



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

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE ALGUNOS
PARÁMETROS CELULARES, HEMATOLÓGICOS, E
INMUNOLOGICOS DEL CRUSTÁCEO
Emerita portoricensis Y DEL
PEZ *Ancistrus brevifilis*

PROF. ANTÓN MARÍN YANET DEL VALLE

TRABAJO DE ASCENSO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
ASCENDER A LA CATEGORÍA DE PROFESOR ASOCIADO

Cumaná, enero 2025

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION	1
METODOLOGÍA	16
Recolección de los ejemplares de <i>Emerita portoricensis</i>	16
Recolección de los ejemplares de <i>Ancistrus brevifilis</i>	16
Aclimatación de los ejemplares de <i>Emerita portoricensis</i>	17
Aclimatación de los ejemplares de <i>Ancistrus brevifilis</i>	18
Determinación del CL ₅₀ para <i>Emerita portoricensis</i>	18
Ensayo de toxicidad subletal para <i>E. portoricensis</i>	19
Extracción de la muestra de hemolinfa <i>E. portoricensis</i>	19
Ensayo de toxicidad subletal para <i>A. brevifilis</i>	20
Toma de muestra sanguínea de <i>A. brevifilis</i>	20
Parámetros citológicos en la hemolinfa de <i>E. portoricensis</i>	21
Diferenciación de hemocitos al fresco	21
Número total de hemocitos.	21
Parámetros hematológicos de <i>A. brevifilis</i>	22
Determinación del porcentaje de hematocrito.....	22
Determinación de la concentración de hemoglobina	22
Determinación del contaje total de las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos)	23
Recuento diferencial de leucocitos.....	23
Determinación de los índices hematimétricos.....	24
Volumen corpuscular medio	24
Hemoglobina corpuscular media	25

Concentración de hemoglobina corpuscular media	25
Determinación de los parámetros inmunológicos de <i>E. portoricensis</i>	25
Viabilidad de los hemocitos	25
Determinación de los parámetros inmunológicos de <i>A. brevifilis</i>	27
Obtención de leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica de <i>A. brevifilis</i>	27
Viabilidad celular de los leucocitos	28
Adherencia a superficies de leucocitos polimorfonucleares	28
RESULTADOS Y DISCUSION	30
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	80
HOJAS DE METADATOS	83

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño a:

Mis hijos: Virginia Gabriela Kadel y Alain Daniel Albarrán Antón

Mi nieto: Mitchell Gabriel Kadel

Mi madre: Auristela Marín Quijada

AGRADECIMIENTO

A

Dios todopoderoso

La Universidad de Oriente

A todos mis estudiantes

**Yo soy una parte de todo aquello
que he hallado en mi camino**

Alfred Tennyson

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del análisis <i>t-Student</i> aplicado al número total de hemocitos (hemocitos/mm ³) en la hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd).....	34
Tabla 2. Resumen del análisis estadístico t-Student aplicado al número total de hemocitos (células/mm ³) en la hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)	35
Tabla 3. Resumen del análisis estadístico t-Student aplicado al número total de hemocitos (células/mm ³) en la hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario B (expuesto a 0,10 mg/L de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)	35
Tabla 4. Resumen del análisis <i>t-Student</i> aplicado a la viabilidad celular de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd).....	38
Tabla 5. Resumen del <i>t-Student</i> aplicado a la viabilidad celular de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd).....	39
Tabla 6. Resumen del análisis <i>t-Student</i> aplicado a la viabilidad de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de <i>E. portoricensis</i> del acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)	39
Tabla 7. Resumen de la prueba estadística <i>t-Student</i> aplicada a la adherencia celular de los hemocitos de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/l de Cd).....	41
Tabla 8. Resumen del análisis <i>t-Student</i> aplicado a la adherencia a la superficie de los hemocitos de <i>E. portoricensis</i> del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)	41
Tabla 9. Resumen del análisis <i>t-Student</i> aplicado a la adherencia de los hemocitos de <i>E. portoricensis</i> del acuario B (expuestos a 0,10 mg/l de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/l de Cd).....	42

Tabla 10. Resumen de la prueba estadística <i>t-Student</i> aplicada a los diferentes parámetros hematológicos hallados en ejemplares de <i>Ancistrus brevifilis</i> controles y expuestos a una concentración subletal de 0,1 mg/L de Cd.....	51
Tabla 11. Resumen estadístico del <i>t-Student</i> aplicado a los índices hematimétricos hallados en ejemplares de <i>A. brevifilis</i> controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio de 0,1 mg/dL.....	55
Tabla 12. Viabilidad celular y adherencia de polimorfonucleares en ejemplares de <i>A. brevifilis</i> controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio.	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Zona de muestreo de los ejemplares de *Emerita portoricensis*. La flecha blanca con el punto rojo señala la localización donde se realizó el muestreo de los organismos. 16
- Figura 2.- Zona de muestreo de los ejemplares de *Ancistrus brevifilis*. La flecha blanca señala la localización de la colecta. 17
- Figura 3. (A) Célula granulosa (hemocito granuloso) y (B) Célula semigranulosa (hemocito semigranuloso) en hemolinfa de ejemplares controles de *E. portoricensis* observadas en fresco bajo microscopio óptico. Ambas células señaladas con una flecha. Aumento: 40X 30
- Figura 4. (A) Célula hialina (hemocito hialino) y (B). Célula semigranulosa ahusada (hemocito semigranuloso ahusado) en hemolinfa de ejemplares controles de *E. portoricensis* observadas en fresco bajo microscopio óptico. Las flechas punteadas señalan las proyecciones citoplasmáticas de la célula. Aumento: 40X 31
- Figura 5. Hemocitos de ejemplares de *E. portoricensis* expuestos a 0,10 mg/L de Cd, observados al fresco bajo microscopio óptico. (A) célula granulosa; (B) célula semigranulosa; (C) célula hialina; (D) célula semigranulosa ahusada. Aumento: 40X. 32
- Figura 6. Hemocitos de *E. portoricensis* expuestos a 1,00 mg/l de Cd, observados al fresco bajo microscopio óptico (A) célula granulosa, (B) célula semigranulosa, (C) célula hialina y (D) célula semigranulosa ahusada. Aumento: 40X 33
- Figura 7. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. Las flechas negras sólidas largas señalan los tipos leucocitarios, la flecha sólida corta gruesa señala un eritrocito y la flecha negra punteada un trombocito. (A): célula granulocítica de tipo neutrófilo; (B): célula granulocítica de tipo basófila; (C): la flecha señala una célula linfocítica; (D): célula monocítica. Aumento 100X..... 45
- Figura 8. Leucocitos provenientes de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a 0,1 mg/L de Cd. (A) y (B): células del tipo neutrófilo: se distinguen perturbaciones de la membrana citoplasmática; (C) y (D): células linfocíticas, las flechas señalan proyecciones citoplasmáticas; (E): célula monocítica; (F): célula con protuberancias o vesículas en la membrana citoplasmática (flechas continuas), las flechas discontinuas

señalan las estructuras semejantes a gemaciones. Coloración: Giemsa. Aumento: 100X..... 46

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo fundamental evaluar algunos parámetros celulares, hematológicos e inmunológicos del crustáceo *Emerita portoricensis* y del pez dulceacuícola *Ancistrus brevifilis*, para determinar las alteraciones de los mismos ante la exposición a una dosis subletal de Cd. Para esto se tomaron hembras adultas de *E. portoricensis* recolectadas en la zona intermareal de la comunidad de San Luis, Cumaná, estado Sucre, Venezuela. A partir del LC₅₀ obtenido (3,21 mg/L), se tomaron dos concentraciones subletales para la exposición (0,10 mg/l y 1,00 mg/l). Se realizó un bioensayo semiestático, estableciéndose como período de exposición, 15 días. Luego de cumplido este lapso, se procedió a la toma de muestra de hemolinfa de los organismos (expuestos y controles) con jeringas para insulina y por punción de la membrana artrodial, colocándose las muestras de hemolinfa en tubos Eppendorf con EDTA, para la realización de los parámetros celulares e inmunológicos. Por otro lado, se utilizaron ejemplares juveniles de *A. brevifilis* colectados en el río Manzanares, Cumaná, estado Sucre, los cuales fueron transportados hasta el Laboratorio de Fisiología Humana y de Peces de la Universidad de Oriente, donde fueron colocados en acuarios de vidrio previamente preparados. La aclimatación (15 días), se realizó con fotoperiodos de 12/12 horas, con registros de la temperatura y pH del agua; finalizado este lapso se procedió a someterlos al bioensayo de toxicidad subletal (15 días), al final del cual se procedió a la toma de muestra sanguínea. Para diferenciar los valores de los diferentes parámetros estudiados en ambas especies, entre el grupo de organismos expuestos *versus* el grupo control, se utilizó un *t*-Student. Los resultados obtenidos para *E. portoricensis* muestran un aumento de hemocitos en los organismos expuestos a 0,10 mg/l de Cd y una reducción de estos en los expuestos a 1,00 mg/l de Cd. Las células expuestas al metal mostraron irregularidades tanto en la membrana celular como en la forma de la célula en 0,10 mg/l de Cd y en 1,00 mg/l de Cd, evidenciándose que la exposición al Cd causa ruptura de la membrana celular en todos los tipos de células observadas, ocasionando de esta manera que la viabilidad celular disminuya a medida que aumentan las concentraciones del metal, mientras que la adherencia celular es menor en especímenes expuestos a 0,10 mg/l de Cd y 1,00 mg/l de Cd, lo que generaría también la disminución de la capacidad de fagocitosis del crustáceo y por consiguiente la competencia de la respuesta inmune, dejándolo expuesto a cualquier agente externo. Con relación a los resultados obtenidos en *A. brevifilis*, la exposición a 0,1 mg/L de Cd *versus* el grupo control, muestra una reducción significativa de los parámetros hematológicos, tales como la Hb, el Hto, contaje total de glóbulos rojos y de glóbulos blancos, en el porcentaje de células granulocíticas del tipo neutrófilas y linfocíticas, así como en el HCM; de igual manera, con relación a la adherencia y a la

