



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

EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA POBLACIÓN DE GRANULOCITOS, EN
SANGRE Y RIÑÓN CEFÁLICO DEL PEZ *Colossomamacropomum* (Curvier, 1818)
EXPUESTOS A CADMIO, COBRE Y DEPURADOS

(Modalidad: Tesis de Grado)

MARÍA DEL CARMEN ÁLVAREZ RODRÍGUEZ

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

Cumaná, 2013

EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA POBLACIÓN DE GRANULOCITOS, EN
SANGRE Y RIÑÓN CEFÁLICO DEL PEZ *Colossomamacropomum* (Curvier, 1818)
EXPUESTOS A CADMIO, COBRE Y DEPURADOS

APROBADO POR:

Dra. Raquel Salazar.
Asesora

Profa. Leida Marcano.
Jurado.

Profa. Mairin Lemus.

Jurado

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
Transporte y acondicionamiento	6
Bioensayos de exposición	6
Bioensayo de depuración	7
Obtención de las células inmunocompetentes.....	7
Identificación de células blancas	8
Método de coloración de May-Grumwald – Giemsa.....	8
Análisis estadístico.....	8
RESULTADOS	9
Morfologías celulares observadas en impronta de riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i>	9
Morfologías observadas en impronta de riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> expuesto a cadmio.....	9
Morfologías celulares observadas en impronta de riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> expuestos a cobre	12

Contaje de células de la serie blanca y rojas en riñón cefálico de <i>Colossoma macropomum</i> expuestos a cadmio y depurado.....	12
Contaje de células de la serie blanca y roja en riñón cefálico de <i>Colossoma macropomum</i> expuestos a cobre y depurados.....	15
Contaje de células sanguíneas en sangre periférica de peces <i>Colossoma macropomum</i> controles, expuestos a cadmio y depurados	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
HOJA DE METADATOS	28

DEDICATORIA

A mis padres Francisca y Cruz Ramón, me quedo sin palabras para expresar lo importante que son en mi vida mi más grande amor y mi esfuerzo es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios todopoderoso, la Virgen del Valle, por estar acompañándome siempre y darme fuerzas en los momentos que pude decaer.

Mi asesora de tesis, Dra. Raquel Salazar, por ayudarme a culminar con esta meta, por compartir conmigo sus conocimientos, por dedicarme su valioso tiempo, a usted eternamente agradecida.

Mis hijos Héctor, Adrián y Ángel, quienes han llenados mi vida de alegrías, ésto es para ustedes, los amo.

Mis hermanos Sandra, Cruz y Ana siempre han estado cuando los he necesitado, gracias

Ángel Vallenilla por sus palabras de apoyo cuando todo parecía estar mal, por estar siempre a mi lado y por el sentimiento que nos une.

Ing. Nelson Ruiz, a la Dra. Luz Marina Rojas, las licdas. Zuleika, Yvis, Sandra Álvarez, América Vargas, María Carolina, Licdo. Anibal Marcano y Luz Coronado, por haberme ayudado de diferentes maneras para la realización de este trabajo.

Mis compañeras de estudio y de trabajo, Martina, Alfreisa, Eranilde y Faricar por compartir buenos y malos momentos a lo largo de nuestro estudio.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Impronta de riñón cefálico control extraído del pez *Colossoma macropomum*. Los círculos señalan los centros granulopoyéticos y el cuadrado el centro eritropoyético. A. Detalle del parásito *Myxozoasp.* (Flecha) y (B) Detalle de granulocitos inmaduros (flecha delgada) y eritrocitos inmaduros (flecha gruesa) 400X..... 10
- Figura 2. Impronta de riñón cefálico extraído del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. Eritrocito con núcleo excéntrico (círculo), célula granulopoyética (cuadrado), células inmaduras de la línea eritropoyético (las flechas vacías) y células inmadura de la línea granulopoyética (la flecha oscura). A. Detalle de eritrocito con núcleo excéntrico. B. Detalle de célula inmadura granulopoyética hinchada. 400X..... 11
- Figura 3. Impronta de riñón cefálico extraído del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cobre. Los círculos enteros señalan células de la serie granulopoyética, el círculo punteado señala célula de la serie granulopoyética vacuolada, Parásitos del género *Myxozoa* (círculo de triple línea), células melanomacrófagas (cuadrados punteados), centro eritropoyético (cuadrado completo). A. Detalle señalando parásitos del género *Myxozoa*. B. Detalle señalando célula melanomacrófaga 400X..... 14

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie blanca medidos en riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cadmio durante 21 días y su posterior depuración de 21 días	13
Tabla 2. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie roja medidos en riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cadmio durante 21 días y su posterior depuración de 21 días	13
Tabla 3. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie blanca medidos en riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días.	15
Tabla 4. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie roja medidos en riñón cefálico del pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días	16
Tabla 5. Contajes de células/mm ³ de linfocitos en sangre periférica del pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cadmio y a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días	16
Tabla 6. Contajes de células/mm ³ de granulocitos en sangre periférica pez <i>Colossoma macropomum</i> , expuestos a cadmio y a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días	17

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la exposición a cadmio y a cobre sobre riñón cefálico y sangre del pez dulceacuícola *Colossomamacropomum*. Los organismos fueron aclimatados durante 15 días y posteriormente expuestos a una dosis de 1 ppm de cloruro de cadmio y 0,5 ppm de cloruro de cobre durante 21 días y fueron depurados de los metales durante 21 días. Se realizaron frotis sanguíneos a partir de muestras tomadas de peces antes de someterlos al tratamiento, finalizado el tratamiento y después de la depuración. Finalizados los 21 días de exposición se realizaron improntas del riñón cefálico. Los resultados del estudio indican que en *Colossomamacropomum* el riñón cefálico es un órgano principalmente hematopoyético, presentando agregados granulopoyéticos y eritropoyéticos bien definidos. Aunque ambos metales afectan tanto a las células eritropoyéticas como a las granulopoyéticas, se evidenció que el cadmio afecta los agregados de ambas series y produce los mayores cambios en la morfología de los precursores eritrocitarios; el cobre no disminuye los agregados hematopoyéticos pero sí produce cambios en la morfología de la serie granulopoyética; ambos metales disminuyen el porcentaje de células inmaduras del riñón cefálico. En sangre periférica, se observó disminución significativa de linfocitos y granulocitos en los peces expuestos a cadmio y a cobre. La depuración de 21 días no fue suficiente para la recuperación celular de estos peces. La disminución del conteo de las células leucocitarias, observada en los peces expuestos a cadmio y a cobre está en concordancia con la disminución de precursores leucocitarios en el riñón cefálico, órgano leucopoyético, y corrobora lo observado en estudios previos.

INTRODUCCIÓN

Las consecuencias del avance tecnológico, aplicado en las transformaciones que realiza el hombre buscando obtener mayores producciones en los procesos industriales, para satisfacer las necesidades ergonómicas, de alimentación, de salud, entre otros, han sido desbastadoras para la naturaleza, en los suelos, la atmósfera y aguas dulces y de mares, perjudicando así a todo tipo de especie presentes en estos ambientes, tanto vegetal como animal. El principal órgano hematopoyético de los peces es el riñón cefálico, el cual es el sitio de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos celulares involucrados en el sistema inmunológico (Ellis, 1976). Este órgano productor de anticuerpos contiene macrófagos que fagocitan los diferentes antígenos, componentes linfomiéloides, renales y endocrinos suplementados por la sangre de las arterias y de la vena porta caudal. Sirve como un análogo de la médula ósea, de los ganglios y en parte de la glándula adrenal de los vertebrados superiores (Blaxhall y Daisley, 1973).

Las células involucradas en la respuesta inmune son los leucocitos, que pueden encontrarse en tejido o en sangre. La clasificación de estas células en peces, al igual que la de los leucocitos de todos los vertebrados, se ha realizado por criterios morfológicos según los cuales se distinguen varios tipos: linfocitos, granulocitos, monocitos o macrófagos (Ellis, 1977). La cantidad de leucocitos totales circulantes en sangre de los peces es muy variable dependiendo de las especies o de las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, las cifras encontradas para trucha común se sitúan entre 2000 y 63000 leucocitos/mm³, mientras que en salmón coho, el promedio es de 44500 leucocitos/mm³ (Blaxhall y Daisley, 1973; Harbelle *et al.*, 1979).

