuestas de estrés (Aursnes *et al.*, 2011).

La temperatura es un factor que afecta directamente el metabolismo de los animales. A medida que aumenta la temperatura, también, incrementa la tasa metabólica y viceversa. Al incrementarse la tasa metabólica también lo hace la demanda energética, por lo cual, el organismo consume una mayor cantidad de alimento, provocando que la tasa de crecimiento también se vea incrementada. Esto sucede hasta un determinado momento, en el cual la temperatura es óptima para que el organismo tenga su mayor tasa de crecimiento. A partir de ese punto, a medida que la temperatura aumente, la tasa metabólica y consumo de alimento seguirán en aumento, pero la tasa de crecimiento comenzará a disminuir, ya que, aunque el organismo consuma una mayor cantidad de energía, ésta no será utilizada para el crecimiento, sino para satisfacer las necesidades de un metabolismo acelerado (Martínez *et al.*, 2009).

Todos los organismos, incluyendo teleósteos, responden a las altas temperaturas sintetizando las proteínas de choque térmico o HSP, del inglés Heat Shock Proteins.

La inducción de su síntesis es rápida e incrementa la termotolerancia del organismo a subsecuentes exposiciones al calor (Auró y Ocampo, 1999). Las HSP, con respecto a su función y estructura se encuentran entre las proteínas más conservadas en la historia evolutiva, pues cumplen un papel similar en todos los organismos ya sean archaea, bacterias, levaduras, plantas o animales (Feder y Hofmann, 1999).

Una prolongada exposición al calor del pez coralino *Pomacentru moluccensis*, indujo la expresión de ciertos genes, de los cuales 8% fueron proteínas de procesamiento, 6% proteínas del metabolismo, 40% de respuestas al estrés y 15% de genes de traducción y transcripción (Kassahnet *al.*, 2007).

En la especie *Pomacentrusmoluccensis* se ha observado que estresores ambientales, tales como cambios de temperatura (frío y calor), hipoxia, hipoosmolaridad, inducen supresión del crecimiento celular, aumento del daño de proteínas y de la síntesis de nuevas proteínas, ajustes metabólicos, inducción de genes de estrés y de los sistemas de reparación celular y cambios en la función inmune (Kassahnet *al.*, 2007).

El riñón es el órgano hematopoyético e inmunológico de preferencia en los peces. Tanto el riñón como el bazo, ostentan centros melanomacrofágicos que acumulan las células inmunitarias producidas en estos órganos (Ellis, 1980).

Castillo *et al.* (2009) concluyeron que la expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias en el riñón de la *Sparusaurata*, se ve influenciada por las hormonas relacionadas con el estrés como el cortisol, lo que indica un papel importante para el sistema endocrino en la modulación de la respuesta inmune en los peces teleósteos. Por otro lado, algunas proteínas plasmáticas como la  $\beta$ 2-microglobulina son reguladas por la temperatura (Das y Gerstein, 2000).

La producción de células sanguíneas en el pez cebrá adulto, al igual que otros

teleósteos, se produce en el riñón, que soporta tanto las funciones renales como la hematopoyesis multilinaje. Similar a los mamíferos, los linfocitos T se desarrollan en el timo que existen en dos sitios bilaterales del pez cebra. El riñón en teleósteos es un tejido que se encuentra a lo largo de la columna vertebral; la porción anterior o riñón cefálico, muestra una mayor proporción de células sanguíneas que en los túbulos renales de la porción posterior, denominado riñón excretor. Todos los tipos de células sanguíneas maduras se encuentran en el riñón y morfológicamente, se asemejan a sus homólogos mamíferos, con las excepciones que se mantienen los eritrocitos nucleados y los trombocitos realizan la función de coagulación de las plaquetas (Stachura y Traver, 2011).

Tanto la fisiología como la distribución de los peces, influyen en los distintos tipos de estrés físico que pueden padecer estos organismos. La temperatura, radiación ultravioleta, acidez del agua y contaminantes se suelen considerar dentro de los factores abióticos más determinantes de los cambios fisiológicos que pueden presentar los peces (Snyder y Rossi, 2004). Si bien, la intensidad de la tensión no puede ser medida, son las respuestas al estímulo las que se determinan cuantitativamente. Sin embargo, los efectos del estrés a nivel poblacional, aunque difíciles de comprobar, son los que tienen mayores relevancias ecológicas. Se manifiestan por la reducción en los procesos de desove y pobre calidad de la progenie de la población (Flores, 2002).

El cadmio (Cd) es un contaminante del medio ambiente que tiene efectos adversos en los peces, origina disfunción renal, eleva las pérdidas urinarias, ocasiona anomalías en el comportamiento (Thophon, 2004; Chowdhury y Wooda, 2007; Matz y Krone, 2007).

El cadmio es absorbido y bioacumulado en los tejidos con relativa facilidad por largos periodos de tiempo, por lo que causa numerosos daños en los órganos

(Swiergosz *et al.*, 1998). Los principales órganos donde se acumula son en el riñón e hígado, se une a las metalotioneínas y cuando las concentraciones superan el complejo cadmio-metalotioneínas se originan patologías tales como: neoplasias, nefropatías, neuropatías y osteopatías (Doli, 1993; Allison *et al.*, 1996; Orłowski *et al.*, 1998; Croute *et al.*, 2000).

Los niveles de proteínas totales, la actividad de ceruloplasmina, así como la actividad de lisozima se encontraron elevados en el riñón de *Perca flavescens*, colectados en los sitios más contaminados del río San Lawrence, Quebec, Canadá (Dautremepuit *et al.*, 2009). En ríos venezolanos uno de los principales contaminantes inorgánicos encontrado en proporciones moderadas es el cadmio (Salazar *et al.*, 2009). El Cd es carcinógeno e inmunotóxico en una variedad de especies de mamíferos y provoca alteraciones fisiológicas que afectan particularmente el metabolismo celular (Viarengo *et al.*, 1981; Zelikoff *et al.*, 1995).

Velmurugan *et al.*, (2008) encontraron que el nivel de proteínas totales en los tejidos de alevines de *Clarias gariepinus* expuestos a cloruro de cadmio, mostró una disminución significativa en comparación con los controles no expuestos.

El sistema hematopoyético de los peces es altamente sensible a estresores ambientales; por lo que los estudios hematológicos en estos organismos aportan significativa información en el diagnóstico e interpretación de sus enfermedades (Salazar *et al.*, 2009).

A bajas concentraciones, el cadmio puede afectar los índices sanguíneos de los peces, producir daños irreversibles en estos organismos porque tiende acumularse en órganos como el hígado y el riñón; además de competir con los metales esenciales como el zinc, el cobre y el calcio por los sitios de unión en las proteínas, produce anemia, inmunosupresión y cáncer (Salazar *et al.*, 2009; Salazar, 2009)

En Venezuela, la acuicultura es una actividad emergente con un importante incremento de la pesca comercial y actividades posteriores (Useche, 2000). La cachama *Colossoma macropomun* (Characidae) es especialmente apetecida la calidad de su carne; la acuicultura de ésta se ha desarrollado notablemente mediante la reproducción artificial o inducida, multiplicándose así su comercialización según (Fernández, 1986). La cachama, es una especie piscícola que está siendo empleada para esta actividad, dado que en el país se distribuyen en los grandes ríos, principalmente, en los ríos Guanare, Portuguesa, Apure y los afluentes del Orinoco, y además, posee una demanda media en los mercados de algunas ciudades de importancia.