viabilidad celular. Todos estos hallazgos permiten concluir que, posiblemente el Cd causó algún tipo de efecto deletéreo sobre los parámetros evaluados, por lo que se consideró que los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación, indican que el efecto del Cd sobre las respuestas celulares relacionadas con la capacidad inmunológica y hematopoyética de estas células, muestran la alteración del potencial de los leucocitos de cumplir con su papel como defensores de la integridad de los organismos; es decir, el Cd es un elemento capaz de, además de causar anemia, producir alteraciones en el sistema hematopoyético e inmune innato del pez, y por consiguiente, puede comprometer su integridad biológica lo que puede derivar en disminución o pérdida de la viabilidad del organismo. En resumen, ambas especies ven afectada su capacidad de respuesta defensiva bajo los efectos del Cd, aun cuando, las dosis del mismo, sean subletales.

INTRODUCCION

El aumento y evolución de la población humana ha sido paralelo con su desarrollo social, tecnológico y productivo; su incremento, en la mayoría de los casos, es desorganizado, lo que provoca, muchas veces, la alteración del medio ambiente en el cual se encuentren inmersos, siendo generalmente, los cuerpos de agua, uno de los ambientes con más afectación, viéndose perjudicadas la calidad y cantidad de los mismos, de esta forma, la sobrepoblación en áreas urbanas, propicia que, lógicamente, los flujos de descargas aumenten, ejerciendo una presión desfavorable cada vez mayor, sobre el recurso hídrico que actúa como receptor de dichas descargas (Capó, 2007; Li *et al.*, 2014).

Este aumento a nivel mundial de la población, ha ocasionado que se construyan fábricas y/o complejos industriales en zonas adyacentes a ríos, lagos y a lo largo de las zonas costeras; situación que, en estos ambientes, ha aumentado, facilitado y propiciado la introducción de una cantidad significativa de sustancias contaminantes de naturaleza antropogénica, biológicamente activas, entre las cuales se incluyen cientos de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos. Estas sustancias, en muchas ocasiones, pueden causar a los ecosistemas, alteraciones o daños, los cuales se traducen, entre otras cosas, en enfermedades, pudiendo inclusive llevar hasta a la muerte de los organismos que habitan en él (Trenberth y Karl, 2003; Rondón *et al.*, 2010; Musilova *et al.*, 2016; Thompson y Darwish, 2019).

En términos generales, el medio acuático está continuamente expuesto a agentes estresores tanto naturales como antropogénicos, como por ejemplo cambios de temperatura y la introducción de contaminantes químicos, factores estos que pueden provocar efectos dañinos sobre la salud de los organismos que habitan en él. Por otra parte, se ha determinado que la distribución de los contaminantes en el medio está definida por tres procesos básicos, los cuales son: su acumulación en el sustrato

béntico, su distribución en la columna de agua y su captación por parte de los organismos, ya sea a través de las branquias o del sistema digestivo. Estos contaminantes, una vez que llegan al interior de los organismos pueden seguir varias rutas, tales como la acumulación a largo plazo, la producción de efectos tóxicos de forma directa o indirecta tras su biotransformación y la excreción al medio externo, pudiendo todos estos efectos tener repercusión sobre células, tejidos, órganos, sistemas, individuos e incluso poblaciones (Briner, 2010; Khoshnood *et al.*, 2010; Koenig, 2012; Annabi *et al.*, 2013).

Los cuerpos de agua, y en especial los mares y océanos, son el último receptáculo de la polución. Con el tiempo, la actividad biológica descompone la materia orgánica hasta dióxido de carbono y agua como productos finales, pero la materia inorgánica, especialmente los metales, están en constante acumulación en estos ambientes, excepto por una pequeña porción que puede ser consumida en alimentos marinos. Si los metales se encuentran en concentraciones más altas de lo normal son tóxicos para la biota acuática y humana, en ese sentido, los indicadores ambientales dan a conocer las condiciones del medio ambiente mediante el comportamiento de la biota respecto a los factores antropogénicos, bien sea para ser reducidos o revertidos. Se conocen como bioindicadores a especies de plantas y/o animales a los cuales se estudian su población, presencia o ausencia, condición, comportamiento para con éste tratar de determinar la salud del ecosistema. El efecto, daño y las potenciales fuentes de origen de los factores antropogénicos pueden estimarse al interpretar los patrones de comportamiento de la biota (Polanía, 2010; Liu *et al.*, 2022; El-Sikaily y Shabaka, 2024).

Generalmente, las dos razones principales para estudiar el comportamiento químico de los metales en ambientes acuáticos son entender el ciclo biológico y el geoquímico de estos elementos. El ciclo biológico de los metales incluye la bioacumulación, eliminación, biodisponibilidad, toxicidad y biotransformación, mientras que el ciclo

geoquímico consta del transporte, adsorción, desorción, precipitación, disolución y complejidad de los metales en los sistemas acuáticos (Carlini *et al.*, 2009; Curtosi *et al.*, 2010).

Los metales pesados, son uno de los grupos de contaminantes que han sido calificados dentro de los más peligrosos por su persistencia y toxicidad, ya que pueden incorporarse a la cadena trófica y ser concentrados por los organismos, por lo que están considerados como serios polucionantes de los ecosistemas acuáticos. Muchos de estos compuestos no biodegradables, son absorbidos y acumulados (bioconcentrados) por los organismos que viven en el medio acuático, causando problemas de salud en los consumidores finales, como el caso del hombre (Ramírez, 2002; FAO, 2006; Concon, 2009).

Los metales pesados son elementos de masa atómica elevada, debido a esto, los daños ocasionados son diversos porque dependen del metal que los provoque. En cuanto al medio ambiente, los efectos ocasionados por lo general son preocupantes y dependiendo de la concentración en la que el contaminante se encuentre, puede alterar de forma directa o indirecta a los elementos bióticos o abióticos. La problemática se presenta, debido a que generalmente, los efectos de los metales pesados pueden pasar desapercibidos ocasionando daños irreversibles a largo plazo. El estrés ambiental, causado por la acción de los contaminantes de naturaleza metálica, al parecer, es un factor importante que muchas veces determina la disminución de la inmunocompetencia, en consecuencia, es frecuentemente señalado como causante del aumento en la frecuencia de manifestaciones patológicas en los organismos que componen los ecosistemas acuáticos. Los efectos incluyen incremento de las infecciones debido a microbios facultativos, así como disminución de la resistencia a las infecciones (Truscott y White, 1990; Moullac y Haffner, 2000; Corsolini, 2009; Romero, 2009).

Estos elementos químicos han sido clasificados entre las sustancias más tóxicas, por sus propiedades de bioacumulación y de óxido-reducción. La bioacumulación se refiere a cierta cantidad de dicha sustancia que no es metabolizada ni excretada, acumulándose en el tejido de los organismos, lo que le permite entrar y permanecer en la cadena trófica amplificándose en cada nivel de la cadena, proceso que se conoce como biomagnificación, mientras que la propiedad de óxido-reducción hace posible la evasión de mecanismos de control como la homeostasis, transporte y compartimentalización celular (WHO, 2007; Teitelbaum, 2012; Jaishankar *et al.*, 2014; Strak *et al.*, 2019).

Los metales cuando evaden los mecanismos de control pueden causar daño celular a través de dos mecanismos: 1) Mediante estrés oxidativo, el cual se da por un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y aniones superóxidos (O^{2-}), y/o especies reactivas de nitrógeno (ERN), así como el agotamiento de reservas intracelulares de antioxidantes y por la inhibición de la actividad enzimática que participa en el metabolismo y desintoxicación de EROs. Este mecanismo puede causar daño oxidativo a diversas proteínas y lípidos, pero principalmente al ADN y 2) Por la unión a distintas macromoléculas, lo que deriva en un cambio conformacional o remplazo de sus sitios activos o sitios de unión a cationes divalentes y monovalentes esenciales como Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ; algunos ejemplos de metales que utilizan estos mecanismos de toxicidad son el cobre (Cu), aluminio (Al), cromo (Cr), hierro (Fe), plomo (Pb) y el Cd (Hartwig, 2000; Jaishankar *et al.*, 2014; Jan *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2022).

Ambos mecanismos alteran la homeostasis celular debido a que afectan la señalización intra e intercelular, el plegamiento de las proteínas y por ende su actividad, la alteración de las enzimas involucradas en la reparación del material genético, la liberación de neurotransmisores y la regulación de factores de transcripción, entre otros efectos, generando un mal funcionamiento de la célula. De

manera particular, el Cd puede interferir en la actividad biológica de proteínas, uniéndose y desplazando a metales esenciales, por ejemplo, uniéndose a los grupos tiol (-SH) libres, catalizando la oxidación del lado amino de la cadena e interfiriendo en el plegamiento de la estructura terciaria. Elementos como el mercurio (Hg) y el plomo (Pb), pueden formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y acumularse en las células (Hartwig, 2000; Leonard *et al.*, 2004; Volke *et al.*, 2005; Jaishankar *et al.*, 2014; Jan *et al.*, 2015).