En los teleósteos, los linfocitos son los leucocitos mayoritarios y representan el 70-90%, a nivel funcional, son responsables de la respuesta inmune específica humoral y celular. Los neutrófilos representan entre el 8 y 20% de las células leucocitarias; la liberación de éstos a la sangre se presenta como una respuesta inespecífica ante una amplia variedad de estímulos. Los monocitos y macrófagos, constituyen las principales células fagocíticas, por su capacidad de ingerir material extraño, inerte o antigénico, así como

restos celulares provenientes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos y representan entre 0,1 y 5% del total de células (Blazer, 1991; Enane *et al.*, 1993). Los eosinófilos y basófilos tienen funciones desconocidas y su existencia en peces aún está en discusión (García, 2004). Todos estos estudios demuestran la importancia del conocimiento de la morfología de las células sanguíneas en peces para determinar su estado de salud, el cual se puede alterar por cambios en su hábitat; ya que el desarrollo industrial está íntimamente ligado al desequilibrio ambiental, en especial de los ecosistemas acuáticos (Vargas *et al.*, 2009).

De igual forma, el estrés ambiental puede afectar la eficacia del sistema inmune en los peces, dependiendo del tipo de tóxico, la dosis, el tiempo de exposición, y las condiciones fisicoquímicas del agua, entre otros factores, provocando alteraciones fisiológicas que inhiben o retardan la respuesta inmunitaria; lo que traería como consecuencia, un aumento de la sensibilidad a microorganismos, ya sean bacterias, virus u hongos, incrementando el riesgo de contraer enfermedades infecciosas y produciéndose una disminución de las defensas (Anderson, 1990; Thompson *et al.*, 1993; Fournier *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que altas concentraciones de metales pesados como el cadmio, cobre o mercurio, tienen efecto inmunosupresor, constatado por el descenso de la actividad de macrófago y los niveles de lisozima (Fletcher, 1986) que en parte es producido por su efecto estresante, pero en parte por acción directa del contaminante (Elsasser *et al.*, 1986). También, dosis subletales de amoníaco, nitritos, cobre y cianuro aumentan la susceptibilidad a enfermedades como saprolegniosis, debido en parte a la inmunodepresión que inducen por estrés. El cobre induce un descenso de la respuesta inmune hormonal y celular (Carballo y Muñoz, 1991; Carballo *et al.*, 1995). Larsson *et al.* (1981) señalan que el cadmio causa variados efectos subletales en peces teleósteos, como fracturas y deformidad vertebral, daños testiculares, desarrollo defectuoso de óvulos, reducción del consumo de oxígeno por los tejidos branquiales, cambios patológicos en los tejidos renal e intestinal, efectos hematológicos y disturbios en el metabolismo de carbohidratos. Muchos de los efectos tóxicos en humanos (lesiones en

huesos y lesiones renales, anemia e hiperglucemia) son muy parecidos a los efectos del cadmio en otros mamíferos. Por otro lado, el metal cromo hexavalente es un metal potencialmente tóxico para los organismos acuáticos, carcinogénico para los mamíferos incluyendo al ser humano (Zweig *et al.*, 1999).

En relación a la situación de los metales pesados en las cuencas hidrográficas de Venezuela, el Ministerio del Ambiente en el Decreto n° 883, Gaceta Oficial N° 5.021, 1995, establece las normas para el control de calidad de los cuerpos de agua y de los vertidos o efluentes líquidos. En tal sentido señala, para las aguas de los sub-tipo 1 y 2, que corresponden a los ríos (Orinoco, Caroní, Manzanares, etc.), que las mismas no deberán exceder de los siguientes límites: cobre; 1,0 mg/l y 0,20 mg/l; cadmio 0,01 mg/l y 0,0005 mg/l, respectivamente. En el país se han realizado diferentes evaluaciones en cuencas altamente impactadas, destacando los estudios de Gamboa y Bonilla (1983), en sedimentos de la cuenca Tuy, quienes reportaron elevadas concentraciones de Mn, Cu y Zn en la zona costera influenciada por el río Neverí. Más recientemente, Fermín, (2002) evaluó el contenido de cobre y cadmio total en sedimento de la laguna de Unare, estado Anzoátegui, encontrando concentraciones de cobre que oscilaron entre 22,26 µg/g y 48,92 µg/g con un promedio de 36,31 µg/g y de cadmio obtuvo niveles máximos de 0,350 µg/g con un promedio 0,112 µg/g. García (2004) reportaron concentraciones de cobre en sedimentos superficial del río Orinoco de 0,123 µg/g a 3,987 µg/g. Vaquero *et al.* (2004) evaluaron la concentración de cobre y cadmio en aguas del río Tigre, estado Anzoátegui y reportaron valores de $Cu \leq 118,8 \mu\text{g/l}$, $Cd \leq 11,6 \mu\text{g/l}$ y en sedimento reportaron valores de $Cu \leq 115 \mu\text{g/g}$ y $Cd \leq 20 \mu\text{g/g}$. Los resultados antes expuestos demuestran que algunos ríos venezolanos no cumplen con las normas establecidas por el Ministerio del Ambiente.

Con respecto a trabajos donde se consideraron los parámetros hematológicos e inmunológicos en peces expuestos a tóxicos ambientales, se destacan los realizados por Barroso (1996), quien evaluó las respuestas inmunológicas y hematológicas del pez *Hypostamus watwata* inducido por exposición a xenobióticos; el estudio de Blanco *et al.* (2004), quienes evaluaron las respuestas hematológicas e inmunológicas en

Colossomamacropomum, expuesto a cadmio; García (2004), quienes analizaron las respuestas hematológicas e inmunológicas y el perfil de proteínas séricas en *Colossomamacropomum* expuesto a concentraciones subletales de cobre y el trabajo de Salazar *et al.* (2006), demostraron que el cobre actúa como estresor afectando la capacidad de muerte bacteriana inducida por polimorfonucleares de *Colossomamacropomum* expuestos a dosis sub letal de dicho metal. En esta misma línea de investigación, pero en animales invertebrados, destacan los trabajos realizados por Salazar (1993); Córdova (1995); Marcano *et al.* (1997); Salazar *et al.* (1997); Martínez (1998); Nussett *et al.* (1998); Zapata *et al.* (2005) relacionados con la sensibilidad de pruebas inmunológicas en el poliqueto *Eurythoecomplanata*. De igual forma, se señala el estudio de Nussett *et al.* (2004) en el cual se evaluaron las respuestas inmunológicas y las actividades de las enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctadaimbricata*, expuesta al Fuel oil N° 6. También Marcano *et al.* (2006) usó inmunoensayo en el pez sapo (*Thalassophryne maculosa*) para evaluar efectos del Fuel oil N. 6.

La especie escogida para este estudio, *Colossomamacropomum* (Cuvier 1818), es conocida en Venezuela con el nombre de cachama, pertenece a la familia Characidae, se encuentra en aguas con rangos de temperaturas de 23 - 30°C; en ambiente natural son omnívoros, con tendencia a frugívoros- herbívoros y buenos consumidores de semillas (Arias y Vásquez, 1998) y es una de las especies de peces de agua dulce más importantes desde el punto de vista comercial, en especial, si se considera el gran potencial que tiene para su cultivo, puesto que presenta resistencia a enfermedades y manipulación (Bermúdez y Madrid, 1982), así como también al manejo en cautiverio. Presenta alta docilidad y rusticidad y es de fácil adaptación a condiciones limnológicas desfavorables por períodos no prolongados. Puede soportar un amplio rango de pH y baja concentración de oxígeno, por lo que puede vivir en diferentes ambientes incluyendo, contaminados (Bermúdez y Madrid, 1982; Useche, 2000) lo que constituye un mayor potencial productivo y reproductivo, para la piscicultura extensiva, semi-intensiva e intensiva en aguas continentales de los países que integran la gran cuenca amazónica (Perdomo *et al.*, 2002).

Este pez se encuentra distribuido en toda Sudamérica, desde la cuenca del río Orinoco (Mago, 1970) hasta la cuenca del Amazonas (Eigermman, 1975). En Venezuela, está localizado en los ríos Guanare, Apure, Caroní, Portuguesa y Orinoco donde forma parte del potencial pesquero de la zona; se caracteriza por presentar un solo período reproductivo al año, sincronizado con el comienzo de la época de lluvia y puede llegar a alcanzar en su estado adulto casi 1 metro de largo y pesar hasta 18 kilogramos (Machado, 1992).