La cachama, es un pez de porte relativamente grande, originario de la cuenca del Orinoco, desde donde se distribuyó a la Amazonia, tiene un comportamiento migratorio (reofilico) y se desplaza muchos kilómetros aguas arriba, durante el verano y alcanza la madurez sexual a los 3 años (Fernández, 1986). Es un pez que puede soportar un amplio rango de pH y baja concentración de oxígeno, por lo que puede vivir en diferentes ambientes (Useche, 2000).

En el laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad del Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, se han realizado estudios sobre las respuestas hematológicas e inmunológicas y bioquímicas del pez *Colossoma macropomum*, a la toxicidad inducida por contaminantes, tales como metales pesados, con la finalidad de desarrollar biomarcadores de toxicidad en ambientes dulceacuícolas. Entre los trabajos realizados con contaminantes y este organismo se pueden señalar el de (Hernández, 2005) quien no observó variación en la concentración de proteínas de las fracciones citoplasmáticas y de membrana del hígado de *C. macropomum* expuesto a cadmio. León (2006), observó un aumento significativo de trombocitos en el pez *C. macropomum* expuesto a cadmio y a la temperatura de 30°C y una disminución en los reticulocitos de los peces expuestos a este metal. Mata (2008), evaluó el efecto de

temperatura sobre algunos tejidos de *C. macropomum* encontrando que el riñón expuesto a la temperatura de 35°C, presentó lesiones severas.

Los resultados reportados en estos trabajos sugieren que el cadmio afecta los sistemas de defensa del pez, probablemente, por su acción directa sobre el riñón, principal órgano hematopoyético en peces; de allí la relevancia de este trabajo donde se plantea evaluar el patrón de proteínas de *C. macropomum* expuesto a cadmio y a temperatura de 35°C.

# METODOLOGÍA

## **Grupo experimental**

Se usaron 80 alevines de *Colossoma macropomun*, que fueron provistos por la Piscicultura Alma C.A (ALMACA), ubicada en la localidad de Campo Mata, estado Anzoátegui. Los peces se trasladaron en bolsas plásticas con agua y oxígeno debidamente sellados hasta el laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre.

## **Manejo y aclimatación**

En el laboratorio las bolsas con los peces fueron colocadas en tanques preparados con agua declorada y aireada, transcurrido el tiempo de 30 minutos, los peces se sacaron de las bolsas y fueron colocados directamente en el tanque.

Para recuperarlos del estrés y prevenir infecciones bacterianas y fúngicas, al agua aireada se le agregó azitromocina y cloranfenicol. Durante el tiempo de aclimatación, se realizaron recambios de agua declorada entre el 75 y el 80% del volumen total, se alimentaron con el 40% de su peso corporal una vez al día. Finalizado el tiempo de aclimatación de 30 días, los peces fueron considerados aptos para someterse a bioensayos de toxicidad.

## **Bioensayo subletal**

El ensayo subletal se realizó de la siguiente manera:



Se seleccionaron 42 peces, los cuales estuvieron divididos en 4 grupos; el primer grupo de 10 peces se denominó grupo control (C), el segundo grupo (12 peces) expuestos a Cadmio (Cd) por 21 días, (6 peces para cada acuario), el tercer grupo conformado por (10 peces), expuestos a la temperatura de 35°C durante 8 días (5 peces para cada acuario) y el cuarto grupo 10 peces expuestos a cadmio y 35°C (Cd/35°C) por 8 días (5 peces para cada acuario). La concentración letal media calculada para la especie fue de 38,4 mg/l (Blanco 2004), se adicionaron 0,01 mg/l de cloruro de cadmio a los acuarios del grupo 2 y 4 (Cd, Cd/35°C), obtenido a partir de las concentraciones letales medias CL50 (96 horas). Para mantener la temperatura a 35°C, se utilizó calentadores adaptados a los acuarios. Diariamente, se mantuvo un registro de la temperatura del agua, utilizando un termómetro marca Hanna; igualmente, se realizaron mediciones de pH del agua. Se les suministró alimento antes del recambio total de agua cada 24 horas. La iluminación artificial se redujo envolviendo los acuarios con bolsas negras para no alterar el comportamiento de los peces.

### **Obtención de la muestras**

Después de transcurrido el período de exposición, las muestras sanguíneas de los alevines se tomaron mediante una punción en el pedúnculo caudal, siguiendo la técnica descrita por Centeno *et al.*, (2007) y Blanco (2004) utilizando jeringas desechables de 3 ml, previamente impregnadas con heparina sódica comercial (1 000 UI/ml). De las muestras sanguíneas obtenidas, se realizó un frotis de sangre periférica. Una vez tomadas las muestras sangre, los peces se sacrificaron y se procedió a realizar la disección de los mismos obteniendo cuidadosamente el tejido del riñón. El tejido obtenido se identificó debidamente e inmediatamente se procedió a congelarlos a -40°C hasta su posterior procesamiento.

### **Obtención de la fracción soluble**

Las fracción soluble se realizó de acuerdo al procedimiento señalado por Superti y Donelli, (1995) modificado. Una vez pesados los tejidos se le agregó 2,5 ml de buffer lisis, el cual se preparó agregándole; ditioneitol (DTT) 0,0005 mol/l, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,001 mol/l, hidroximetilaminometano (Tris) 0,01 mol/l y 200,0 µl mercaptoetanol se procedió a homogenizarlo con un triturador eléctrico, manteniéndolos en un envase con hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas.

El homogenizado se centrifugó a 1 050 g por 15 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y éste se centrifugó a 3 200 g por una hora a 4°C en una centrífuga refrigerada marca Hermle Z 383. Una vez centrifugada la muestra, se separó el sobrenadante, el cual se tomó como la fracción soluble.

### **Cuantificación de proteínas**

Las proteínas citoplásmicas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (1976), agregando 2,5 ml de solución de Bradford en tubo de ensayo con 100,0 µl de muestra; utilizando como estándar albúmina a una concentración de 10 mg/ml, se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer Lambda 25 a 595 nm, el resultado se expresó en microgramo de proteínas por mililitro de tejido húmedo (µg/ml).

### **Separación de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE**

#### Preparación de los geles

Las proteínas de la fracción soluble se separaron por electroforesis en geles de

poliacrilamida-sodio dodesil sulfato (SDS-PAGE) al 12,0% de acuerdo a Laemmli (1970).

Los geles de poliacrilamida se prepararon mezclando los componentes siguientes; agua, poliacrilamida 30,0%, hidroximetilaminometano (tris) 1,5 mol/l, pH 8,8, dodecilsulfato sódico (SDS) 10,0%, persulfato de amonio 10,0% y tetrametil-etildiamida (temet). Inmediatamente, se procedió a colocar la solución de acrilamida así preparada, en el espacio entre las placas de vidrio (0,75 mm de espesor), hasta una distancia que permitió colocar el gel acumulador. Una vez polimerizado el gel separador, se lavó con agua desionizada para eliminar restos de poliacrilamida no polimerizada.