Dentro del grupo de los metales pesados altamente contaminantes y tóxicos se encuentra el cadmio (Cd). El Cd (número atómico 48; peso molecular 112,41 g/mol) tiene solo dos estados de valencia: Cd⁰, el metal puro; y Cd²⁺, por lo que es un catión divalente. El Cd puro existe como un metal blando, blanco plateado y brillante, y generalmente no se encuentra de forma natural en este estado de valencia. En el medio ambiente, el estado divalente prevalece como óxidos, carbonatos y sulfuros en los minerales de otros metales, y se encuentra comúnmente con los minerales de zinc. Este metal ingresa de forma natural al medio ambiente como resultado de la erosión de las rocas, los incendios forestales y las emisiones volcánicas. Las fuentes antropogénicas de este metal surgen principalmente de actividades industriales e incluyen: la quema de combustibles fósiles; la fundición de minerales; la aplicación de fertilizantes; fabricación de baterías y pigmentos; galvanoplastia de otros metales; y procesamiento de plásticos.

El Cd es un metal contaminante, siendo común en aguas superficiales donde se encuentra como un ion hidratado (Cd(H₂O)₆²⁺) o en complejos con ligandos inorgánicos u orgánicos. En aguas contaminadas ricas en compuestos orgánicos, la formación de complejos de Cd con estos ligandos, como los ácidos húmicos, tiene un papel importante en el transporte, la partición y la removilización del metal de los sedimentos y precipitados. Además, la solubilidad del mismo está influenciada por el

pH, es más soluble en aguas ácidas. El Cd se elimina de la fase acuosa de los sistemas acuáticos por precipitación y adsorción a los sedimentos (ATSDR, 2000; Meng *et al.*, 2019).

En el medio acuático, el Cd existe en forma de ion libre o como complejo iónico asociado a otras sustancias inorgánicas u orgánicas. Los compuestos de Cd solubles se movilizan en el agua, mientras que los insolubles se depositan en el sedimento. En el transporte y la distribución de un contaminante en un sistema acuático están involucrados factores hidráulicos, químicos y microbiológicos que interaccionan de forma compleja, siendo su solubilidad, influenciada por la dureza del agua, el pH y la presencia de sulfuros coloidales. Cuando las aguas procedentes de los ríos llegan al mar, el ion Cd^{2+} tiende a unirse a partículas en suspensión y/o depositarse, como se dijo anteriormente, en los sedimentos; quedando así localizado en las zonas aledañas a las costas y en estuarios. Ante un descenso del pH de las aguas, el Cd puede volver a movilizarse de nuevo. Es habitual que, durante los periodos en los cuales el agua está estancada, la capa anaerobia de agua presente en el fondo de los puertos tenga una concentración baja de Cd soluble; esto se debe a la reducción del sulfato a sulfuro por parte de la biota microbiana, las cuales ocasionan que el cadmio precipite como sulfuro de Cd insoluble (Peris, 2005; Zamora *et al.*, 2008; ATSDR, 2012).

El Cd es uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial y reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico: 1. Efectos adversos para el hombre y el medio ambiente. 2. Bioacumulación. 3. Persistencia en el medio ambiente. 4. Capacidad de recorrer grandes distancias con el viento y en los cursos de agua (Coombs, 1979; Rodríguez-Serrana *et al.*, 2008).

Los principales usos y aplicaciones del Cd o sus compuestos son: 1. Como pigmento en pinturas, esmaltes, plásticos, textiles, vidrios, tintas de impresión, caucho, lacas, entre otros. 2. En aleación con el cobre y en la producción de pilas de cadmio-níquel.

3. En la fabricación de ruedas y llantas de automóvil, entre otras. Debido a estos usos y a su larga vida media, el reciclaje no es posible, lo que ocasiona que se acumule de manera progresiva en el ambiente, siendo debido a esto, uno de los principales y más peligrosos contaminantes de origen antropogénico. El tiempo de permanencia de este metal en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse (Travis y Haddock, 1980).

Se considera que, en países industrializados, el Cd puede detectarse en prácticamente todos los tejidos de las personas adultas. Este metal, una vez absorbido, es transportado por la sangre a los distintos tejidos y órganos, entre los que destacan riñones e hígado, ya que retienen cerca del 30-50 % de la carga corporal total de Cd, cuya vida media es de aproximadamente 10-30 años, de igual forma, también tiene importancia el tejido óseo como lugar de acumulación del metal (Hänninen *et al.*, 2008; ATSDR, 2012; Thompson y Darwish, 2019; Strak *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que el Cd afecta, entre muchos otros aspectos, la síntesis de la hemoglobina, estimula tanto la apoptosis celular del sistema inmune como el aumento de los niveles de citoquinas, de igual forma ocasiona daño renal y hepático, tumor testicular, así mismo, a nivel estructural y funcional, causa osteomalacia, anemia, hipertensión, malformaciones teratogénicas, ocasiona la deficiencia de metales esenciales así como la alteración de la citoarquitectura de las células sanguíneas, de igual forma, la acumulación excesiva de Cd podría provocar una sobreproducción de EROs, creando un desequilibrio que conduce al estrés oxidativo. Si el sistema antioxidante se ve abrumado, el daño irreversible de las células causado por el exceso de EROs puede iniciar la muerte celular programada (apoptosis) y provocar daño patológico de los tejidos (Salazar y Reyes, 2000; Godt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009; Chen y Shaikh, 2009; Johri *et al.*, 2010; Banu *et al.*, 2011; Macías-Mayorga *et al.*,

2015; Cao *et al.*, 2018; Rodríguez y Mandalunis, 2018; Anton-Marín, 2022; Martínez-Morata *et al.*, 2023).

Como se acotó con anterioridad, los bioindicadores constituyen un gran grupo de organismos, cuya presencia o estado en un ecosistema determinado brinda información sobre ciertas características ecológicas de éste o el posible impacto ambiental de ciertas prácticas sobre el mismo, siendo utilizados principalmente para la evaluación de la calidad ambiental de los ecosistemas. Todos los bioindicadores deben cumplir una serie de requisitos para su empleo, tales como: dispersión y abundancia en el territorio, sedentarismo y tolerar los agentes contaminantes en concentraciones similares a las del ecosistema contaminado sin efectos letales. Dentro de los organismos bioindicadores están los macroinvertebrados, (en especial los crustáceos) y los peces. Los crustáceos están dentro de los más utilizados para el monitoreo acuático debido a las ventajas que estos poseen, siendo una de ellas, la naturaleza sedentaria de muchas de las especies, lo cual facilita la evaluación en la comunidad de los efectos adversos en tiempos prolongados (Henderson *et al.*, 1989; Ferdous y Muktadir, 2009; Boyd, 2010; Almeida *et al.*, 2016; Łuczyńska *et al.*, 2018; El-SiKaily y Shabaka, 2024).

Entre las ventajas que poseen los macroinvertebrados según Zúñiga *et al.* (1993) y Gamboa *et al.* (2008) para que sean utilizados como bioindicadores están las siguientes:

-Son de amplia distribución, abundantes y de fácil recolección.

-Viven y se alimentan en o sobre los sedimentos (donde tienden a acumularse los contaminantes), incorporándolos, de esta forma, a la cadena trófica.

-La naturaleza sedentaria de muchas especies de macroinvertebrados, posibilitan la apreciación de los efectos dañinos a largo plazo que pudiera tener en la comunidad del mismo, un contaminante dado.

-Son sensibles a los factores de perturbación además que responden, tanto en el agua como en los sedimentos, a la presencia de xenobióticos.

-Sus ciclos de vida son relativamente cortos comparados con otros organismos y evidencian de forma rápida las perturbaciones del medio ambiente mediante cambios en la estructura de las poblaciones y de las comunidades a las cuales pertenecen.

Diversas especies del subfilo Crustacea son comúnmente utilizados como bioindicadores de inmunotoxicidad siendo una de las razones la facilidad de evaluación de los componentes que integran su sistema inmune. Estos poseen en su sangre, también llamada hemolinfa, unas células denominadas hemocitos, las cuales tienen la capacidad de recoger y almacenar partículas de desecho, siendo ampliamente utilizadas en ensayos de toxicidad, ya que el estudio de estas células, permite observar los efectos que ejercen las sustancias contaminantes sobre dichas células, y por consiguiente, poder detectar y/o predecir, el o los daños que pudieran ocurrir en el organismo, y por ende, en las poblaciones y ecosistemas en los cuales habitan estos organismos. De igual forma, si se encuentran expuestos a contaminantes ambientales metálicos, son capaces de retenerlos, por lo cual, los crustáceos son considerados buenos indicadores de contaminación ambiental (Villanueva *et al.*, 1988; Arencibia *et al.*, 2009; Chiarelli y Roccheri, 2014; Liu *et al.*, 2014; Rodrigues y Pardal, 2014; Vogt *et al.*, 2018).

En los crustáceos, los estudios demuestran que poseen un sistema inmune basado en efectores celulares y humorales, los cuales se combinan para eliminar agentes extraños, su inmunidad está mayoritariamente mediada por hemocitos con capacidad

para reconocer material extraño, fagocitarlos y/o encapsularlos, siendo su respuesta celular limitada, identificándose tres tipos básicos de células: hemocitos hialinos, hemocitos semigranulosos y granulosos. Son consideradas células análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados, estas cumplen funciones inmunitarias capaces de fagocitar, encapsular, formar nódulos y producir citotoxicidad, representando la fracción celular de la hemolinfa (Antón-Marín y Salazar-Lugo, 2009; Wang *et al.*, 2013; Duressa *et al.*, 2015; Ching, 2019).