En el laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad de la Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, se desarrollan pruebas bioquímicas e inmunológicas, con la finalidad de elaborar un protocolo de pruebas que permitan evaluar el estado de salud del pez, ya sea en condiciones naturales o de cultivo; de allí que el conocimiento de la morfología y citoquímica de las células sanguíneas ayudaría a interpretar los posibles cambios que sobre estos tipos celulares pudiesen causar los tóxicos a los cuales el organismo es expuesto. Por todo lo antes planteado, resulta evidente que un aspecto que debe continuar en estudio en la cachama es la morfología y citoquímica de las células inmunocompetentes, de las cuales no se tiene suficiente información en la literatura.

Este trabajo de investigación se realizó con el fin de evaluar los cambios en la población de granulocitos, en sangre y riñón cefálico de peces *Colossomamacropomum* expuestos a cadmio, a cobre y depurados.

METODOLOGÍA

Ejemplares juveniles de *Colossomamacropomum*(Curvier, 1818), cuyos índices biométricos oscilaron entre $16,7 \pm 1,2$ cm de longitud y $94,4 \pm 22,4$ g de peso fueron recolectados en lagunas artificiales de reproducción capturados con red de 5 mm de abertura de malla y en algunas ocasiones con salabardos, provistos por la piscicultura ALMA C.A (ALMACA) ubicada en la carretera nacional Cantaura-Aguasay, Campo Mata, Distrito Freites del estado Anzoátegui, Venezuela.

Transporte y acondicionamiento

Los ejemplares fueron trasladados vivos en bolsas de polietileno con oxígeno hasta el Laboratorio de Camarones Dulceacuícola, en el Departamento de Biología, situado en la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, mantenidos, para su aclimatación, por un lapso de dos semanas. Los peces, aún en las bolsas, fueron colocados dentro de un estanque por un tiempo aproximado de 30 minutos; transcurrido este tiempo, fueron liberados de las bolsas y colocados directamente en el estanque. Para prevenir infecciones bacterianas y fúngicas se le agregó al agua una (1) cápsula de cloranfenicol y 1 ml de solución antifúngica veterinaria comercial (Blanco *et al.*, 2004). La temperatura se mantuvo entre $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperíodos de 12/12 horas; los peces fueron alimentados todas las mañanas *ad libitum* con alimento comercial “cachamarina”, antes de efectuar el recambio del agua. La limpieza y recambio del agua se realizó diariamente, eliminando los desechos por succión con mangueras y recambiando el 70% del volumen total del agua del estanque.

Bioensayos de exposición

Como concentraciones subletales se seleccionaron dosis de 1 mg Cd /l y 0,5 mg Cu /l basado en el ensayo de concentración letal media (LC_{50}) a 96 horas, calculado previamente por Blanco *et al.* (2004) y García (2004). Se seleccionaron 48 ejemplares de *Colossomamacropomum*, distribuidos en 6 grupos de lotes homogéneos de 8 ejemplares de ambos sexos y tallas similares con sus respectivas réplicas, los cuales fueron colocados en acuarios de vidrio con capacidad de 60 litros con agua declorada y aireación continua. El ensayo subletal se distribuyó de la siguiente manera: grupo 1

(control y réplica). Este grupo fue colocado bajo las mismas condiciones y distribuido similarmente, sin estar en contacto con los metales; grupo 2, expuesto a una concentración de cadmio de 1 ppm y su réplica; grupo 3 expuestos a una concentración de 0,5 ppm Cu y su réplica. Los grupos 2 y 3 estuvieron expuestos a los metales durante 21 días. A los peces de los tres grupos experimentales se les suministró alimento diariamente después del recambio de agua y metales durante 21 días. La iluminación artificial fue reducida envolviendo los acuarios con bolsas plásticas negras para no alterar el comportamiento de los peces.

La concentración requerida de cloruro de cadmio pentahidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se preparó a partir de una solución madre y, en el momento del recambio del agua, se agregó, a los acuarios de capacidad de 60 litros, un volumen de 50 ml de $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para alcanzar una concentración final de 1mg/l del metal en el agua. La concentración requerida de cloruro de cobre pentahidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se preparó a partir de una solución madre y en el momento del recambio del agua, se agregaron 25 ml de $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para alcanzar una concentración final de 0,5mg/l del metal en el agua. Los acuarios fueron cubiertos con papel envoplast para evitar evaporación continua del agua y por ende un aumento en la concentración nominal de los metales.

Bioensayo de depuración

Finalizada la exposición de los peces a los metales, se procedió a la depuración del 50% de la población durante los siguientes 21 días. Para tal fin, se colocaron los peces en acuarios limpios con agua declorada y aireación continua y se alimentaron como se señaló arriba, igualmente la limpieza y recambio del agua se realizó como se describió anteriormente.

Obtención de las células inmunocompetentes

Las células inmunocompetentes fueron extraídas de sangre periférica y de riñón cefálico. Las muestras de sangre fueron tomadas haciendo uso de la técnica de punción caudal, descrita por Blanco *etal.* (2004) y García (2004), utilizando para ello jeringas desechables de 3 ml y colectadas, individualmente en tubos de ensayo rotulados y previamente heparinizados. Seguidamente, los peces fueron disectados para obtener

cuidadosamente el riñón cefálico. Estos órganos fueron debidamente identificados e inmediatamente procesado para la obtención de las improntas, la cual consistió en hacer presión del riñón con la lámina portaobjeto.

Identificación de células blancas

Para la identificación de células sanguíneas, se realizaron frotis de sangre fresca, los cuales fueron coloreados con dos métodos de coloración a saber:

Método de coloración de May-Grumwald – Giemsa

El extendido se fijó con metanol absoluto y se dejó secar al aire, luego se agregaron 15 gotas de colorantes de Giemsa y se dejó actuar durante dos minutos. Posteriormente, se lavó con agua destilada, se secó al aire y se procedió a realizar el recuento diferencial en línea, en el cual se recorrió el frotis en sentido longitudinal, desde el extremo más grueso hasta el extremo más fino de la lámina, contando y diferenciando las células observadas consecutivamente en un total de 100 células, empleando el microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre los tejidos evaluados (sangre y riñón) tanto en controles como en expuestos y depurados de cadmio y cobre, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para determinar las posibles diferencias significativas entre los tratamientos. El ANOVA fue seguido de una prueba a posteriori SNK (StudentNewmanKeuls) para determinar cuál de los metales produjo más daños en los peces expuestos (Sokal y Rohlf, 1980).

RESULTADOS

Morfologías celulares observadas en impronta de riñón cefálico del pez *Colossomamacropomum*

La impronta de riñón cefálico control muestra un tejido heterogéneo, en el cual se observan grupos de células con características morfológicas que sugieren que son granulocitos en diferentes estadios de diferenciación; estas células se encuentran agregadas formando centros granulopoyéticos. Igualmente se observan células con características morfológicas de precursores eritroides las cuales se encuentran agrupadas en centros eritropoyéticos definidos (figura 1). Se observó que hay predominio de células inmaduras, las cuales se caracterizan por ser de tamaño prominente con núcleo laxo (figura 1A). Es de hacer notar que en las improntas de riñón cefálico de los peces evaluados tanto en controles como en los peces expuestos se observaron células con núcleo lobulado, que de acuerdo a la literatura son parásitos del género *Myxozoa*, que han sido observados en éste y otros tejidos por otros autores en esta especie (Tavares-Díaz *et al.*, 2006) (figura 1).

Morfologías observadas en impronta de riñón cefálico del pez *Colossomamacropomum* expuesto a cadmio.

En la impronta de riñón cefálico de *Colossomamacropomum* expuesto a cadmio, se observó disminución en el número de células en comparación con lo observado en la impronta del control. Los agregados hematopoyéticos (tanto granulocíticos como eritrocíticos) se observan escasos y, cuando se observan los grupos de células en estos centros, se presentan con características morfológicas que indican algún tipo de daño celular. Las características de daño celular más resaltantes de los precursores granulopoyéticos son vacuolización e hinchamiento (figura 2A). Los precursores eritropoyéticos presentan como característica más resaltante la presencia de núcleos con bordes irregulares, excéntrico y citoplasma vacuolado (figura 2B). Al igual que en los controles se observaron parásitos del género *Myxozoa*. Cuando se cuentan estos parásitos se observa que la cantidad de parásitos es similar a las observadas en el control.