Los componentes del gel acumulador fueron preparados en este orden; agua, poliacrilamida 30,0%, tris 1,0 mol/l, pH 6,8, SDS 10,0%, persulfato de amonio 10,0% y temet. Este gel se colocó directamente sobre la superficie del gel separador e inmediatamente se insertó un peine que permitió hacer los bolsillos donde se colocó la muestra. Después de polimerizar, fue retirado el peine cuidadosamente, y se procedió a lavar las cavidades con una pisseta con agua desionizada para eliminar cualquier resto de poliacrilamida no polimerizada y se colocó el gel en la cámara de electroforesis a la que se le agregó el buffer de electroforesis Tris-glicina.

### **Preparación de la muestra**

Una vez determinada la cantidad de proteínas a cada muestra, se tomó 20 µg/µl del extracto proteico de cada una de ellas para la electroforesis y 20 µl de buffer muestra SDS, se calentó durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar la proteína. El mismo procedimiento se siguió para el marcador de masa molecular. Se emplearon dos marcadores de masa molecular marca BIO-RAD, uno de alto y otro de bajo peso molecular a un gel de 12,0%, usando como referencia este último.

### **Realización de la electroforesis**

La electroforesis se realizó a 200 voltios por 45 minutos, aproximadamente, hasta que las muestras llegaron al final de la placa de vidrio. Una vez finalizada la electroforesis, se separó del vidrio, se marcó la primera muestra y se procedió a colorear el gel (Laemmli, 1970).

### **Tinción de los geles con azul brillante de Comassie**

El colorante azul brillante se preparó disolviendo 0,25 g de azul brillante de Comassie en 90 ml de la mezcla metanol: agua (1:1 V/V) y 10 ml de ácido acético glacial, el cual se filtró en papel Watman N° 2 para evitar material particulado.

El gel fue sumergido en la solución colorante y luego, se dejó por 4 horas a temperatura ambiente agitándolo suavemente. Posteriormente, se retiró el gel del colorante y se colocó en una solución de ácido acético-metanol, para su decoloración, la solución decolorante se cambió de 3-4 veces hasta que el gel se observó transparente y las bandas de las proteínas se visualizaron. Los geles se almacenaron en bolsas de plástico en glicerol acuoso al 20,0% para evitar que disminuyera la intensidad de coloración de las bandas (Laemmli, 1970).

### **Análisis electroforético**

Las diferentes fracciones de las proteínas en la electroforesis fueron reveladas en un sistema de documentación de geles “Gel doc XR” (BIO-RAD) y cuantificadas con el programa QuantityOne, que permitió determinar la masa molecular relativa.

### **El recuento diferencial de células**

Fué realizado utilizando el método de GiemsaMay-Grünwald, mediante contaje directo sobre un frotis sanguíneo previamente secado al aire y fijado con metanol absoluto durante 5 minutos y se secó nuevamente al aire, se agregaron 15 gotas de colorante May -Grünwald y se dejó actuar por 3 minutos, luego se enjuagó con agua destilada, seguidamente se le añadieron 30 gotas de buffer fosfato (pH 7) y se sopló suavemente con una pipeta para mezclar el colorante y el buffer hasta que apareciera una película metálica sobre la superficie de la mezcla, se dejó actuar por 2 minutos, se lavó con agua destilada posteriormente se le agregó 15 gotas de colorante de Giemsa (sin diluir) por 7 minutos, finalmente se enjuagó con agua destilada, se secó al aire y se examinó microscópicamente con un microscopio óptico marcaOlympus, modelo CX41RF, con el objetivo de inmersión de (100X). Los resultados se expresaron en porcentajes de tipos celulares.

### **Análisis de los resultados**

Un análisis de varianza (ANOVA), fue efectuado en las diferentes concentraciones de proteínas entre un nivel de condición y otro. El ANOVA fue seguido de una prueba *t*-Student, en el cual se compararon los promedios de los organismos controles con cada una de las condiciones experimentales (Sokal y Rhol, 1981).

## RESULTADOS

La observación del comportamiento de los peces sometidos a condiciones de estrés es necesaria en la evaluación de estos organismos, en tal sentido se observó que los peces expuestos a cadmio a los 21 días presentaron disminución del apetito, aunque mantuvieron su reflejo de huida y el movimiento de aletas parecido a lo observado en los peces controles (Tabla 2).

### **Biomarcadores externos observados en los peces en condiciones de laboratorio**

Tabla 1. Comportamiento de los organismos controles

Tiempo en días	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
7	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Reflejo de huida	Normal
15	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Normal
21	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Normal

Tabla 2. Comportamiento de los organismos expuestos a cadmio

Tiempo en días	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
7	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Reflejo de huida	Normal
15	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Normal
21	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Normal

A diferencia de lo observado para los peces expuestos a cadmio, los peces expuestos a 35°C y a 35°C/Cd manifestaron cambios en la respuesta de huida y con aumento del apetito (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Comportamiento de los organismos expuestos a 35°C.

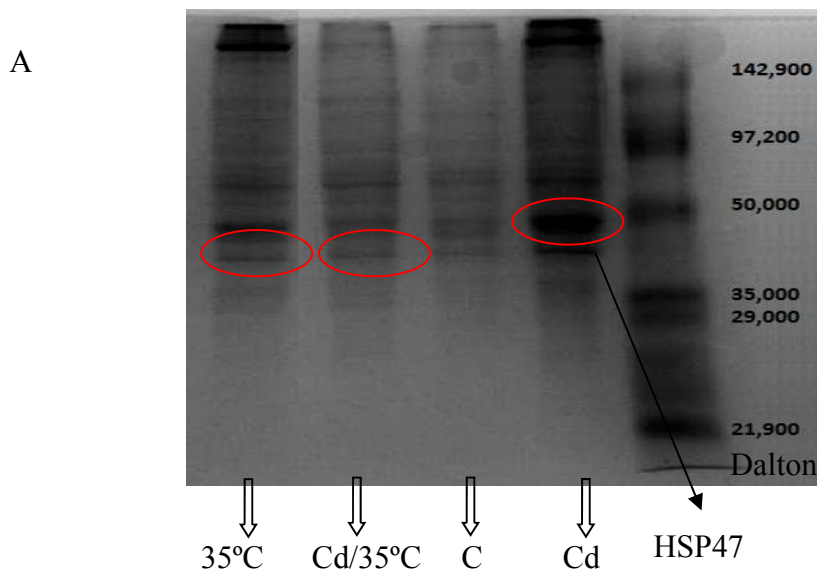
Tiempo en días	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
3	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Aumentado
8	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Aumentado

Tabla 4. Comportamiento de los organismos expuestos a cadmio y 35°C.

Tiempo en días	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
3	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Aumentado
8	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro.	Movimiento de aletas. Reflejo de huida	Aumentado

### Perfil electroforético de proteínas

El perfil electroforético de las proteínas extraídas de la fracción soluble del riñón de *Colossoma macropomun* revela la inducción de una banda de masa molecular aproximada de  $50 \pm 10$  kDa en los peces expuestos a cadmio (Figura 1).