Mientras que, por su parte, los peces también son considerados excelentes bioindicadores de contaminación ambiental, teniendo también, algunas ventajas, por lo cual el conocimiento integral acerca de su taxonomía y fisiología, así como los requerimientos de hábitat, son exigencias previas claves para utilizarlos como indicadores (Chovanec *et al.*, 2003).

Se considera que los peces son los organismos acuáticos más adecuados para la aplicación de métodos diferentes que permiten evaluar la gravedad de los efectos tóxicos, por ejemplo, la determinación de la acumulación de sustancias tóxicas en los tejidos, utilizando métodos histológicos y hematológicos o detectando anomalías morfológicas. Debido a sus complejos requisitos de hábitat, los peces son indicadores cruciales de la integridad ecológica de los sistemas acuáticos en diferentes escalas, desde el microhábitat hasta el macrohábitat. La aptitud de las especies de peces tanto a nivel individual (por ejemplo, el rendimiento del crecimiento) como a nivel de población (por ejemplo, la estructura poblacional), está determinada por la conectividad de diferentes elementos del hábitat en un contexto espacio-temporal amplio. Por lo cual, la bioindicación mediante el uso de los peces, representa una buena herramienta de seguimiento, especialmente en lo que respecta a los aspectos de contaminación de naturaleza antrópica (Van der Oost *et al.*, 2003; Burgeot *et al.*, 2017; Rubio-Vargas *et al.*, 2024).

Según Zelikoff, (1998) y Chovanec *et al.* (2003), los peces, en comparación con los mamíferos, ofrecen múltiples ventajas como modelos, en especial para estudios inmunotoxicológicos. Dentro de esas ventajas, enumeran:

-Son especies, generalmente, de relativo gran tamaño, aportando un número adecuado de células y tejidos para realizar estudios.

-Sirven como modelo, tanto de laboratorio como en el campo, pudiendo ser expuestos a contaminantes, y a su vez contando con una metodología bien definida, ya sea en el laboratorio o en su medio ambiente.

-El costo de obtención y mantenimiento de estos organismos, es generalmente bajo.

-Tienen mayor diversidad morfológica, lo que significa que suministran mayor número de modelos para los estudios.

-Los resultados obtenidos con ellos pudieran servir para establecer referencias evolutivas y poder realizar estudios con otros vertebrados.

Son estas razones por las cuales los peces están siendo empleados con mayor frecuencia como modelos para trabajos experimentales de naturaleza ecotoxicológica e inmunotoxicológica (Chovanec *et al.*, 2003; Bianchi y Canuel, 2011).

Algunos autores señalan la necesidad de establecer valores hematológicos en peces con la finalidad que estos puedan ser utilizados como patrones de referencia para ayudar en el diagnóstico de cuadros fisiológicos, patológicos y/o toxicológicos, ya que, debido a la estrecha relación que guardan dichos parámetros con los inmunológicos y con el medio que los rodea, los convierte en buenos indicadores para evaluar los efectos de los tóxicos presentes en el ambiente circundante (Bouck y Ball,

1966; Braxhall, 1972; Campbell y Murray, 1990; Silveira 1992; Fazio, 2019).

En los peces, el estrés puede arriesgar la competencia del sistema inmune, generalmente alterando (en primera instancia), la respuesta innata, la cual, en ellos, es la principal y más relevante línea de defensa inmunológica; de esta forma, se pueden ver afectados mecanismos esenciales para obtener una apropiada respuesta inmunitaria. De igual manera, el sistema inmune de los peces es altamente sensible a tóxicos, ya sean estos de origen orgánico o inorgánico. Los contaminantes inorgánicos, tal como los metales, pueden producir en estos organismos, leucopenia, atrofia de órganos linfoides, supresión de la respuesta humoral, así como alteración de la citoarquitectura de los tejidos hematopoyéticos (Nayak *et al.*, 2007; Antón, 2014; Bosch *et al.*, 2016; Tarasco *et al.*, 2019; Antón-Marín, 2022).

De igual manera, cuando se habla de organismos bioindicadores es muy común y a veces es necesario mencionar a los biomarcadores. Estos desempeñan un papel crucial en el seguimiento de la salud y la calidad de los entornos acuáticos. Pueden ser indicadores moleculares, celulares o fisiológicos, los cuales brindan información valiosa sobre los impactos de diferentes contaminantes y acerca de los factores estresantes ambientales. Al medir los cambios en los niveles o actividades de estos, se puede identificar y medir la exposición, así como los efectos de los contaminantes en los organismos. La importancia de los biomarcadores radica en su capacidad de proporcionar un sistema de alerta temprana de las alteraciones ambientales, permitiendo una intervención apropiada, y si es posible, la aplicación de medidas de atenuación. Además, pueden proporcionar información sobre los mecanismos de toxicidad, así como una mejor comprensión de cómo los contaminantes afectan a los organismos a nivel fisiológico, molecular y celular (Van der Oost *et al.*, 2003; Chovanec *et al.*, 2003; Antón, 2014; Antón-Marín, 2022; Martínez-Morata *et al.*, 2023).

Por otra parte, el sistema inmune tiene como prioridad mantener la individualidad biológica, por tal motivo, diferencia y elimina toda sustancia extraña de los tejidos. Existen varias diferencias entre la inmunidad de vertebrados e invertebrados, sin embargo, la gran diferencia entre el sistema inmune de los vertebrados y los invertebrados radica en que los vertebrados tienen inmunidad adaptativa e innata y sus células inmunes derivan de un progenitor de linaje mieloide o linfoide, mientras que los invertebrados solo poseen la innata, además que no poseen células linfoides ni moléculas del tipo inmunoglobulinas (Tonguthai, 1997; Antón-Marín y Salazar-Lugo, 2009).

Debido a las características del sistema inmune, es posible inferir, dependiendo de la vía de exposición al tóxico, la susceptibilidad de los mecanismos inmunológicos expresados por un organismo ante un contaminante determinado, ya que este incluye respuestas celulares y bioquímicas que pueden ser estimadas en la práctica. Entonces, dentro de ese orden de ideas, se puede entender y considerar a los componentes del sistema inmunológico como biomarcadores de exposición a xenobióticos, siendo la actividad fagocítica una de las más usadas (Jerônimo *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Xian *et al.*, 2010; Kreutz *et al.*, 2011; Zhu y Su, 2022).

Por otra parte, dentro del subfilum Crustacea se encuentra el género *Emerita*, el cual tiene características que le confieren una alta capacidad para valorar los diferentes impactos sobre el ambiente acuático (Boere *et al.*, 2011). El mismo ha sido considerado como un excelente bioindicador de contaminantes químicos debido a su resistencia fisiológica, amplia distribución poblacional, fácil captura y cercanía a las actividades humanas en las costas (Sastre, 1990; Tam *et al.*, 1996; Alvitres *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2013; Gonçalves, 2018).

En América se conocen seis especies del género *Emerita* (*E. analoga*, *E. benedicti*, *E. portoricensis*, *E. talpoida*, *E. brasiliensis* y *E. rathbunae*), estos habitan playas arenosas, por lo que es muy usual en las costas de Venezuela, su cuerpo está modificado para sobrevivir en su entorno, tienen fuerte caparazón, patas cortas que les habilita nadar y enterrarse rápidamente y antenas que les permite filtrar el alimento que proporciona el arrastre del oleaje en la zona intermareal (Boere *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2011; Chaves *et al.*, 2013; Gonçalves, 2018).

La especie *E. portoricensis*, conocido como “abuelita”, es un crustáceo decápodo que presenta una morfología adaptada para cavar en el sedimento blando. Vive siempre en relación con los fondos arenosos de las playas litorales y de las arenas sublitorales de los mares tropicales (Ortiz *et al.*, 2013; Ferrera, 2016). En trabajos realizados en condiciones de laboratorio se constató que la especie *E. portoricensis* se aclimatada con facilidad a los acuarios de laboratorio, además puede permanecer en ellos por largos periodos de tiempo, y una característica muy importante para estudios de toxicidad, es que tiene la capacidad de bioacumular metales por encima de la concentración del medio (Lemus y García, 1996, García *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2012; Ferrera, 2016,).

Por su parte, los peces de la especie *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920), los cuales pertenecen al orden Siluriformes y a la familia Loricariidae (Aguilera y Carvajal, 1976; Palencia, 1995), conocidos comúnmente como “guaraguara”, son peces autóctonos y están ampliamente distribuido en los ecosistemas dulceacuícolas de la región nororiental de Venezuela, así como en las corrientes de las llanuras del río Amazonas y otros ríos de América del Sur, considerándose con cierta importancia económica en algunos estados de Venezuela (Lárez, 2011), siendo estimada como la cuarta especie con mayor abundancia en el río Manzanares. Son de hábitos nocturnos, bentónicos y se alimentan en el fondo de los ríos, principalmente de algas y de algunos invertebrados (Ruiz *et al.*, 2005).