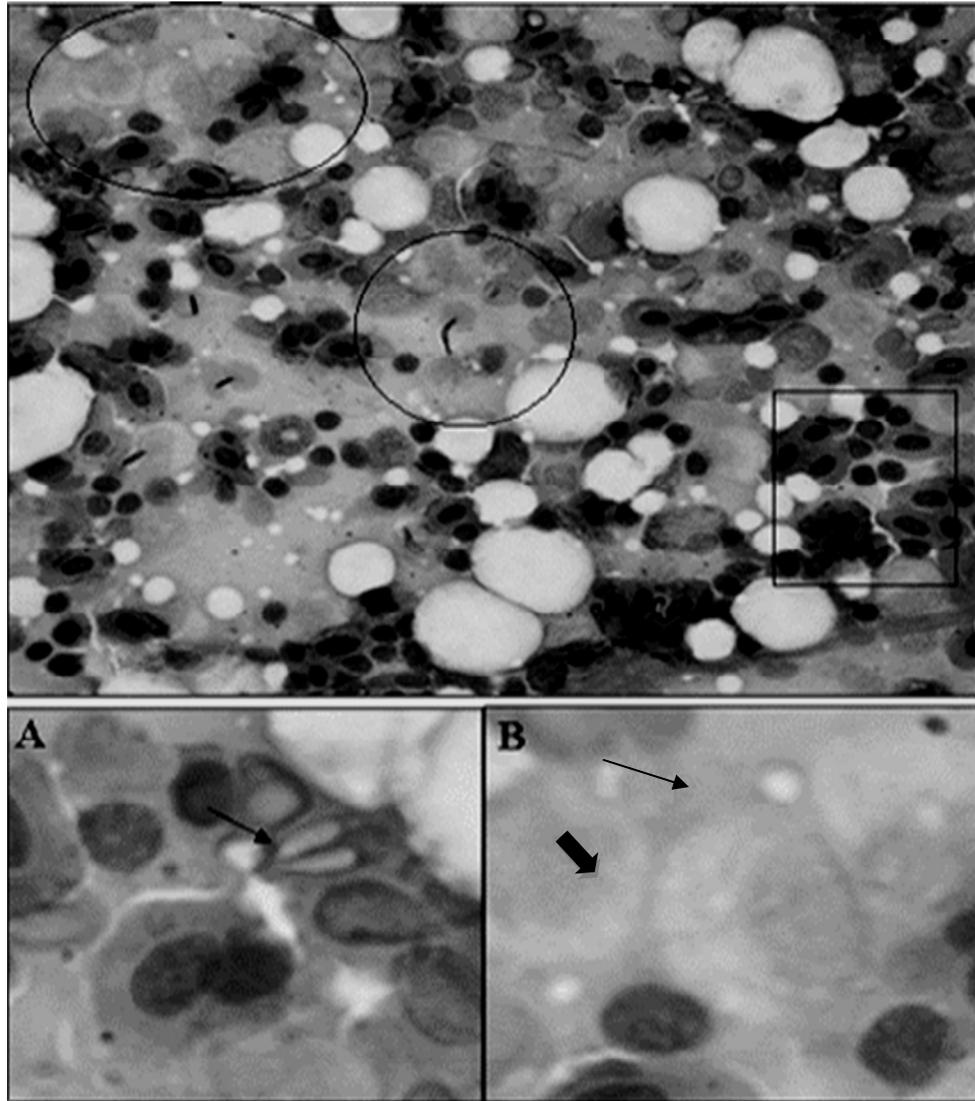


Figura 1. Impronta de riñón cefálico control extraído del pez *Colossomacropomum*. Los círculos señalan los centros granulopoyéticos y el cuadrado el centro eritropoyético. A. Detalle del parásito *Myxozoasp*. (Flecha) y (B) Detalle de granulocitos inmaduros (flecha delgada) y eritrocitos inmaduros (flecha gruesa) 400X.

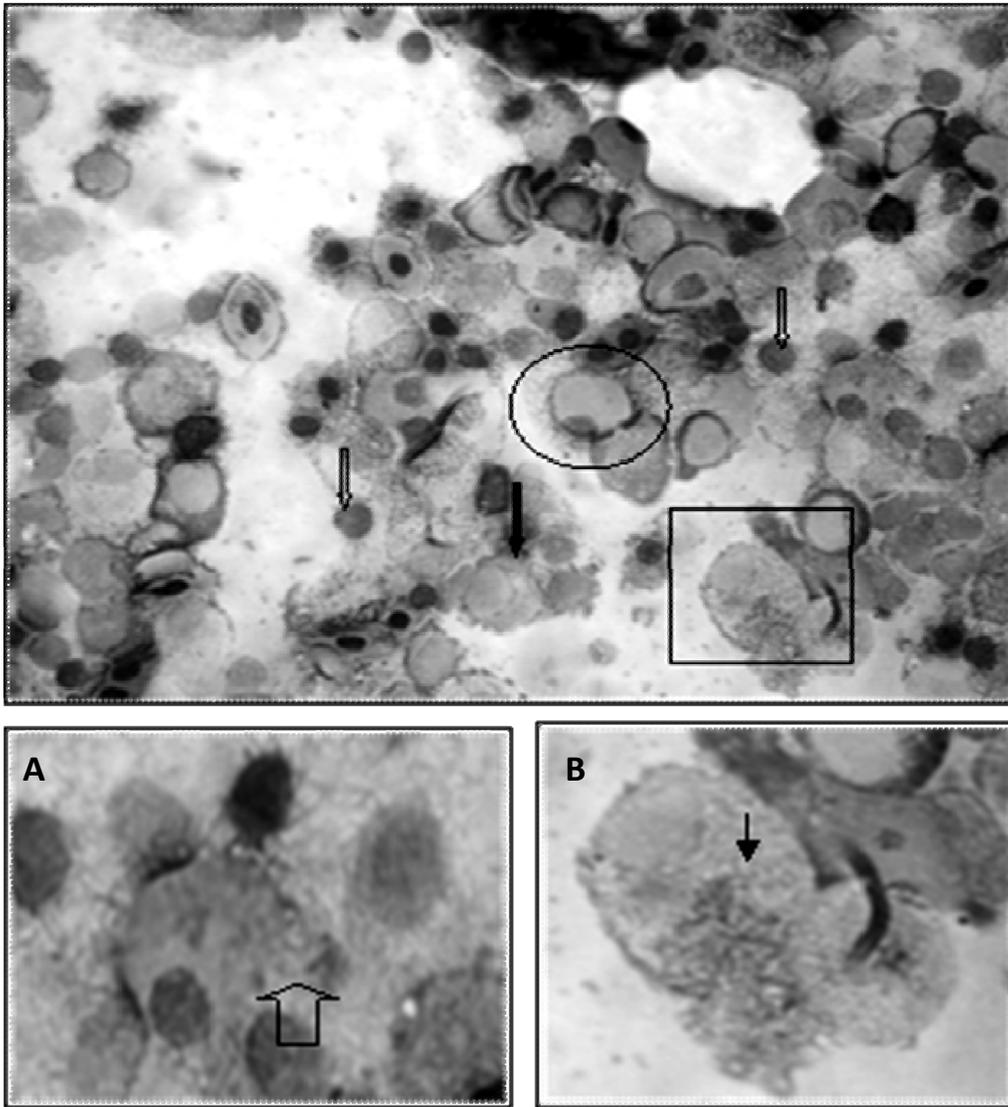


Figura 2. Impronta de riñón cefálico extraído del pez *Colossomamacropomum* expuesto a cadmio. Eritrocito con núcleo excéntrico (círculo), célula granulopoyética (cuadrado), células inmaduras de la línea eritropoyética (las flechas vacías) y célula inmadura de la línea granulopoyética (la flecha oscura). A. Detalle de eritrocito con núcleo excéntrico. B. Detalle de célula inmadura granulopoyética hinchada. 400X

Morfologías celulares observadas en impronta de riñón cefálico del pez

***Colossomamacropomum* expuestos a cobre**

En la impronta de riñón cefálico de peces expuestos a cobre, se observaron agregados granulopoyéticos y eritropoyéticos organizados, se observaron melanomacrófagos en mayor cantidad que en la impronta de peces controles (figura 3). A diferencia de la impronta de peces expuestos a cadmio, se observó un incremento de parásitos del género *Myxozoa*, presentándose de 2 – 3 parásitos por campo (figura 3A). Los precursores granulopoyéticos presentaron vacuolización severa y núcleos totalmente laxos, indicativos de severo daño celular (figura 3). Los precursores eritrocitarios no presentaron cambios conspicuos diferentes a la de los peces controles.