B

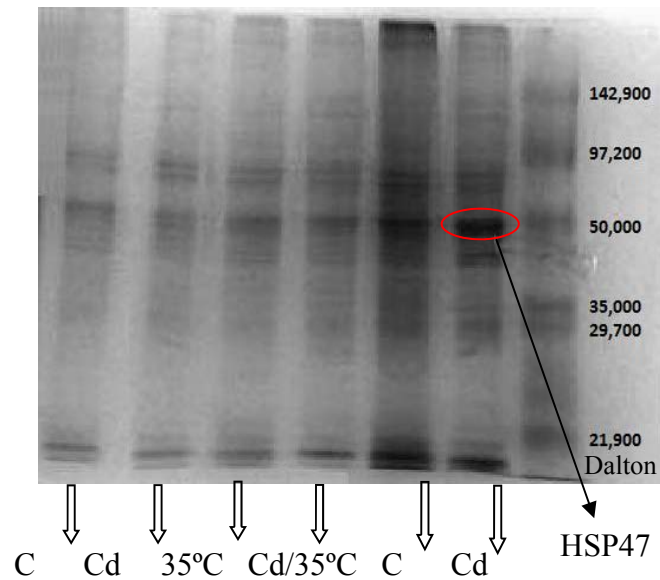


Figura 1. Electroforesis de proteínas.A y B. Electroforesis de proteínas de la fracción soluble del riñón en organismos expuestos a cadmio, 35°C , Cd/ 35°C y su grupo control. (Abreviaciones: Cd: cadmio; 35°C: temperatura; Cd/35°C: cadmio y temperatura; C: control). En el círculo rojo se observa la posible inducción de HSP47.

### Porcentaje de bandas por cada condición

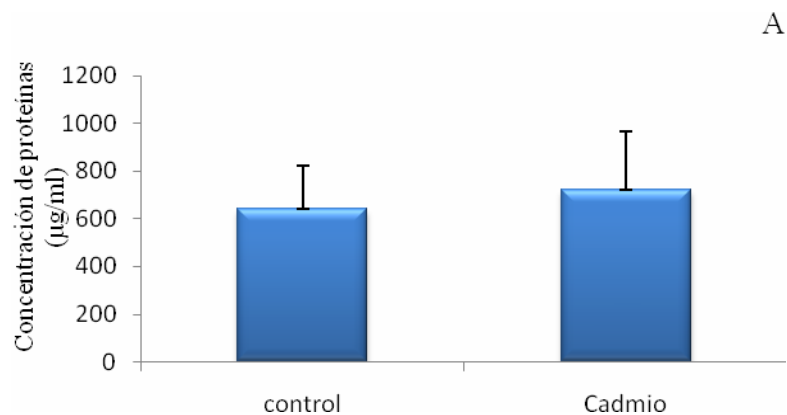
Cuando se calculó el porcentaje de bandas de acuerdo a un rango de masa molecular se observó que hubo un incremento de 18,0% de la banda de peso molecular entre 41-60 kDa en la fracción citoplasmática del riñón de los peces expuestos a cadmio y de 3,7% en los peces expuestos a Cd/35°C y 35°C, también se observó un aumento de 7,0% en el grupo de bandas de 61-80 kDa del grupo expuesto a cadmio (Tabla 3).

Tabla 5. Rango de proteínas expresadas por el pez *Colossoma macropomum*.

	21-40 kDa	41-60 kDa	61-80 kDa	81-100 kDa
	% Bandas	% Bandas	% Bandas	% Bandas
C	19,2	28,6	22,3	28,1
Cd	19,7	46,7	28,4	16,3
35°C	22,1	32,4	15,9	18,7
Cd/35°C	14,6	32,3	15,3	15,4

### Concentraciones de proteínas totales en riñón del pez *Colossoma macropomum*

El análisis de varianza muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de la concentración de proteínas y entre un nivel de condición y otro (ANOVA: 1,19,  $p > 0,05$ ), sin embargo, se observó que el grupo expuesto a Cd/35°C presentó el valor más alto de concentración de proteínas (Figura 3). Cuando se realizó una prueba de comparación de medias se encontró diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de proteínas para los controles y los peces expuestos a Cd/35°C ( $t$ -Student: 2,96  $p < 0,05$ ) (Figura 2C).



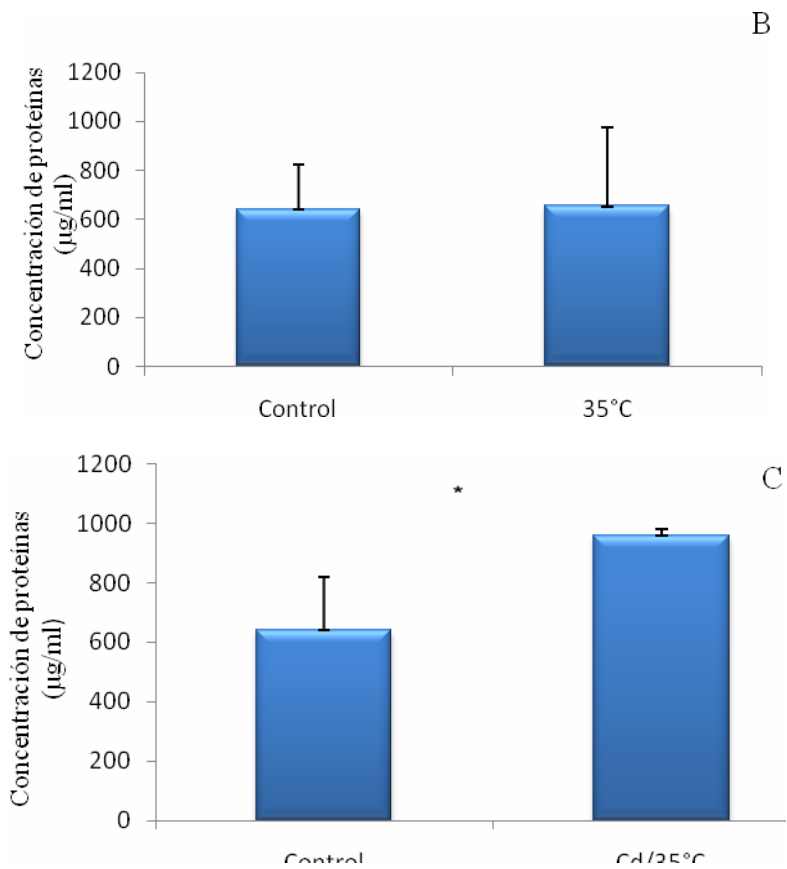


Figura 2. Variaciones en las concentraciones de proteínas solubles en riñón de *Colossoma macropomum* expuestos a cadmio, 35°C, Cd/35°C y su grupo control. Figuras: 2A: control versus cadmio; 2B: control versus 35°C; 2C: control versus Cd/35°C, (P<0,05).