Debido, entre otros aspectos, a su hábito bentónico, se le ha considerado como posible organismo centinela de contaminación acuática (Lárez, 2007; Velasquez-Vottelerd *et al.*, 2015). Lárez (2007), estudiando el efecto genotóxico que sobre las células sanguíneas de *A. brevifilis* tiene el glifosato, evidenció efectos nocivos del herbicida sobre la molécula de ADN en dichas células. Velasquez-Vottelerd *et al.* (2015), por su parte, evaluaron el efecto del Cd sobre la viabilidad mitocondrial y los niveles de tioles solubles en ácido en hígado, riñón, corazón y branquias de *A. brevifilis*, demostrando que el Cd es capaz de disminuir los niveles de tioles en todos los órganos, así como, dañar significativamente las mitocondrias del hígado y del riñón, lo cual indica su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno y en consecuencia, la ocurrencia de peroxidación lipídica, con la subsiguiente cadena de alteraciones derivadas de este hallazgo.

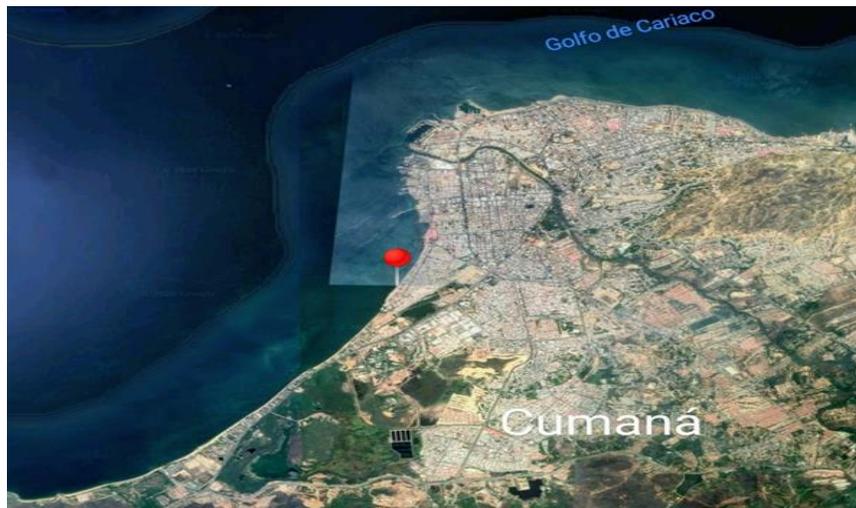
Considerando todo lo anterior se estimó relevante realizar un trabajo de investigación donde se utilicen dos especies de organismos que pudieran ser empleadas como bioindicadoras de contaminación ambiental por metales; una, proveniente de un ambiente dulceacuícola, tal como el pez *Ancistrus brevifilis*, y otra, de un ambiente marino-costero, como es el caso del crustáceo *Emerita portoricensis*, esto con el fin de evaluar algunos parámetros hematológicos, celulares e inmunológicos, con el propósito de determinar las alteraciones de estos parámetros frente a la exposición a una dosis subletal de un tóxico metálico, que en este caso, es el Cd y que a la vez, estos parámetros, puedan ser considerados como posibles biomarcadores de contaminación por Cd en ambos ambientes.

METODOLOGÍA

Recolección de los ejemplares de *Emerita portoricensis*

Se recolectaron de forma manual 120 ejemplares hembras adultas de *E. portoricensis* en la zona intermareal de la comunidad de San Luis, Cumaná, estado Sucre, (Lat. 10° 44' N; Long. 64° 19' O.) (figura 1), los cuales fueron posteriormente trasladados en cavas con arena y agua de mar con aireadores, hasta el laboratorio de Fisiología Humana y de Peces de la Universidad de Oriente del núcleo de Sucre, ubicado en la antigua Escuela de Enfermería. En el mismo se realizaron tanto el ensayo de la concentración letal media (CL₅₀), como el bioensayo de toxicidad subletal.

Figura 1.- Zona de muestreo de los ejemplares de *Emerita portoricensis*. La flecha blanca con el punto rojo señala la localización donde se realizó el muestreo de los organismos.

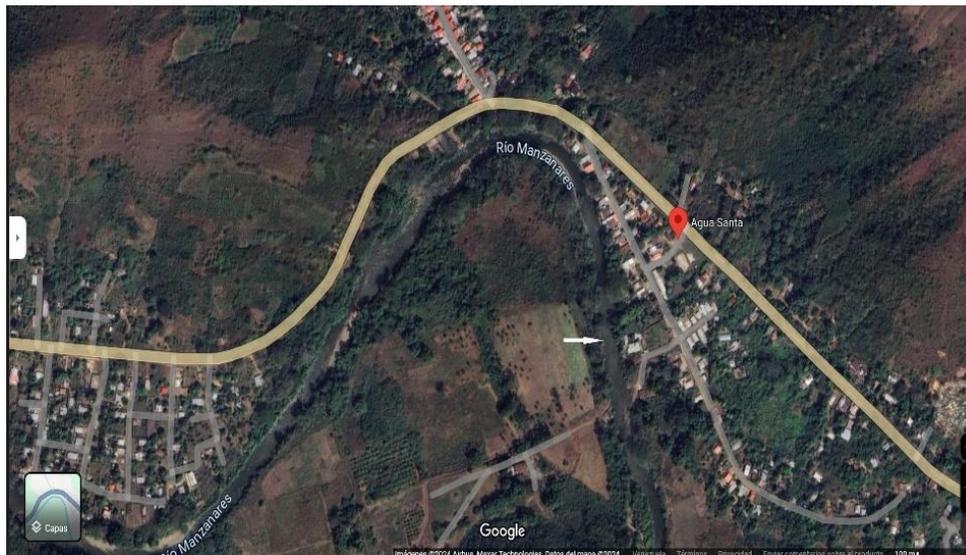


Recolección de los ejemplares de *Ancistrus brevifilis*

Se utilizaron ejemplares juveniles de *A. brevifilis*; estos fueron colectados en el río Manzanares, sector Agua Santa (Lat 10° 34' N; Long 64° 11' S) en la carretera Cumaná-Cumanacoa, municipio Montes, estado Sucre (figura 2). Se utilizó como arte de pesca, chinchorros de malla de 0,50 cm de diámetro, 5,00 m de largo x 1,15 m de

alto aproximadamente. Una vez atrapados los peces, fueron transportados en bolsas plásticas negras selladas, conteniendo agua y oxígeno, hasta igualmente, el Laboratorio de Fisiología Humana y de Peces del núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Figura 2.- Zona de muestreo de los ejemplares de *Ancistrus brevifilis*. La flecha blanca señala la localización de la colecta.



Aclimatación de los ejemplares de *Emerita portoricensis*

Los organismos fueron colocados en acuarios de vidrio de 27,00x27,00x15,00cm con una capacidad de 10,93 L, los cuales contenían 1 500 mL de agua de mar esterilizada y filtrada con papel Whatman 42 y 1 000 g de arena esterilizada, cada acuario tenía una cubierta plástica para evitar la pérdida de agua por evaporación y disponían de bombas de aireación y piedras difusoras. Las condiciones en el estudio fueron las siguientes: temperatura del agua se situó en $24,00 \pm 2,00^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12/12 horas, salinidad de $36,00 \pm 2,00\%$ y pH del agua de $7,00 \pm 0,00$; con un período de aclimatación de 7 días, tiempo durante el cual fueron alimentadas *ad libitum* una vez al día, con una suspensión de microalgas de *Tetraselmis chuii* y nauplios de *Artemia*

spp. (García *et al.*, 2000), de igual forma se les hizo recambio diariamente del 80,00% de agua para disminuir los desechos metabólicos (Antón *et al.*, 2005).

Aclimatación de los ejemplares de *Ancistrus brevifilis*

Una vez en el laboratorio, los peces fueron colocados (estando aun en las bolsas donde fueron transportados), en acuarios de vidrios de 60,00 L de capacidad, con dimensiones de 60,00cm de largo, 30,00cm de ancho x 40,00cm de altura, todos con agua, previamente aireada y sin cloro; los acuarios se cubrieron con bolsas negras para no alterar a los organismos, al cabo de 30 minutos, los organismos fueron sacados uno a uno de las bolsas de traslado con una malla para peces e introducidos directamente en el agua de los acuarios para dar inicio al periodo de aclimatación. El tiempo de aclimatación fue de siete días, tiempo durante el cual se realizó recambio del 80% del agua de los acuarios diariamente, manteniéndose con sistemas de aireación, compuestos por aireadores y piedras difusoras. Para prevenir infecciones fúngicas en los peces, se le agregó al agua 0,01 ml de solución de verde malaquita al 3%.

Toda la aclimatación se realizó con fotoperiodos de 12/12 horas; de igual forma se hizo un registro diario de la temperatura y del pH del agua, manteniéndose en $24,00 \pm 1,00$ °C y $6,90 \pm 0,45$, respectivamente, mientras que la dureza total se mantuvo en 106,00 mg/dL. La alimentación de los peces se realizó *ad libitum* (todas las mañanas antes de hacer el recambio de agua), con alimento comercial en hojuelas para peces tropicales marca Kantal®. Al finalizar el tiempo de aclimatación, los peces fueron considerados aptos para someterlos al bioensayo de toxicidad.