Contaje de células de la serie blanca y rojas en riñón cefálico de

***Colossomamacropomum* expuestos a cadmio y depurado**

Cuando se contaron las células precursoras hematopoyéticas de la serie inmadura blanca, provenientes de riñón cefálico de *Colossomamacropomum*, se observó que los peces controles presentaron el $75,40 \pm 3,04\%$ del total de las células inmaduras observadas. En los peces expuestos a cadmio estas células representaron $70,02 \pm 2,62\%$ del total de células contadas; en los peces sometidos al proceso de depuración, estas células representaron el $70,00 \pm 2,40\%$. El análisis estadístico determinó que existían diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los porcentajes de células observados en los tres grupos evaluados. La prueba *a posteriori* determinó que se formaron dos grupos, uno entre los controles y otro entre los expuesto y depurados. Presentándose los menores valores en los peces expuestos a cadmio y los depurados (tabla 1).

En la serie eritrocitaria los peces controles tuvieron un $81,10 \pm 2,60\%$ del total de eritrocitos inmaduros. En los peces expuestos a cadmio se evidenció un $75,80 \pm 4,10\%$ de células y para el grupo en depuración se evidenció $73,30 \pm 4,10\%$ de las mismas, indicando una disminución significativa de estos precursores en los grupos ($p < 0,001$). La prueba *a posteriori* determinó que se formaron dos grupos, uno entre los controles y otro de los peces expuestos a cadmio y los depurados. Estando el menor porcentaje de

células en el grupo de los expuestos y depurados (tabla 2). Las células maduras de la serie roja se observaron en menor porcentaje (tabla 2).

Tabla1. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie blanca medidos en riñón cefálico del pez *Colossomamacropomum*, expuestos a cadmio durante 21 días y su posterior depuración de 21 días

% Células de la serie granulopoyética	% controles	% Expuestos a Cadmio	% depurados
Inmaduras	75,40 ± 3,04	70,02 ± 2,62	70,00 ± 2,40
Maduras	24,60 ± 2,90	29,70 ± 2,60	30,00 ± 2,46

Tabla 2. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie roja medidos en riñón cefálico del pez *Colossomamacropomum*, expuestos a cadmio durante 21 días y su posterior depuración de 21 días

% Células de la serie eritropoyética	% controles	% Expuestos a Cadmio	% depurados
Inmaduras	81,00 ± 2,60	75,80 ± 4,10	73,30 ± 4,10
Maduras	18,80 ± 2,60	24,40 ± 4,36	26,50 ± 4,30

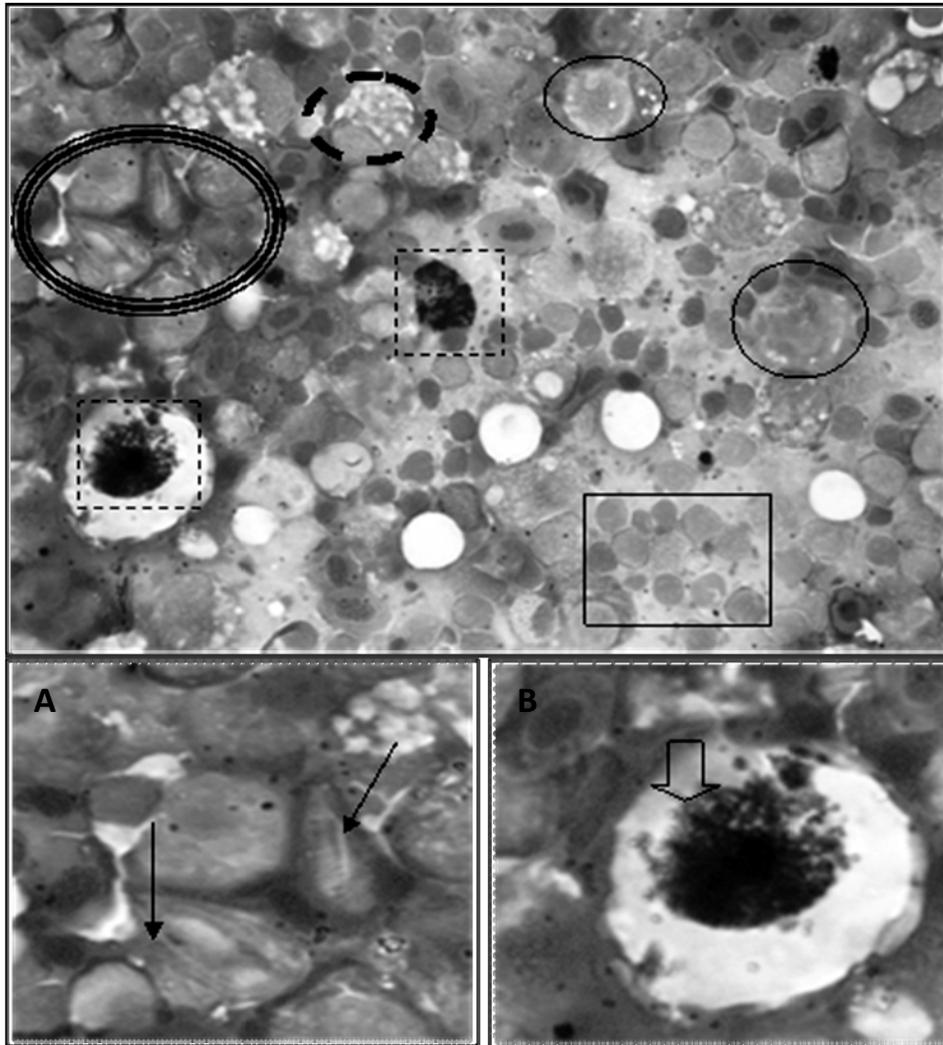


Figura 3. Imprinta de riñón cefálico extraído del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cobre. Los círculos enteros señalan células de la serie granulopoyética, el círculo punteado señala célula de la serie granulopoyética vacuolada, Parásitos del género *Myxozoa* (círculo de triple línea), células melanomacrófagas (cuadrados punteados), centro eritropoyético (cuadrado completo). A. Detalle señalando parásitos del género *Myxozoa*. B. Detalle señalando célula melanomacrófaga 400X.

Contaje de células de la serie blanca y roja en riñón cefálico de *Colossoma macropomum* expuestos a cobre y depurados

Cuando se contaron las células precursoras hematopoyéticas de la serie blanca inmaduras y maduras de *Colossoma macropomum* expuestos a cobre y depurados de cobre, se observó que los peces controles presentaron el $75,40 \pm 3,00$ % del total de las células inmaduras. En los peces expuestos a cobre estas células representaron $71,00 \pm 2,80$ % del total de las células contadas y en los peces sometidos al proceso de depuración, estas células representaron el $69,20 \pm 2,00$ %. El análisis estadístico determinó que existían diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los porcentajes de células observados en los tres grupos evaluados. La prueba *a posteriori* determinó que se formaron dos grupos; uno entre los controles y otro entre en los expuestos y depurados. Presentándose los menores valores en los peces expuestos a cobre y depurados (tabla 3). Las células maduras se presentaron en menor proporción tal y como se puede observar en la tabla 3.

Cuando se contaron las células precursoras hematopoyéticas de la serie roja inmaduras y maduras de *Colossoma macropomum* expuestos a cobre y depurados de cobre, se observó que los peces controles presentaron el $81,10 \pm 2,60$ % del total de las células inmaduras. En los peces expuestos a cobre estas células representaron $80,90 \pm 2,50$ % del total de las células contadas y en los peces sometidos al proceso de depuración, estas células representaron el $79,50 \pm 2,50$ %. El análisis estadístico determinó que no existían diferencias significativas entre los grupos evaluados (tabla 4). Las células maduras se presentaron en menor proporción tal y como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 3. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie blanca medidos en riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum*, expuestos a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días.