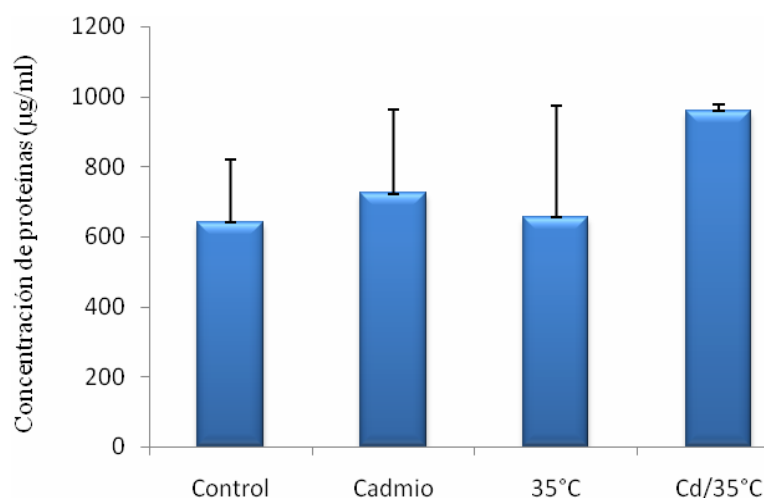


Figura 3. Variaciones en las concentraciones de proteínas solubles en riñón de *Colossoma macropomum* expuestos a cadmio, 35°C, Cd/35°C y su grupo control.

Tabla 6. Valores promedios de la concentración de proteínas de riñón del pez *Colossoma macropomum*.

	Control(µg/ml)	Cd(µg/ml)	35°C(µg/ml)	Cd/35°C(µg/ml)
Riñón	641,4 ± 179,9	723,1 ± 241,7	654,6 ± 320,2	958,4 ± 20,2

Cd: cadmio; 35°C: temperatura; Cd/35°C: cadmio y temperatura.

### **Distribución de células en sangre periférica en *Colossoma macropomum***

El rasgo más resaltante de los peces expuestos a los tres grupos experimentales fue el aumento de reticulocitos en sangre periférica, encontrándose los valores más altos en los peces expuestos a Cd/35°C. Se observó una disminución de linfocitos y neutrófilos en peces expuestos a 35°C (Figura 4).

Tabla 7. Distribución porcentual de células del pez *Colossoma macropomum*.

Parámetro	Control %	Cd %	35°C %	Cd/35°C %
Linfocitos	52,7 ± 23,4	72,6 ± 2,5	14,3 ± 4,04	35 ± 10,4
Neutrófilos	9,7 ± 5,9	9 ± 4,5	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5
Trombocitos	23 ± 18,2	11,6 ± 3,0	14,3 ± 12,0	46,5 ± 10,6
Reticulocitos	11 ± 6,3	84 ± 3,6	83,3 ± 3,7	92,7 ± 1,7

Cd: cadmio; 35°C: temperatura; Cd/35°C: cadmio y temperatura, %: porcentaje.

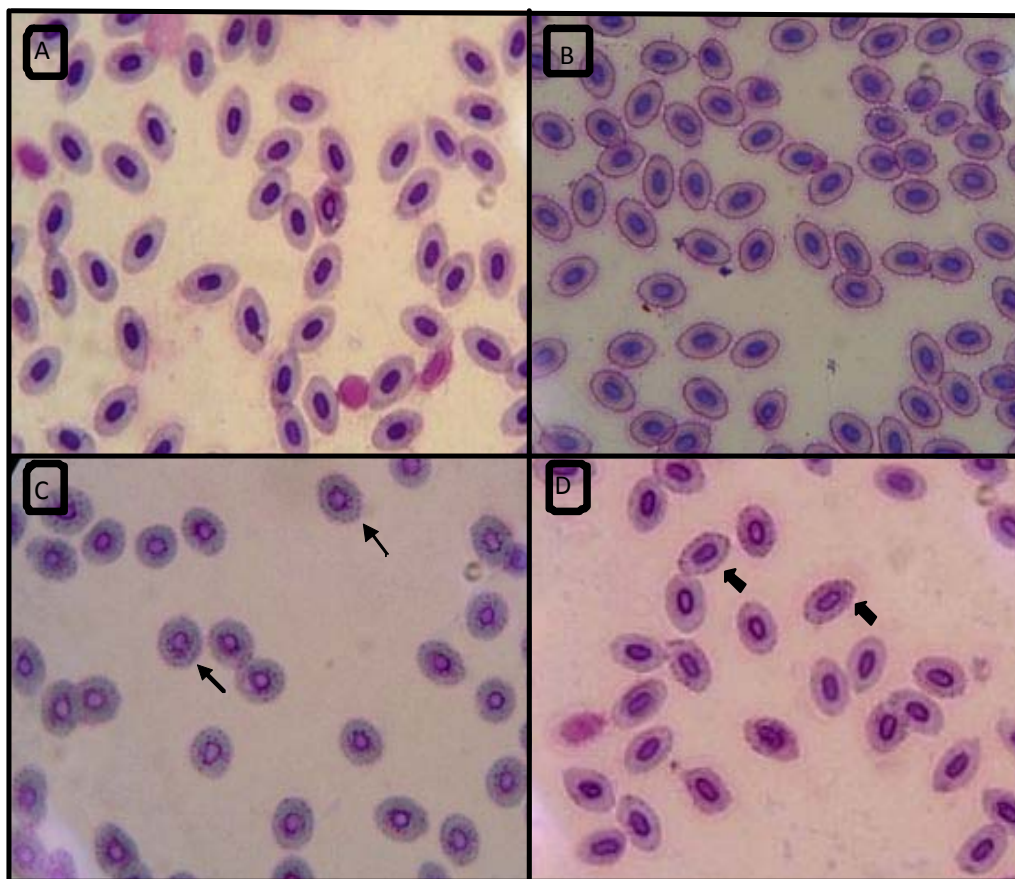


Figura 4. Extendidos sanguíneos de alevines de *Colossoma macropomum*. A: controles; B: Cadmio; C: 35°C. (↑) Reticulocitos redondeados con daños en la membrana nuclear; D: Cd/35°C. (⬆) Reticulocitos de tipo punteado.

## DISCUSIÓN

La exposición subletal a cadmio y a la temperatura de 35°C de alevines de *C. macropomum* indujo algunos cambios en su comportamiento. El grupo expuesto a cadmio presentó disminución en la alimentación, en la última semana de exposición al metal. A diferencia de lo reportado por McGeeret *al.*, (2000) en la trucha arcoíris en donde la exposición a concentraciones subletales de 3 ug cadmio produjo una disminución de la alimentación desde la primera semana de exposición. Feltenet *al.*, (2008) encontró que la alimentación, la ventilación y la actividad locomotora fueron reducidas en peces expuestos a cadmio, igualmente Eissaet *al.*, (2010) reportaron una disminución de la actividad en la *Cyprinus carpio* expuestos al metal. Estos resultados indican que el cadmio es un contaminante del medio ambiente que tiene efectos adversos en los peces, incluyendo anomalías en el comportamiento (Matz y Krone, 2007).

Los grupos expuesto 35°C y a Cd/35°C presentaron aumento en el apetito durante el tiempo de exposición. Un estudio revela que la temperatura es un factor que afecta directamente el metabolismo de los animales. A medida que esta aumenta, también aumenta la tasa metabólica. Al incrementarse la tasa metabólica también lo hace la demanda energética, por lo cual, el organismo consume una mayor cantidad de alimento, provocando que la tasa de crecimiento también se vea incrementada (Martínez *et al.*, 2009).