Determinación del CL₅₀ para *Emerita portoricensis*

Debido a que no se le habían realizado estudios de toxicidad con Cd en estos organismos, se hizo necesario la realización de un ensayo para determinar la concentración letal media para Cd en esta especie. Para esto se utilizaron 5 beakers de 120,00 mL, en cada uno se agregaron 147,00 g de arena estéril y agua de mar filtrada

y esterilizada, con su respectivo duplicado (10 envases, en total). En cada beaker se colocaron 6 organismos, los cuales fueron sometidos a concentraciones nominales ascendentes de 0,00 mg/L (control), 0,65 mg/L, 1,63 mg/L 4,09 mg/L y 10,24 mg/L de Cd. respectivamente, las cuales se estimaron mediante el método computarizado Probit descrito por Stephan *et al.* (1977), para determinar la concentración letal media (CL₅₀), con un tiempo de exposición de 96 horas, contándose los organismos muertos en el transcurso del ensayo, obteniéndose como concentración letal media 3,21 mg/L de Cd para *E. portoricensis*.

Ensayo de toxicidad subletal para *E. portoricensis*

Luego de realizado el ensayo para el CL₅₀, y partiendo de la concentración letal obtenida (3,21 mg/L de Cd), los organismos restantes fueron divididos en 3 grupos experimentales: un grupo control, al cual no se le agregó el Cd o acuario A (concentración 0,00 mg/L de Cd); de igual forma, se establecieron 2 grupos de organismos sometidos al tóxico. Estos grupos se dispusieron de la siguiente forma: un grupo expuestos a una concentración de 0,10 mg/L de Cd o acuario B y otro grupo, a una concentración de 1,00 mg/L de Cd o acuario C, 10 organismos por grupo, cada uno con su respectiva réplica (Anexo 1). Estableciéndose un tiempo de exposición de 15 días, de igual forma, durante todo el bioensayo se mantuvieron las mismas condiciones físicas del período de aclimatación, siendo utilizado un sistema de ensayo semi-estático (Ramirez y Mendoza, 2008). Los organismos fueron alimentados diariamente, se realizó el recambio de 80,00% de agua de mar filtrada, mediante sifoneo, esto para disminuir los desechos tóxicos metabólicos, dónde por cada recambio se agregaron los volúmenes correspondientes de solución a cada acuario para mantener las concentraciones iniciales (Nuseti *et al.*, 2004).

Extracción de la muestra de hemolinfa *E. portoricensis*

Luego de cumplido el lapso de exposición se procedió a la obtención de la muestra de hemolinfa. Se removieron con sumo cuidado los ejemplares de los acuarios, luego

fueron lavados rápida y con igual cuidado, con agua destilada y secados suavemente con papel absorbente. Se tomaron muestras de hemolinfa, aproximadamente 0,30–0,40 mL por punción de la membrana artrodial en la base del primer par de pereópodos con una jeringa de hipodérmica, la hemolinfa extraída fue agregada a tubos Eppendorf que previamente contenían 5,00µL de anticoagulante EDTA al 10%, obtenida la muestra de hemolinfa, se procedió a realizar la determinación de los diferentes parámetros celulares e inmunológicos (Antón *et al.*, 2005).

Ensayo de toxicidad subletal para *A. brevivifilis*

Luego del periodo de aclimatación, se colocaron 16 peces de tallas y pesos similares ($20,57 \pm 1,01$ cm y $95,71 \pm 10,72$ g respectivamente), todos repartidos en cuatro acuarios, divididos en dos grupos: expuestos y controles, con 4 organismos por acuario con su respectiva réplica. Partiendo de la CL_{50} determinada para *A. brevivifilis* (11, 81 mg/L) por Velásquez-Vottelerd *et al.* (2015), se tomó una concentración subletal de Cd (0,10 mg/L), la cual fue depositada diariamente en los acuarios con los peces, con un tiempo de exposición de 15 días; de igual forma, se mantuvieron las mismas condiciones físicas y químicas del agua empleadas para la aclimatación para todos los acuarios, utilizándose un sistema de ensayo semi-estático [United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1996]. Al final del periodo de exposición, se procedió a tomar las muestras para la determinación de los parámetros inmunológicos y sanguíneos (Apéndice 2).

Toma de muestra sanguínea de *A. brevivifilis*

Para la obtención de las muestras, los organismos fueron colocados en agua fría a 10 °C para que se adormecieran y luego se procedió a pesarlos y medirles la longitud estándar para seguidamente realizar la toma de las muestras sanguíneas. El pesaje de cada organismo fue realizado en una balanza analítica marca Ohaus ($\pm 0,001$ g) y medida su longitud con un ictiómetro. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante cortes del pedúnculo caudal, con un bisturí, utilizando jeringas para insulina, las

cuales, fueron previamente y mediante aspirado, heparinizadas (heparina sódica: 1 000 UI/mL) para que actuara como anticoagulante. Se cubrieron los ojos y las branquias del organismo con una toalla de papel empapada en agua fría para minimizar el estrés, de acuerdo con las Normas para la Utilización de Animales en Investigación del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACYT, 2007; Antón-Marín *et al.*, 2015). Las muestras sanguíneas fueron a su vez colocadas en tubos Eppendorf con heparina, para su utilización en la obtención de los parámetros hematológicos e inmunológicos (Antón, 2014).

Debido a que los objetivos que se perseguían en este estudio tenían que ver con el conocimiento acerca de las células presentes en la hemolinfa y en la sangre de los organismos de interés, y ya que no se habían hecho con anterioridad investigaciones donde se establecieran estos tipos celulares, ni en *A. brevifilis* ni en *E. portoricensis*, se consideró necesario realizar, previamente, la caracterización de los grupos celulares de ambos organismos, sin embargo, al no ser el objetivo de esta investigación, no se incluyeron en el mismo, solo se tomaron los resultados finales de la caracterización celular de los organismos de interés.

Parámetros citológicos en la hemolinfa de *E. portoricensis*

Diferenciación de hemocitos al fresco

Con el propósito de observar las características morfológicas de los hemocitos y así poder establecer que tipos de hemocitos posee esta especie, se realizó la diferenciación celular. Para esto se colocaron 20,00 µL de hemolinfa recién tomada sobre una lámina portaobjetos limpia y desengrasada, luego se procedió a cubrir la muestra con una laminilla para así visualizarla al microscopio con el objetivo de 40X y de esta forma realizar la descripción morfológica de las células (Hose *et al.*, 1992).

Número total de hemocitos.

Para obtener el número total de células de la hemolinfa se utilizó el método de Riveros (1993), con una modificación. En un tubo de ensayo se colocaron 0,99 ml de agua de mar esterilizada y filtrada al cual se le añadió 10,00 μ L de hemolinfa tomada de los tubos Eppendorf, se mezcló y se procedió a llenar la cámara de Neubauer, la misma fue colocada en cámara húmeda por 5 minutos, transcurrido este tiempo, se procedió a contar los hemocitos en los cuatro cuadrantes externos de la cámara a través del microscopio óptico, bajo el objetivo de 40X. Para obtener el número total de hemocitos por mm^3 se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de hemocitos}/\text{mm}^3 = \text{hemocitos contados} \times 50$$

Parámetros hematológicos de *A. brevifilis*

Determinación del porcentaje de hematocrito

Se utilizó el método del microhematocrito. Para esto, se llenaron con sangre tubos capilares de 75,00 mm de longitud x 12,00 mm de diámetro, se sellaron con plastilina, luego se sometieron a centrifugación durante 5 minutos a 10 000 rpm, en una microcentrífuga. Los tubos de los microhematocritos se leyeron en una tabla semilogarítmica elaborada para tal fin, los resultados se expresaron como porcentajes (Blaxhall y Daisley, 1973).

Determinación de la concentración de hemoglobina

La concentración de hemoglobina (Hb) en los peces se determinó utilizando el método de la cianometahemoglobina. Para tal fin, se tomaron 20,00 μ L de sangre, se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de reactivo de Drabkin y se dejó reposar durante cinco minutos; luego se procedió a determinar la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. El resultado se expresó en gramos de Hb por decilitro de sangre total (g/dL). Para la elaboración de la curva patrón se utilizó un estándar de Hb de 16,00 g/dL, a partir de este, se prepararon diluciones: 2,00; 4,00; 8,00; 12,00 y 14,00 g/dL. Se obtuvieron las absorbancias de las seis concentraciones y se

graficaron, a partir de la cual se hallaron las concentraciones de las muestras de interés (Blaxhall y Daisley, 1973).

Determinación del conteo total de las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos)

El conteo de los eritrocitos, glóbulos rojos o hematíes se realizó en una cámara de Neubauer, para lo cual se mezclaron 10,00 μL sangre con 1,99 mL de solución de Dacie para peces, luego, con una pipeta se tomó de esta solución y se colocó en el borde de la cámara, hasta llenar el retículo de la misma, se dejó que los eritrocitos sedimentaran en cámara húmeda durante un minuto e inmediatamente se realizó el conteo de las células sanguíneas en un microscopio óptico con el objetivo de 40X. Los eritrocitos se contaron en 5 cuadrados pequeños del cuadrado central de la cámara. El resultado fue expresado en millones de eritrocitos por milímetros cúbicos de sangre ($\text{céls}/\text{mm}^3$) utilizando para ello la fórmula siguiente (Blaxhall y Daisley, 1973):

$$\text{Número de eritrocitos}/\text{mm}^3 = \text{eritrocitos contados} \times 10\,000$$

El conteo de leucocitos o glóbulos blancos se realizó, de igual forma, con una cámara de Neubauer utilizando reactivo de Turk, para esto se mezclaron 20 μl sangre con 0,38 ml de reactivo, los leucocitos fueron contados en los cuatro cuadrantes laterales específicos para estos y los mismos fueron expresados como miles de leucocitos por milímetros cúbicos de sangre ($\text{céls}/\text{mm}^3$), utilizando para lograrlo, la fórmula que se expresa a continuación:

$$\text{Número de leucocitos}/\text{mm}^3 = \text{leucocitos contados} \times 50$$

Recuento diferencial de leucocitos

Se realizó mediante conteo directo en un frotis sanguíneo, el cual fue previamente secado al aire y fijado con metanol absoluto durante cinco segundos, se utilizó la

coloración de Giemsa para peces modificado por Antón (2014); esto para realizar el reconocimiento, descripción, y caracterización morfológica parcial de las células blancas.