% Células de la serie granulopoyética	% controles	% Expuestos a Cobre	% depurados
Inmaduras	$75,40 \pm 3,04$	$71,03 \pm 2,80$	$69,20 \pm 2,05$
Maduras	$24,60 \pm 2,90$	$28,90 \pm 2,80$	$30,07 \pm 2,05$

Tabla 4. Porcentajes de células inmaduras y maduras de la serie roja medidos en riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum*, expuestos a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días

% Células de la serie eritropoyética	% controles	% Expuestos a Cobre	% depurados
Inmaduras	81,00 ± 2,60	80,90 ± 2,50	79,50 ± 2,50
Maduras	18,80 ± 2,60	19,70 ± 2,50	20,50 ± 2,50

Contaje de células sanguíneas en sangre periférica de peces *Colossoma macropomum* controles, expuestos a cadmio y depurados

El contaje de linfocitos en sangre periférica de los peces controles y expuestos a cadmio y a cobre, indicaron que los peces controles presentaron 2353,00 ±48,70cels/mm³ del total de las células observadas. En los peces expuestos a cadmio los valores de linfocitos obtenidos 1065,00 ±23,00cels/mm³ y las expuestas a cobre 945,60 ±15,80cels/mm³ observándose que estos contajes disminuyeron significativamente en comparación con el contaje de los peces controles (tabla 5).

En el contaje de granulocitos en sangre periférica de los peces controles y expuestos a cadmio y a cobre, indicaron que los peces controles presentaron 992,00 ±63,60cels/mm³ del total de las células observadas. En los peces expuestos a cadmio los valores de granulocitos obtenidos fue de 465,00 ±24,40cels/mm³ y las expuestas a cobre de 432,00 ±18,20cels/mm³, observándose que esto contajes disminuyeron significativamente en comparación con el contaje de los peces controles (tabla 6).

Tabla 5. Contajes de células/mm³ de linfocitos en sangre periférica del pez *Colossoma macropomum*, expuestos a cadmio y a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días

Tratamiento	Contaje de linfocitos cel/ mm ³
Control	2353,00 ± 48,70
Cadmio	1065,00 ± 21,62
Cobre	945,60 ± 15,84

Tabla 6. Contajes de células/mm³ de granulocitos en sangre periférica pez *Colossoma macropomum*, expuestos a cadmio y a cobre durante 21 días y su posterior depuración de 21 días

Tratamiento	Contaje de granulocitos cel/ mm ³
Control	992,00 ± 63,68
Cadmio	465,00 ± 24,40
Cobre	432,00 ± 18,28

DISCUSIÓN

Las células hematopoyéticas en riñón cefálico de *Colossoma macropomum* se encuentran agrupadas en agregados eritropoyéticos y granulopoyéticos con características morfológicas de diferentes estadios de diferenciación, representando las células inmaduras entre 70-80% del total de células observadas; no se observaron morfologías indicativas de tejido renal, lo que indica que el riñón cefálico en este pez es un órgano, de carácter hematopoyético.

Un rasgo característico observado en las improntas de riñón cefálico de *Colossoma macropomum*, fue la presencia de parásitos del género *Myxozoa* que fue descrito por Tavares-Días *et al.* (2006) en la piel y branquias de este pez y últimamente, lo reporta en sangre e hígado de esta misma especie Bossio *et al.* (2009). Tavares-Días *et al.* (2006) puntualiza que dichos parásitos no afectan la salud del pez; sin embargo, Laterca *et al.* (1996), han descrito estos parásitos como responsables de producir enfermedad, su afirmación está basada en observaciones realizadas a las branquias de los peces *Piaractus mesopotamicus* y *Colossoma macropomum* las cuales se encontraban invadidas por parásitos de este género lo cual indujo alteraciones, formando quistes, y estos produjeron congestión, edema y desprendimiento del epitelio respiratorio.

La exposición a cadmio afectó los centros hematopoyéticos (granulocitarios y eritrocitarios) en el riñón cefálico. Los hallazgos encontrados en esta investigación, corroboran la hipótesis de Marcano *et al.* (2011), de que el cadmio afecta los centros hematopoyéticos de *Colossoma macropomum*.

En peces, la citotoxicidad del cadmio está bien documentada; por ejemplo, en el pez *Oreochromis mossambicus* expuesto a cadmio, se ha observado a nivel hepático vacuolización de hepatocitos, hialinización e inflamación; igualmente en el pez *Dicentrarchus labrax*, la exposición a cadmio, induce a nivel del túbulo proximal del riñón la presencia de cuerpos mieloides, vacuolización citoplasmática y dilatación de la envoltura nuclear; en el tejido renal pez *Centropomus undecimalis* se observó una condensación e hinchazón masiva de las mitocondrias, degeneración nuclear,

vesiculación y fragmentación del retículo endoplasmático rugoso, presencia de grandes vacuolas y lisosomas hidrópicos por exposición a este metal (Thophonet *al.*, 2004; Giariet *al.*, 2006). Sin embargo, cambios en precursores hematopoyéticos a nivel de riñón cefálico no han sido reportados en peces.

Las alteraciones en las células del riñón cefálico observadas en el pez *Colossoma macropomum*, son indicativas de la citotoxicidad del cadmio, la cual se ha demostrado inhibe la actividad de las enzimas responsables del mantenimiento de la integridad celular (Gunn y Gould, 1970; Gabbianiet *al.*, 1974; Fende y Niewenhuis, 1977; Aoki y Hoffer, 1978).

A diferencia de lo observado para los peces expuestos a cadmio, la exposición a cobre no disminuyó los agregados granulopoyéticos y eritropoyéticos pero si produjo efecto sobre la morfología celular, observándose vacuolización en el citoplasma, núcleos laxo, indicativos de daño celular y sugiriendo que el cobre, a pesar de que es un metal esencial, a las dosis empleadas en el estudio, puede actuar como un metal inmunotóxico.

Esta afirmación es corroborada al encontrar que en las improntas de los peces expuestos a cobre se visualizó un incremento en el número de parásitos del genero *Myxozooy* también en el número de melanomacrófagos, los cuales se localizan cercanos a los sitios donde se encontraron estos parásitos. Los melanomacrófagos, son agregados celulares que han transformado en melanina el material fagocitado (Lamers y Parmentier, 1985).

Los melanomacrófagos se distribuyen homogéneamente en todo el tejido esplénico y renal, por lo que algunos sugieren que están relacionados con el sistema vascular y, que la entrada de los productos que acumulan, se produce vía sanguínea (Herraez y Zapata, 1986; Ziengenfuss y Wolke, 1991). Las células fagocíticas, principalmente los macrófagos, migran desde los elipsoides esplénicos del bazo o sinusoides del riñón donde realizan la fagocitosis hasta alcanzar los centros melanomacrófagos (CMMs) o formar unos nuevos (Ziengenfussy Wolke, 1991). Su cercanía con los sitios de proliferación del parásito *Myxozoa* sugiere que está en curso una parasitemia, a lo cual el sistema inmune del pez reacciona con la proliferación de melanomacrófagos, para tratar

de combatir y evitar el daño inducido por el parásito. Esto sugiere que existen ciertos niveles de parásitos que son tolerados por el sistema inmune del pez, pero un incremento en su número activa al sistema inmune para detener la proliferación que pueden comprometer la vida del pez. Esta hipótesis debe ser revisada en profundidad.

Las infecciones provocadas por parásitos del género *Myxozoa*, (*Myxobolidae*) causan patologías que pueden ser responsables de importantes mortandades en cultivos intensivos y semintensivos (Dykova y Lom, 1978; Duhamel *et al.*, 1986). Laterca *et al.* (1996), observaron que las branquias de los peces *Piaractus mesopotamicus* y *Colossoma macropomum* se encontraban fagocitadas por parásitos del género *Myxozoa*, ocasionándoles alteraciones a nivel de éstas, formando quistes, lo cual conlleva a una congestión, edema y desprendimiento del epitelio respiratorio. Se ha demostrado que los melanomacrófagos pueden ingerir material extraño, actuar como “limpiador” celular, producir melanina y ser aplicado como biomarcador histopatológico de contaminación (Loumbourdis, 2007). Se ha propuesto que estas células son activadas por diversos contaminantes entre ellos metales (Mcgraw, 2003).