El perfil electroforético de las proteínas del riñón excretor de *C. macropomun* indican la inducción de una banda de aproximadamente 47 KDa en los peces expuestos a cadmio, Cd/35°C y 35°C, encontrándose mayormente expresada en el grupo expuesto a cadmio. En efluentes de aguas residuales y lixiviados, usando

células de ovario de hámster chino transfectadas con la proteína de choque térmico 47 (HSP47), se demostró que el cadmio induce una respuesta de estrés en células HSP, incluso a concentraciones de cadmio inferiores a las directrices nacionales e internacionales (Fredjet *et al.*, 2010); lo que lleva a sugerir que la exposición al cadmio induce la expresión de HSP47.

El impacto del cadmio en la dorada *Sparus aurata* fue reportado por (García *et al.*, 2010) encontrando un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico sugiriendo que estas proteínas contribuyen a la atenuación de los efectos nocivos de la exposición al cadmio. Se ha comprobado que, este metal afecta a las cadherinas del epitelio renal y del endotelio vascular ocasionando pérdida de las uniones célula a célula y pérdida de la morfología celular (Walter *et al.*, 2009).

El cadmio ejerce una acción negativa sobre el metabolismo del colágeno (Repetto, 1995). El colágeno constituye una familia de proteínas extracelulares que comienzan su montaje dentro del lumen del retículo endoplasmático y posteriormente son secretadas por la célula. El colágeno de tipo I al V se ha demostrado que se unen a una proteína de 47 kDa, HSP47 (Hagiwara *et al.*, 2007). La proteína de choque térmico 47, glicoproteína localizada en el retículo endoplásmico, es una chaperona molecular específica de colágeno y que desempeñan un papel importante en el tratamiento y la secreción de procolágeno, asimismo están implicadas en el control de la apoptosis y migración celular (Vasques *et al.*, 2010; Hagiwara *et al.*, 2007; Ishida y Nagata, 2011).

Hagiwara *et al.* (2007) realizaron un estudio para determinar si la inhibición de HSP47 podría tener efectos beneficiosos en la mitigación inducida por bleomicina en la fibrosis pulmonar en ratas, demostrando que los oligonucleótidos antisentido HSP47 inhibe la fibrosis pulmonar de ratas tratadas bleomicina y pueden ser útiles para tratar las diversas fibrosis. Esta proteína de choque térmico puede ser una diana

terapéutica para los trastornos relacionados con el colágeno como la fibrosis que cuentan con la acumulación anormal de colágeno (Ishida y Nagata, 2011). La expresión de HSP47 fue encontrada en los riñones de ratas adultas después de la obstrucción ureteral unilateral (Sakairiet *al.*, 2007), lo que sugiere que la HSP47 es una proteína expresada bajo ciertas condiciones de estrés en este órgano, para diferentes organismos, siendo uno de ellos, la cachama y el cadmio es un estresor que induce la expresión de la misma en este pez.

Las proteínas totales en el riñón de los organismos expuestos a cadmio, no evidenció diferencias significativas en relación al grupo control, resultados similares informaron (Velmuruganet *al.*, 2008) donde no hubo diferencias significativas en la concentración de proteínas totales en tejidos de alevines de *Clarias gariepinus* expuestos a cadmio. Las proteínas totales en el riñón de los organismos expuestos a temperatura, no evidenció diferencias significativas con respecto al grupo control, resultados distintos obtuvieron (Malevet *al.*, 2010) al exponer los cangrejos de agua dulce a altas temperaturas.

Sin embargo, en los organismos expuestos a Cd/35°C, se observó diferencias significativas en comparación al grupo control y el valor más alto de concentración de proteínas. El hecho de que se observara un aumento en la concentración de proteínas en este estudio, comprueba que los peces se encontraban sometidos a factores estresantes, como lo son la alta temperatura y el cadmio y la estrategia clave de estos organismos es inducir la formación de proteínas de choque térmico. Una de las funciones de estas proteínas es la de promover el correcto plegamiento de otras proteínas, en especial las proteínas vitales, ayudando en el desmontaje de la formación de agregados de proteína. Por lo tanto, la inducción de HPS es de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular (Padmini, 2010).

Una vez que el cadmio es incorporado al interior del organismo es retenido,



principalmente en el riñón e hígado (Hernández, 2005). El riñón es un órgano blanco en el cual el efecto tóxico del Cd se manifiesta (Hartad y Klaassen, 2002). El metal compite por los sitio de unión sobre las proteínas de membrana involucradas en el transporte de elementos esenciales tales como el Ca, Fe y Zn (Mac kin y Benoit, 2000).

El riñón excretor es el órgano que acumula cadmio en mayor proporción pues, es el encargado de la eliminación del complejo cadmio-metalotioneínas (Cd-MT) dicho complejo atraviesa el glomérulo renal y llega a la orina primaria donde las células del túbulo proximal lo reabsorbe casi completamente vía pinocitosis, ésto cuando la exposición es baja, en caso contrario, se supera la producción de metalotioneínas dejando cantidades de cadmio libre que ocasionan daños a las membranas celulares renales (Klassenet *al.*, 2004). En teleósteos, el riñón tiene dos segmentos uno con predominio linfo-hematopoyético (riñón cefálico) y otro donde el tejido hematopoyético forma una matriz entre el sistema excretor y las neuronas (riñón excretor) por lo que, ambos órganos están relacionados histológicamente (Ferguson, 1989).

La distribución de los distintos tipos de células encontradas en *C. macropomum*, revela que el Cd/35°C, afectan el número los reticulocitos, siendo estas las células más abundantes en todas las condiciones experimentales, resultados similares reportaron (Lewis *et al.*, 2012) al encontrar un aumento significativo en el número de glóbulos rojos inmaduros en la trucha arcoiris expuesta a estrés por calor.

Núñez y Bouda (2007) indican en su bibliografía que, en animales de laboratorio y peces es común observar reticulocitos en cantidad leve a moderada, que se asocia a la vida corta de los eritrocitos en estas especies, además señalan que existen 2 tipos de reticulocitos: los agregados y los punteados; los primeros presentan una maya reticular y son los más inmaduros; los punteados son más maduros y tienen pequeños

agregados de ARN. En este estudio se encontraron reticulocitos de tipo punteado al exponer los organismos a 35°C y Cd/35°C.

El alto número de reticulocitos en sangre periférica puede deberse a que el metal y la alta temperatura estén afectando el riñón cefálico, principal órgano hematopoyético del pez. Cuando hay disminución de las células rojas en sangre periférica el órgano hematopoyético aumenta la producción de células a manera de compensar el déficit de glóbulos rojos, liberando así células inmaduras al torrente sanguíneo o reticulocitos.

Salazar *et al.* (2009) reportaron disminuciones en el número de reticulocitos en el pez *C. macropomum* por exposición a cadmio y a temperatura, además señalan que la acumulación demostrada de cadmio en el riñón excretor del pez *C. macropomum* pudiese generar una insuficiencia renal crónica que produciría descenso en la producción de eritropoyetina por la células de los túbulos renales, y como consecuencia la aparición de anemia.

Los trombocitos de peces teleósteos son células multifuncionales que están involucradas en la liberación de eicosanoides, en el proceso de coagulación sanguínea (Salazar *et al.*, 2009) y en la defensa orgánica, por lo que son también considerados del linaje leucocitario, con actividad fagocítica (Tavares *et al.*, 2001). En el presente estudio se registró un aumento en el número de trombocitos en alevines de *C. macropomum* expuesto Cd/35°C.