Se fijó el extendido sanguíneo en metanol absoluto durante 2 segundos y se dejó secar rápidamente al aire. Posteriormente, se cubrió con el colorante Giemsa puro y se dejó actuar durante 4 minutos. A continuación, se le agregó igual cantidad de agua destilada tamponada, luego se procedió a soplar suavemente con una pipeta para mezclar el colorante y el agua hasta que apareciera una película verde metálica sobre la superficie de la muestra; enseguida se lavó bien con agua corriente (agua de chorro) y se secó al aire en posición vertical; posteriormente, se observó microscópicamente con objetivo de 100X para visualizar de forma más clara la morfología de las células. Se contaron 100 células y se expresaron en porcentajes según cada tipo celular. Los elementos celulares se identificaron utilizando criterios citológicos definidos por Correa-Negrete *et al.* (2009) para el blanquillo *Sorubim cuspicaudus*, por Salazar-Lugo *et al.* (2012) y por Antón (2014) para *C. macropomum*.

Determinación de los índices hematimétricos

Los índices hematimétricos relacionan los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito y número de hematíes), siendo útiles para comparar las condiciones fisiológicas de organismos sometidos a diferentes situaciones experimentales. Se emplearon las fórmulas matemáticas propuestas por Levinson y McFate (1964):

Volumen corpuscular medio

El volumen corpuscular medio (VCM) corresponde al tamaño de los eritrocitos, es decir, el volumen que tiene un eritrocito por término medio. Se expresó en fentolitros (fl) y se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto} \times 10}{\text{N}^\circ \text{ de glóbulos rojos}}$$

Hto: Hematocrito; G.R: Glóbulos rojos.

Hemoglobina corpuscular media

La hemoglobina corpuscular media (HCM) corresponde al contenido de la hemoglobina que, en promedio, hay en cada eritrocito, se expresó en picogramos (pg) y se calculó a través de la fórmula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{N}^\circ \text{ de glóbulos rojos}}$$

Hb: valor de la concentración de hemoglobina; G.R: número de glóbulos rojos.

Concentración de hemoglobina corpuscular media

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se refiere al contenido medio o concentración de hemoglobina por unidad de volumen eritrocitario, se calculó mediante la fórmula:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Hto}}$$

Hb: valor de la concentración de hemoglobina; Hto: porcentaje de hematocrito.

Determinación de los parámetros inmunológicos de *E. portoricensis*

Viabilidad de los hemocitos

Para determinar la viabilidad de los hemocitos de *E. portoricensis* se realizó la técnica de exclusión del azul de tripano al 0,4%, modificada por Salazar-Lugo (1993). Este método se basa en el principio que las células viables (vivas) no captan ciertos colorantes, es decir, no permiten el paso del colorante al interior, mientras que las células no viables (muertas) si lo permiten, lo cual es una característica que ayuda a diferenciar unas de otras.

En este procedimiento se mezclaron 20 μ L de hemolinfa con un volumen igual de azul de tripano (Sigma-Aldrich®, INC. St. Louis, USA) al 0,4% en tubos Eppendorf, colocándose a 16 °C por 5 minutos. Posteriormente se colocaron 20 mL de la suspensión final en una lámina portaobjetos, seguido de una laminilla y se procedió a realizar el conteo de 100 células hemocitarias mediante microscopía de luz, a una magnificación de 40X. Se diferenciaron los hemocitos vivos de los muertos, ya que estas últimas tomaron una coloración azul, mientras que los vivos se observaron refringentes y carentes del colorante en su interior. La viabilidad se expresó como el porcentaje (%) de células vivas contadas, utilizándose para esto la fórmula abajo descrita (Antón, 2011).

$$\text{VIABILIDAD} = \frac{\text{Número total de hemocitos vivos}}{\text{Número total de hemocitos contados (vivos + muertos)}} \times 100$$

Activación de la adherencia de los hemocitos de *E. portoricensis* a superficies.

Para evidenciar la adherencia celular se utilizó la técnica descrita por Antón (2014), siendo modificada para células de *E. portoricensis*. Esta prueba fue realizada con la hemolinfa recién tomada, sin anticoagulante. Por cada organismo se prepararon 2 láminas portaobjetos, perfectamente lavadas y desengrasadas con etanol al 96%. En cada lámina se depositaron, a cada lado de la misma, dos gotas de hemolinfa recién tomada. Cada una de las láminas portaobjetos fue colocada dentro de una placa de Petri provista de papel filtro grueso saturado con agua destilada estéril (cámara

húmeda), a temperatura ambiente durante 45 minutos. Pasado este tiempo se recuperaron los portaobjetos y se eliminó con un aplicador y con mucho cuidado, el coágulo formado, sin tocar o rayar la lámina, inmediatamente, para eliminar las células no adheridas, se procedió a lavar con buffer fosfato de sodio, pH: 7,5; gota a gota y con mucha suavidad. Se secó el exceso de líquido alrededor de los círculos y se cubrieron las preparaciones con safranina al 0,5%.

Se procedió a colocarlas nuevamente en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al cumplirse este lapso, las láminas fueron lavadas con buffer fosfato de sodio (gota a gota y con suavidad) y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se les colocó una gota de aceite de inmersión en cada círculo y cada una se cubrió con una laminilla para ser observadas al microscopio óptico bajo objetivo de inmersión (100X). Se contaron 100 células por cada círculo, de lo cual se obtuvo un promedio, expresándose la adherencia en hemocitos por campo (Antón, 2014).

Determinación de los parámetros inmunológicos de *A. brevivilis*

Obtención de leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica de *A. brevivilis*

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se obtuvieron por modificación de la técnica de Mamnur *et al.* (2002) y Rojas-Espinosa *et al.* (2024). Se tomaron 20 µL de sangre total, la cual fue homogeneizada con 1 mL de solución salina, suplementada con heparina 0,1%. La suspensión celular se centrifugó a 5 000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0,75 mL de buffer fosfato salino (PBS) 0,15M (pH:7,2), se centrifugó a 2 500 rpm por 5 minutos, el precipitado obtenido fue suspendido en cloruro de amonio (0,85%) frío, luego se procedió a dejar en refrigeración (4°C) por 1 hora; al término de este lapso, las células se centrifugaron a 2 500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces con PBS frío con sus respectivas centrifugaciones (2 500 rpm por 5 minutos). Al final, el sedimento se mezcló con 2 000 µL de solución salina fisiológica y suero bovino fetal y se conservó en tubos Eppendorf a 4°C hasta la realización de las pruebas de viabilidad y de adherencia.

Viabilidad celular de los leucocitos

Aquí, los leucocitos se colorearon con una solución de azul de tripano (Sigma-Aldrich, INC. St. Louis, USA) al 0,4%. La solución preparada se filtró en papel Watman # 3, se conservó en frasco ámbar y bajo refrigeración. Se mezclaron 50 μ L de solución de azul de tripano con 50 μ L de la suspensión de leucocitos, se agitó durante 20 segundos y luego, con la mezcla, se llenó una cámara de Neubauer para proceder efectuar el conteo de las células PMN. Éste se realizó de la misma manera que normalmente se cuentan los leucocitos en la cámara, es decir, contando en los cuatro cuadrantes secundarios periféricos. El conteo se realizó con objetivo de 40X.

Se obtuvo el porcentaje de viabilidad mediante la cuantificación de 100 células; de ese número de células se determinó cuántas estaban vivas. Las células vivas se observaron refringentes, mientras que las muertas tomaron una coloración azul claro. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de células vivas, utilizando para ello la misma ecuación usada para determinar la viabilidad de los hemocitos de *E. portoricensis*.

Adherencia a superficies de leucocitos polimorfonucleares

Para determinar la adherencia de los PMN se utilizó la técnica de Rojas-Espinosa y Arce-Paredes (2004), modificada por Antón (2014) para células de peces. Por cada organismo se prepararon 2 portaobjetos de vidrio perfectamente lavados con jabón y desengrasados con etanol al 96%. Se marcaron en cada portaobjetos con lápiz graso, 2 círculos equidistantes: 1 y 2, de aproximadamente 1 cm diámetro. Luego se depositó una gota de suspensión de células en el centro de cada círculo dibujado en el portaobjetos. Se colocó cada portaobjetos dentro de una caja de Petri y se cubrió la caja con su tapa provista de papel filtro grueso saturado con agua (cámara húmeda). Se procedió a incubar las cajas a 37°C durante 30 minutos y se recuperaron los portaobjetos, seguidamente se eliminaron las células no adheridas mediante lavado

con PBS pH 7,2 (gota a gota con mucha suavidad). Se secó el líquido alrededor de los círculos con papel absorbente y de manera rápida, para evitar que las preparaciones celulares se secan.

Se cubrieron las preparaciones con safranina al 5% para luego se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos, después de transcurrido ese tiempo se recuperaron los portaobjetos, se lavaron con agua corriente, en jarra de Copling, para eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar al aire. Se montaron las preparaciones entre porta y cubreobjetos y, por último, se observaron al microscopio con objetivo de 100X.