Aunque el cobre es un elemento esencial, está ampliamente documentado que ejerce un efecto inmunosupresor en peces cuando sus concentraciones sobrepasan las normales, lo cual podría incidir en el aumento a la susceptibilidad a infecciones de estos organismos; este hecho es relevante tanto en las especies en ambientes naturales como los usados en acuicultura (Carballo *et al.*, 1975). El cobre es tóxico y potencialmente carcinogénico. Por tal motivo, la Environmental Pollution Agency (E.P.A) establece como límite máximo una concentración de 6,50 µg Cu/l presente en los ríos, con una dureza del agua de 50 mg/l. Es ampliamente conocido que el cobre ejerce sus efectos tóxicos a nivel celular, en parte, a través de la inducción del estrés oxidativo porque produce un descenso de la respuesta inmune humoral y celular, incluyendo el nivel de linfocitos circulantes y la respuesta fagocíticas aguda (Carballo y Muñoz, 1991; Carballo *et al.*, 1995).

El efecto inmunosupresor, tanto del cobre como del cadmio, se manifiesta en la disminución en el número de precursores granulopoyéticos, este daño va a depender de

la concentración y el tiempo de exposición a dichos metales. La depuración, durante 21 días, no fue suficiente para permitir la recuperación del número total de células de los organismos previamente expuestos a ambos metales, coincidiendo con los resultados de Vargas *et al.* (2009) en leucocitos de sangre periférica de peces expuestos a cadmio y a cobre.

La serie eritropoyética fue más afectada por el cadmio que por el cobre, pudiendo deberse a la dinámica de acumulación de ambos metales por el organismo y a la función ejercida por el cobre, que como metal esencial, tiene vías para su metabolización adecuada por el organismo (Handy 2003).

Esto podría explicar el hecho de que los peces expuestos a cobre mostraron mejor recuperación que los expuestos a cadmio. Caso contrario ocurre con el cadmio, que por ser un metal tóxico se acumula en riñones, hígado y sangre y, dependiendo de la concentración y tiempo de exposición, puede dañar la función renal (Ramírez, 2002).

La disminución del conteo de las células leucocitarias, observada en los peces expuestos a cadmio, está en concordancia con la disminución de precursores leucocitarios en el riñón cefálico, órgano leucopoyético y corrobora lo observado en estudios previos (Matty, 1985; Fletcher, 1986; Hernández, 2005; Vargas *et al.*, 2009). Igualmente, el descenso de estos parámetros en los peces expuestos a cobre está en concordancia con lo observado en riñón cefálico, y coincide con lo reportado por García (2004). Los resultados del presente estudio sugieren que aunque el cobre y el cadmio son metales inmunotóxicos, su mecanismo de acción, a nivel de los precursores hematopoyéticos parece seguir vías diferentes.

CONCLUSIONES

El efecto inmunosupresor, tanto del cobre como del cadmio en el pez *Colossoma macropomum*, se manifiesta en la disminución en el número de precursores granulopoyéticos.

La serie eritropoyética fue más afectada por el cadmio que por el cobre, pudiendo deberse a la dinámica de acumulación de ambos metales por el organismo.

A diferencia de lo observado para los peces expuestos a cadmio, la exposición a cobre no disminuyó los agregados granulopoyéticos y eritropoyéticos del riñón cefálico, pero sí produjo efecto sobre la morfología celular, observándose vacuolización en el citoplasma, núcleos laxos, indicativos de daño celular.

El hecho de no restablecerse las variables medidas es indicativo de que no hubo depuración probablemente.

En el riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum*, se observaron parásitos del género *Myxozoa* en los controles, expuestos a cadmio y a cobre, predominando más en las improntas de los peces expuestos en este último metal.

BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, A. y Hoffer, A. 1978. Reexamination of the lesions in rat caused by cadmium. *Biol. Report.*, 18: 579-591.
- Anderson, D. 1990. Immunological indicator: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *Ame.Fish. Soc. Sym.*, 8: 38-59.
- Arias, J. y Vásquez, W. 1998. Ampliación del conocimiento biológico de *Colossomasp.* (Cypriniformes: Characidae), en ambientes naturales de la cuenca del río Meta. Universidad Tecnológica de los Llanos Orientales. Instituto de investigaciones para la Orinoquía.
- Barroso, F. 1996. Parámetros hematológicos e inmunológicos en *Hypostomus watwata* con síndromes inflamatorios inducidos por exposición de xenobióticos. Tesis de Maestría. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Bermúdez, D. y Madrid, F. 1982. Observación sobre el control de enfermedades en actividades piscícolas en Venezuela. Memoria IV *Simp. Latin. Acu*18-27.
- Blanco, Y.; Salazar, R.; Lemus, M.; García, N.; Hernández, M.; Centeno, L.; Matute, C. y Pérez, J. 2004. Parámetros hematológicos del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818); expuesto a cadmio. *Acta Cientif.Venez.*,55: 27-29.
- Blaxhall, P. y Daisley, K. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, 5:771-781.
- Blazer, V. 1991 Piscina macrophage function and nutritional influences: A review. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 77- 86.
- Bossio, Z.; Salazar, R. y Vargas, A. 2009. Caracterización morfológicas y citoquímica de las células inmunocompetentes de hígado, riñón y sangre del pez *Colossoma macropomum*. Tesis de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Carballo, M. y Muñoz, M. 1991. Effect of sublethal concentrations of four chemicals on susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) to saprolegniosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1813-1816.
- Carballo, M.; Muñoz, M.; Cuellar, M. y Tarazona, J. 1995. Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia, and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2108-2112.
- Córdova, L. 1995. Sensibilidad de pruebas inmunológicas y bioquímicas en poliqueto *Eurythoecomplanata* (Annelida: Amphinomidae) como ensayos para evaluar la toxicidad

de cadmio y cobre. Tesis de Postgrado. Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente. Cumaná.

Dykoca, I. y Lom, J. 1978. Histopathological changes in fish gills infected with *myxosporidan* parasites of the genus *Henneguya*. *Fish Biol.*, 12: 197-202.

Duhamel, G.; Kent, M.; Dybdal, N. y Hedrick, R. 1986. *Henneguya* associated with Granulomatous Branchitis of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Vet Pathol.*, 23: 354.

Eigermman, C. 1975. The sersalminae and my line. *Ann. Carnegie. Mus.*, 9: 226-276.

Ellis, A. 1976. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 8:143- 156.

Ellis, A. 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. fish Biol.*, 11: 453-491.

Enane, N.; Frenkel, K; Connor, J.; Squibb, K. y Zelikoff, J. 1993. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, 80: 68-72.

Elsasser, M.; Roberson, B. y Hetrick, F. 1986. Effects of metals on the chemiluminescent response of rainbow trout (*Salmogairdneri*) phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 243-250.

Fende, P. y Niewenhuis, R. 1977. An electron microscopic study of the effects of cadmium chloride on cryptorchid testes of the rat. *Biol. Reprod.*, 16: 298-305.

Fermín, I. 2002. Estudio geoquímico de los sedimentos superficiales de la laguna de Unare, Estado Anzoátegui, Venezuela. Tesis de grado. Departamento de Biología. M Sc. Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 106 pp.

Fletcher, T. 1986. Modulation of nonspecific host defenses in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 59-67.

Fourniet, J.; Summers, K. y Lee, A. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J. Aquat. Animal Health.*, 13:105-116.

Gabbiani, G.; Badonnel, M.; Mathewson, S. y Ryaan, G. 1974 Acute cadmium intoxication; early selective lesion on endothelial clefts. *Lab. Invest.*, 30:686-695.

Gamboa, J. y Bonilla, B. 1983. Aspectos geoquímicos de los sedimentos superficiales del ecosistema marino costero de José, Estado Anzoátegui. Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. de Vzla.*, 32: 5-23.

García, N. 2004. Efectos de concentraciones subletales de cloruro de cobre sobre las

respuestas hematológicas, inmunológicas y perfil de proteínas séricas en *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tesis de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B. 2006. Change of chloride and rodlet cells in gills, kidney and intestine of *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to reduced salinities. *Journal of Fish Biology*. 69: 590-600

Gunn, S. y Gould, T. 1970. In the test Influencing Factors. Academic Press, New York, 3: 377 – 481

Handy, R. 2003. Effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of same toxicological process. *Comp. Biochem. Physiol. a Mol. Integr. Physiol.*, 135: 25-38.

Harbell, B.; Hodgins, H. y Schiewe, M. 1979 Studies on the pathogenesis of vibriosis in *Coho salmon Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 2: 391-404.