Los neutrófilos y los linfocitos fueron las células más bajas en peces expuestos a temperatura. Resultados similares fueron obtenidos por Moura *et al.*, (1994) quienes reportaron en *C. macropomum* expuesto a las temperaturas de 20; 25; 30 y 40°C, índices muy bajos, casi ausentes, de neutrófilos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la exposición de alevines de *C. macropomum* a cadmio, 35°C y a Cd/35°C, indujo cambios en el comportamiento de este organismo, asimismo afectó la capacidad de producción de eritrocitos maduros por parte de los órganos hematopoyéticos; e indujo la expresión de una proteína de choque térmico de 47 kDa en el riñón.

## CONCLUSIONES

La exposición subletal a cadmio, a 35°C y Cd/35°C en alevines de *C. macropomum* indujo cambios en su comportamiento; los expuestos al metal presentaron disminución del apetito la última semana de la exposición, a diferencia de los expuestos a 35°C y a Cd/35°C quienes manifestaron cambios en la respuesta de huida y aumento del apetito desde el primer día de exposición.

El perfil electroforético de las proteínas del riñón excretor de los organismos expuestos a cadmio reveló la inducción de una HSP47.

Se produjo un aumento en la concentración de proteínas totales en los peces expuestos a Cd/35°C.

El frotis sanguíneo mostró un alto número de reticulocitos en todas condiciones experimentales.

## **RECOMENDACIONES**

Identificar con anticuerpos monoclonales la proteína inducida por exposición a cadmio.

Realizar determinaciones de hemoglobina con el método de la cianometahemoglobina, ya que este método permite trabajar con un volumen reducido sangre, por lo tanto es de gran utilidad para correlacionar valores de hemoglobina con el análisis de los componentes sanguíneos mediante un frotis de sangre periférica a objeto de tener un diagnóstico más certero.

## BIBLIOGRAFÍA

Allison, K.; Cerny, E.; Smith, D.; Wagh, A. y Bhattacharyya, M. 1996. Effects of cadmium on osteoclast formation and activity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140: 451-460.

Auró, A. y Ocampo, L. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. *Revista Veterinaria, México*, 30 (4):337-344.

Aursnes, I.; Rishovd A.; Karlsen H.; Gjøen, T. 2011. Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *Complementary and Alternative Medicine*, 5 (4)104.

Blanco, Y. 2004. Parámetros hematológicos e inmunológicos de la cachama *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) expuesto a cloruro de cadmio. Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Bradford, M. 1976. A refined sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Castillo, J.; Teles, M.; Mackenzie, S y Tort, L. 2009. Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunology*, 27 (3): 493-499.

Centeno, L.; Silva, R.; Barrios, R.; Salazar, R.; Matute, C y Pérez, J. 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 25 (4): 237-243.

Chowdhury, J. y Wooda, C. 2007. Renal function in the freshwater rainbow trout after dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145 (3): 321-332.

Crouté, F.; Beau, B.; Arrabit, C.; Gaubin, Y.; Delmas, F.; Murat, J y Soleilhavoup, J. 2000. Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long-term exposure to cadmium. *Environmental Health Perspectives*, 108 (1): 55-60.

Das, R. y Gerstein, M. 2000. The stability of thermophilic proteins: a study based on comprehensive genome comparison. *Functional Integrated Genomics*, 1:76-88.

Dautremepuits, C.; Marcogliese, D.; Gendron, A. y Fournier, M. 2009. Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River,

Canada. *Science of the Total Environment*, 407 (3): 1055-1064.

Doli, R. 1993. *Cadmium in the human environment. Toxicity and Carcinogenicity*. Oxford University, Oxford, Inglaterra.

Eissa, B.; Ossana, N.; Ferrari, L. y Salibian, A. 2010. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 1032-1039.

Ellis, A. 1980. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Disease*, 3: 413-426.

Feder, M. y Hofmann, G. 1999. Heat-shock proteins, molecular Chaperones, and stress response: evolutionary and ecological physiology. *Animal Review of Physiology*, 61:243-282.

Felten, V.; Charmantier, G.; Mons, R.; Geffard, A.; Rousselle, P.; Coquery, M.; Garric, J. y Geffard, O. 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 86: 413-425.

Ferguson, H. 1989. Systemic pathology of fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost. Iowa State University Press.

Fernández, J. 1986. "Peces más comunes del Territorio Federal Amazonas Venezuela". *Fonaiap*. "SIAN". En línea: [http://www.sian.inia.com.ve/repositorio/revistas/\\_fonaiapvulga/fd21/texto/peces](http://www.sian.inia.com.ve/repositorio/revistas/_fonaiapvulga/fd21/texto/peces) (15/07/ 2010).

Fredj, B.; Irie, M.; Han, J.; Yamada, P.; Limam, A.; Ghrabi, A.; Morio, T. y Isoda, H. 2010. Stress response of heavy metal mixture present in wastewater and leachate on heat-shock protein 47-transfected cells. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (7): 1637-1647.

Flores, C. 2002. Respuestas neuroendocrinas al estrés en peces teleósteos. *Revista de Ictiología*, 10: 57-78.

Garcia, S.; Varga, L.; Ruiz, I; Varela, J.; Mancera, J.; Fontáinhas, A. y Wilson, J. 2010. Metabolic and osmoregulatory changes and cell proliferation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 74 (3): 270-278.

Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Matsumoto, S. y Noguchi, T. 2007. Introduction of antisense oligonucleotides to heat shock protein 47 prevents pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced pneumopathy of the rat. *European Journal of*

*Pharmacology*, 564 (1-3):174-180.

Hartad, E. y Klaassen, C. 2002. Tumor necrosis factor  $\alpha$ - null mice are not resistant to cadmium chloride – induce hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179: 155-162.

Hernández, M. 2005. Proteínas en diferentes tejidos (hígado, riñón, branquias) del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* expuesto a dosis subletales de cobre y cadmio. Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Ishida, Y. y Nagata, K. 2011. Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods in Enzymology*, 499: 167-82.

Kassahn, K.; Crozier, R.; Ward, A.; Stone, G. y Caley, J. 2007. From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. *BMC Genomics*, 8: 358-363.

Klassen, K.; Crenshaw, R.; Kozyraki, P.; Verroust, L.; Tio, S.; Atrain, P y Hammond, T. 2004. Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *Renal Physiology*, 287: 393-403.

Martínez, M.; Martínez, L. y Ramos, R. 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (10): 1-16.

Mata, C. 2008. Efectos del herbicida paraquat y la temperatura sobre algunos tejidos de *Colossoma macropomum*, Curvier, 1818. Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná.

Malev, O.; Srut, M.; Maguire, I.; Stambuk, A.; Ferrero, E.; Lorenzon, S. y Göran, I. 2010. Genotoxic, physiological and immunological effects by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 152 (4): 433-443.

Matz, C. y Krone, P. 2007. Cell death, stress-responsive transgene activation, and deficits in the olfactory system of larval zebrafish following cadmium exposure. *Environmental Science & Technology*, 41 (14): 5143-5148.

McGeer, J.; Szebedinzy, C.; McDonald, D. y Wood, C. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50: 231-243.