Herráez, M. y Zapata, A. 1986. "Structure and function of melanomacrophage centres of the Goldfish *Carassius auratus*". *Vet Immunol. Immunopathol.*, 12: 117-126.

Hernández, M. 2005. Proteínas en diferentes tejidos (hígado, riñón y branquias) del pez dulceacuicícola *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Expuesto a dosis subletales de cloruro de cobre y cadmio. Trabajo de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Larsson, A.; Bengtsson, B. y Haux, C. 1981. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus* L. exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 1: 19-35.

Loumbourdis, N. 2007. Liver histopathological alterations in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece. Ed. America, USA. 350.

Lamers, C. y Parmentier, H. 1985. The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. *Cell Tissue Res.*, 242: 499- 503.

Laterca, M. y García, N. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitológico e histopatológico. *Revta bras. Zool.*, 2: 489 -500.

Machado, A. 1992. Estudio sobre sistema de la subfamilia *Serrasalmidae* (Teleostei, characidae). Parte 1. Estudio comparado de los juveniles de cachama en Venezuela *Colossoma macropomum* y *Piaractus branchipomus*. *Acta Biol. Vzla.*, 11: 100-102

Mago, F. 1970. Lista de peces de Venezuela. Incluyendo un estudio preliminar sobre ictiografía del país, Ministerio de Agricultura y Cría. ONP. Caracas

Marcano, A. y Vargas, A. 2011. Parámetros Bioquímicos y análisis estructural del riñón

cefálico del pez *Colossoma macropomum* expuestos a cadmio. Tesis de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodríguez, J.; Briceño, J. y Vilas, J. 1997. Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 22-28.

Marcano, L.; Nusetti, O.; Zapata- Vivenes, E.; Nusetti, S y Esclaplés, M. 2006. N. 6 fuel oil effects o nantioxidant enzymes and inmunological responses in the *Thalassphryne maculosa* (Pisces: Batrochoididae). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 31-35.

Martínez, D. 1998. Efecto de las concentraciones subletales de cobre sobre las respuestas de inmusensibilidad en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomididae). Tesis de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Matty, A. 1985. *Endocrinology*. Ed. Timber Press, Portland. USA. 265.

Mcgraw, K. y Ardia, D. 2003. Carotenoids, inmunocompetence, and the information content of sexual color: An experimental test. Department of Neurobiol. Behavior, Cornell University, Ithaco, New York, 14853.

Nusetti, O.; Marcano, L.; Zapata, E.; Esclaplés, M.; Nusetti, S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil N° 6. 29 (6): 324-328.

Nusetti, O.; Salazar, R.; Rodríguez, J. y Villos, S. 1998. Inmune and biochemical responses on the polychaete (*Eurythoe complanata*) exposed to sublethal concentration of cooper. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 177-183.

Perdomo, D.; Useche, M. y González, M. 2002. Utilización de macroincubadoras en el proceso de reproducción inducida de cachamas (*Colossoma macropomum*) Pisces Characidae. *Revist. Cientif.*, 12: 425-427.

Ramírez, A. 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Anales de la Facultad de Medicina. 63.

Salazar, R.; García, N.; Villalobos, B. y Lemus, M. 2006. Inmunological response of the fishwater *Colossoma macropomum* exposed to copper. *Bull. Contam. Toxicol.*, 77: 925-930.

Salazar, R.; Nusetti, O. y Rodríguez, J. 1997. Efecto del cobre sobre los mecanismos de defensa celular de poliqueto *Eurythoe complanata*: Viabilidad, contaje total de células y respuestas fagocíticas. *Bol. Inst. Oceanog. Vzla.*, 36 (1y2): 3-6.

- Salazar, R. 1993. Efecto de dosis subletales de cobre sobre el sistema inmunitario, metabolismo y crecimiento de poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae). Tesis Magister. Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1980. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blumé. Ediciones. Madrid.
- Tavares-Dias, M.; Gonzaga, J.; Sampalo, S. y Aquino, S. 2006. Ocurrencia de ectoparásitos en *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Characidae) cultivados en estacao de piscicultura na Amazonia centra. *Acta Sci.*, (2): 726-731.
- Thompson, I.; White, A.; Flecher, T.; Houllhan, D. y Secombes, C. 1993. The effects of stress on the immune response of Atlantic Salmon (*Salmo Solar* L.). Fed diets containing different amounts of vitamina.C. *Aguaculture.*, 114: 1 -18.
- 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. *Environ.Toxicol.*, 19: 11-9.
- Useche, M. 2000. El cultivo de la cachama, manejo y producción (primer taller piscícola). Decanato de Investigaciones. Universidad Experimental del Táchira. San Cristóbal.
- Vaquero, J.; Quilarte, L.; López, J.; William, V.; Rojas, L.; Bonilla, J. y Ramírez, A. 2004. Evaluación de la concentración por metales de la cuenca del río Tigre. *Act. Cient. Venez.* 55: 81.
- Vargas, A.; Lemus, M. y Salazar, R. 2009. Efecto inmunosupresor de concentraciones subletales de cobre y cadmio en el pez tropical dulceacuícola *Colossoma macropomun*. XII Congreso de la Asociación Española de Limnología; Barcelona.
- Zapata, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Esclapés, M. y Arredondo, L. 2005. Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas.*, 31: 1-9.
- Ziegenfuss, M. y Wolke, R. 1991. The use of fluorescent microspheres in the study of piscine macrophage aggregate kinetics. *Dev. Comp.immunol.*, 15: 165-171.
- Zweig, R.; Morton, J. y Stewart, M. 1999. Source water quality for aquaculture. A guide for assessment. Environmentally and socially sustainable development. *Rural Development.*, 12: 47-4.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Evaluación de cambios en la población de granulocitos, en sangre y riñón cefálico del pez <i>colossoma macropomum</i> (curvier, 1818) expuestos a cadmio, cobre y depurados
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Álvarez R, María del C.	CVLAC	9452531
	e-mail	marialvarez116@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Colossoma macropomum</i>
Cadmio
Cobre
Riñón cefálico

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En este trabajo se evaluó el efecto de la exposición a cadmio y a cobre sobre riñón cefálico y sangre del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. Los organismos fueron aclimatados durante 15 días y posteriormente expuestos a una dosis de 1 ppm de cloruro de cadmio y 0,5 ppm de cloruro de cobre durante 21 días y fueron depurados de los metales durante 21 días. Se realizaron frotis sanguíneos a partir de muestras tomadas de peces antes de someterlos al tratamiento, finalizado el tratamiento y después de la depuración. Finalizados los 21 días de exposición se realizaron improntas del riñón cefálico. Los resultados del estudio indican que en *Colossoma macropomum* el riñón cefálico es un órgano principalmente hematopoyético, presentando agregados granulopoyéticos y eritropoyéticos bien definidos. Aunque ambos metales afectan tanto a las células eritropoyéticas como a las granulopoyéticas, se evidenció que el cadmio afecta los agregados de ambas series y produce los mayores cambios en la morfología de los precursores eritrocitarios; el cobre no disminuye los agregados hematopoyéticos pero si produce cambios en la morfología de la serie granulopoyética; ambos metales disminuyen el porcentaje de células inmaduras del riñón cefálico. En sangre periférica, se observó disminución significativa de linfocitos y granulocitos en los peces expuestos a cadmio y a cobre. La depuración de 21 días no fue suficiente para la recuperación celular de estos peces. La disminución del conteo de las células leucocitarias, observada en los peces expuestos a cadmio y a cobre está en concordancia con la disminución de precursores leucocitarios en el riñón cefálico, órgano leucopoyético, y corrobora lo observado en estudios previos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Raquel Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5855836
	e-mail	rsalazarlugo50@gmail.com
	e-mail	
Mairín Lemus	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> X
	CVLAC	6429405
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	
América Vargas	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> X
	CVLAC	8219437
	e-mail	leimar0501@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2013	03	13
------	----	----

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-alvarezm.doc	Application /word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

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.

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

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Cuvarelo
Secretario



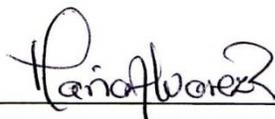
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/marija

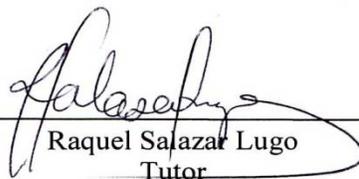
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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”.



María del Carmen Álvarez
Autor



Raquel Saizar Lugo
Tutor