McKin, J. y Benoit, D. 2000: Duration of toxicity test for establishing “no effect” concentration for copper with brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31: 449-452.



- Moura, M.; Farias, I. y Val, A. 1994. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Revista Brasileira de Pesquisas e Médicas Biológicas*, 27: 1589-1598.
- Nuñez, L. y Bouda, J. 2007. *Patología Clínica Veterinaria*. Universidad Autónoma de México. México.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- León, A. 2006. Efecto del cadmio sobre la fragilidad globular osmótica y el conteo de células sanguíneas del pez *Colossoma macropomum*, Curvier, 1818. Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Lewis, J.; Klein, G.; Walsh, P. y Currie, S. 2012. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) shift the age composition of circulating red blood cells towards a younger cohort when exposed to thermal stress. *Journal of Comparative Physiology B*, 10: 1007.
- Orlowski, C.; Piotrowski, J.; Subdys, J. y Gras, A. 1998. Urinary cadmium as indicator of renal cadmium in humans and autopsy study. *Human & Experimental Toxicology*, 17: 302-306.
- Padmini, E. 2010. Physiological adaptations of stressed fish to polluted environments: role of heat shock proteins. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 206: 1-27.
- Repetto, M. 1995. *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
- Sakairi, T.; Hiromura, K.; Yamashita, S.; Takeuchi, S.; Tomioka, M.; Ideura, H.; Maeshima, A.; Kaneko, Y.; Kuroiwa, T.; Nangaku, M.; Takeuchi, T. y Nojima, Y. 2007. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney International*, 72 (3): 307-318.
- Salazar, R. 2009. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (11): 1-15.
- Salazar, R.; León, A. y Lemus, M. 2009. Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. *Revista Científica*, 19 (1): 7-14.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1981. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Segunda edición. Freeman. San Francisco.
- Stachura, D. y Traver, D. 2011. Cellular dissection of zebrafish

- hematopoiesis. *Methods in cell biology*. Detrich, W; Westerfield, M y Zon, L. (eds). 101: 82.
- Snyder, M. y Rossi, S. 2004. Expresión de las proteínas de estrés familia de la (HSP70) en organismos bentónicos intermareales: el ejemplo de la *Anthopleura elegantissima* (Cnidarios: Antozoos). *Scientia*, 68 (1): 155-162.
- Superti, F. y Donelli, G. 1995. Characterization of Sa-11 rotavirus receptorial structures on human colon carcinoma cell line HT-29. *Journal of Medical Virology*, 47 (4): 421-428.
- Swiergosz, R.; Zakrzewska, M.; Sawicka, K.; Bacia, K. y Janowska, I. 1998. Accumulation of cadmium in and its effect on bank Vole tissues after chronic exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 130-136.
- Tavares, M; Ferreira, E; Ruas, F y Carneiro, P. 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27 (1): 43-48.
- Thophon, S.; Pokethitiyook, P.; Charlermwat, K.; Upatham, E. y Sahaphong, S. 2004. Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass, *Lateolabrax niloticus*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Toxicology*, 19 (1): 11-19.
- Useche, M. 2000. “El cultivo de la cachama, manejo y producción”. “UNET”. En línea: <<http://www.unet.edu.ve/frey/varios/dinv/piscicultura/cachama>>(16/07/2010).
- Vasques, M.; Alves, M.; De cerqueira, L. y Correa, L. 2010. Immunolocalization of heat shock proteins 27 and 47 during repair of induced oral ulcers. *Journal of Oral Science*, 52 (4): 623-631.
- Velmurugan, B.; Selvanayagam, M.; Cengiz, E. y Uysal, E. 2008. Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2 (6): 672–678.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Ponzano, E. y Blasco, J. 1981. Seasonal variation in the antioxidant defenses system and lipid peroxidation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100: 187-190.
- Walter, P.; Joshua, E.; Daniel, N.; James, W.; Aaron, B. y Atchison, W. 2009. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological Sciences*, 102 (2): 207–218.
- Zelikoff, J.; Bowser, D.; Squibb, K. y Frenkel, K. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: An alternative animal model for immunotoxicological

studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 45 (3): 253-448.

## Hoja de Metadatos

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	<b>Patrón De Proteínas En El Riñon Del Pez Dulce Acuicola Colossoma Macropomum Expuesto A Cadmio Y A Una Temperatura De 35°c</b>
---------------	--

#### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Cordero M., María C.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>16045801</b>
	<b>e-mail</b>	<b>mariacarolina998@gmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

<b><i>Colossoma macropomum</i></b>
<b>Cadmio</b>
<b>Temperatura</b>

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del cadmio, la temperatura de 35°C y la combinación de ambos (Cd/35°C) sobre el perfil de proteínas en el riñón de alevines del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*; así como comparar los posibles cambios en el patrón de proteínas del tejido expuesto a estas condiciones. Los peces fueron aclimatados durante 20 días antes de la realización de los ensayos. Posteriormente, se expusieron por 21 días a 0,01 mg/l de cloruro de cadmio y a 8 días a 35°C de temperatura y a Cd/35°C, una vez finalizada la exposición, se les tomó muestras de sangre para realizar los frotis sanguíneos y luego, fueron sacrificados y disectados para obtener el riñón para la realización del perfil de proteínas. La fracción citoplasmática del riñón se obtuvo por centrifugación diferencial y las proteínas fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE, reveladas y cuantificadas. Los resultados indicaron que la exposición a cadmio indujo algunos cambios en el comportamiento de los alevines, se evidenció una disminución en la alimentación, en la última semana del grupo expuesto a cadmio, a diferencia de los expuestos a 35°C y a Cd/35°C, quienes manifestaron cambios en la respuesta de huida y se observaron activos desde el primer día de exposición; el perfil electroforético reveló la inducción de una proteína de 49 kDa en los peces expuestos a cadmio; el grupo expuesto a Cd/35°C presentó un aumento significativo en la concentración de proteínas totales respecto al control. El recuento diferencial en sangre periférica, reveló un aumento en los reticulocitos de peces expuestos a 35°C y Cd/35°C. El cadmio induce la posible expresión de una proteína de choque térmico en el riñón de alevines de *C. macropomum*; la temperatura y el cadmio afectan la hematopoyesis en estos organismos.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Raquel Salazar</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>5855836</b>
	e-mail	<b>rsalazarlugo50@gmail.com</b>
	e-mail	
<b>Mairin Lemus</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>6429405</b>
	e-mail	<b>mlemus88@gmail.com</b>
	e-mail	
<b>América Vargas</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>9978150</b>
	e-mail	<b>americabelen2@yahoo.com</b>
	e-mail	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

<b>2012</b>	<b>07</b>	<b>13</b>
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

### Archivo(s):

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
<b>Tesis-CorderoMaria</b>	<b>Aplication /word</b>

### Alcance:

Espacial:(Opcional)

---

Temporal:

(Opcional)

---

**Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Bioanálisis**

**Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura**

**Área de Estudio: Bioanálisis**

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

Universidad de Oriente

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho


Estimado Profesor Martínez:


Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

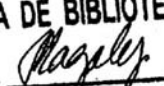
Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

  
**JUAN A. BOLANOS CUNELE**  
Secretario



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR   
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):**“Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.