Se contaron las células adheridas en cada círculo, por cada uno de ellos, se contaron 50 campos y se obtuvo un promedio de los dos círculos, los resultados se expresaron en células adheridas por campo.

Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico *t-Student*, esto con la finalidad de determinar si existen diferencias en los diferentes parámetros evaluados entre el grupo de organismos expuestos al tóxico *versus* los parámetros evaluados en el grupo control de cada una de las especies, de igual forma los mismos fueron expresados en medias con sus respectivas desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$) y se presentaron en tablas, utilizándose, para la realización del análisis estadístico, el programa Excel de Microsoft 365 en ambiente Windows, utilizándose para la toma de decisiones, un nivel de significancia del 95%, (Zar, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el propósito de hacer más entendibles los resultados, se iniciará con los obtenidos del bioensayo de *E. portoricensis* y posteriormente con los de *A. brevifilis*.

Parámetros hemocitarios e inmunológicos del crustáceo *E. portoricensis*.

En el crustáceo *E. portoricensis* se lograron identificar cuatro tipos de células en fresco de acuerdo con la forma y la presencia de granulaciones citoplasmáticas, siendo estos hemocitos granulados (figura 3A), hemocitos semigranulosos (figura 3B), hemocitos hialinos (figura 4A) y hemocitos semigranulosos ahusados (figura 4B).

Figura 3. (A) Célula granulosa (hemocito granuloso) y (B) Célula semigranulosa (hemocito semigranuloso) en hemolinfa de ejemplares controles de *E. portoricensis* observadas en fresco bajo microscopio óptico. Ambas células señaladas con una flecha. Aumento: 40X

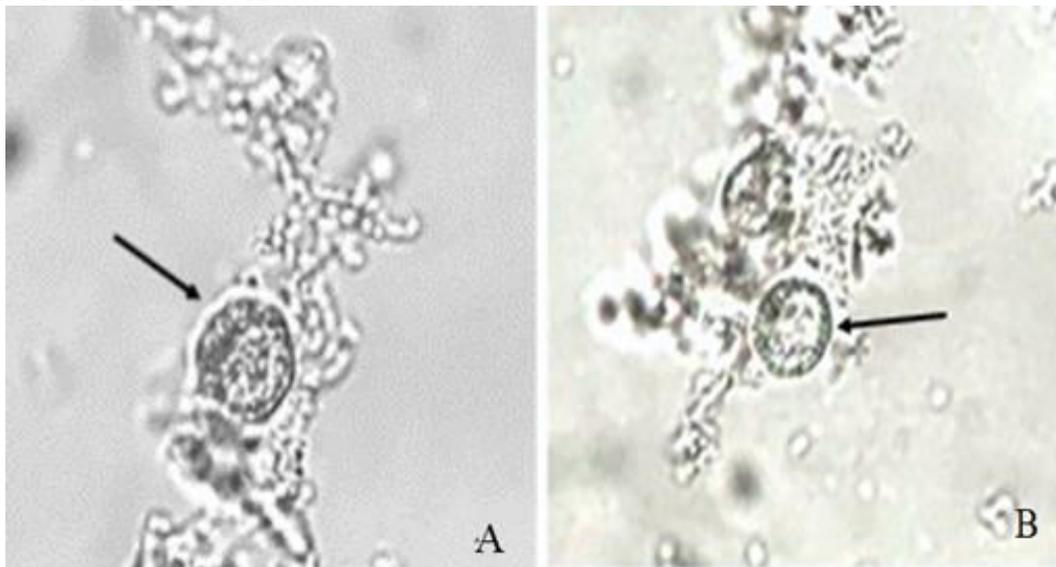
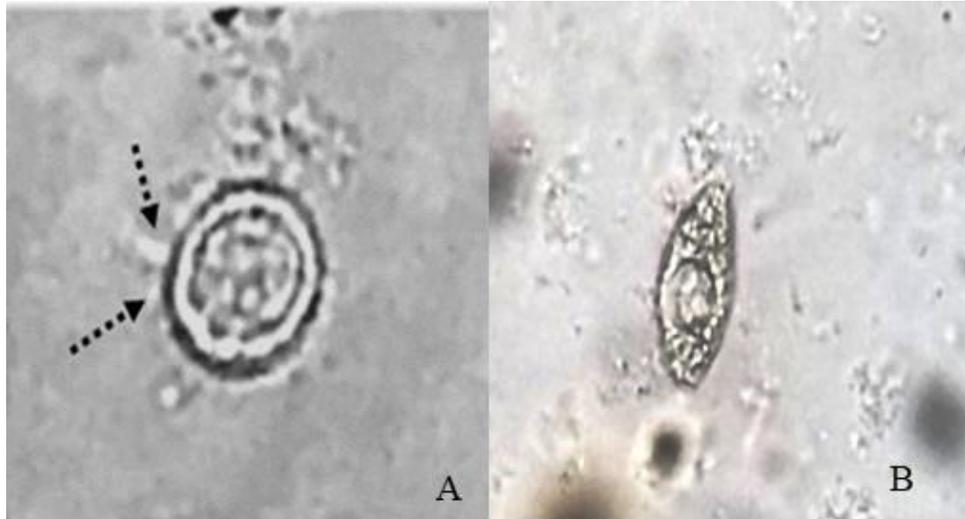


Figura 4. (A) Célula hialina (hemocito hialino) y (B). Célula semigranulosa ahusada (hemocito semigranuloso ahusado) en hemolinfa de ejemplares controles de *E. portoricensis* observadas en fresco bajo microscopio óptico. Las flechas punteadas señalan las proyecciones citoplasmáticas de la célula. Aumento: 40X



Tras observar las células de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de Cd fue posible notar que todas las células presentaron deterioro y aparente fragilidad en la membrana celular.

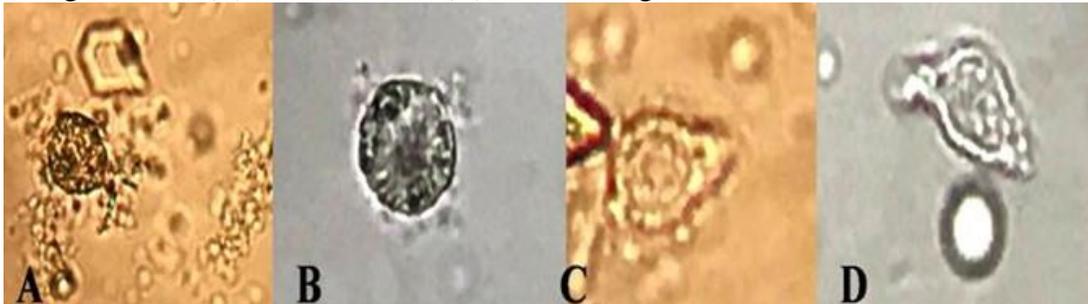
Hemocitos de organismos de *E. portoricensis* expuestos a 0,10 mg/L de Cd

En los organismos expuestos a 0,10 mg/L de Cd (figura 5) se pudo observar como la membrana celular de todas las células identificadas, adquieren una forma irregular, empezando a notarse interrupción en la continuidad de esta, siendo menos definida que las observadas en los organismos del grupo control. Así mismo, fue posible notar la presencia de proyecciones en la membrana citoplasmática.

A pesar del deterioro observado entre las diferentes células, estas se lograban distinguir por la abundante presencia de gránulos en el núcleo y el citoplasma, como

es el caso de la célula granulosa (figura 5A). De igual manera las células semigranulosas, se distinguen por las granulaciones refringentes, que se encuentran en menor cantidad y están dispuestas hacia la periferia del citoplasma (figura 5B); sin embargo las células hialinas a pesar que su forma se observa distorsionada, se diferencia claramente por la ausencia de granulaciones y por su núcleo grande, redondeado y centrado (figura 5C) y en cuanto a las células semigranulosas ahusadas presentan deterioro en su forma, no obstante se observan sus extremos alargados y la presencia de las granulaciones refringentes en el citoplasmas hacia la periferia (figura 5D).

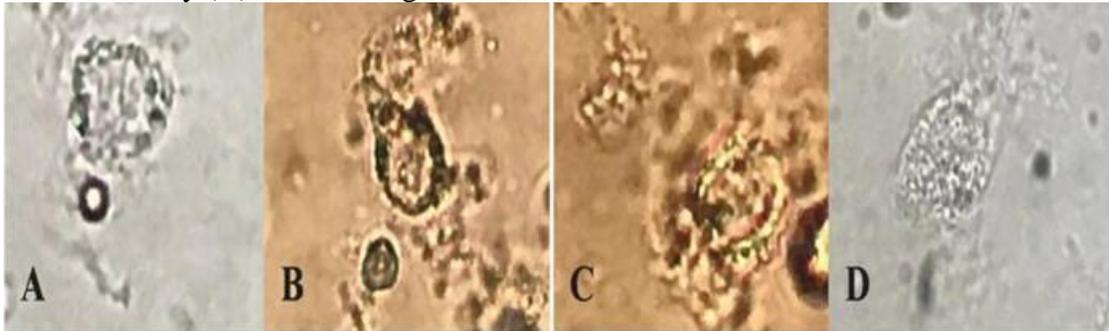
Figura 5. Hemocitos de ejemplares de *E. portoricensis* expuestos a 0,10 mg/L de Cd, observados al fresco bajo microscopio óptico. (A) célula granulosa; (B) célula semigranulosa; (C) célula hialina; (D) célula semigranulosa ahusada. Aumento: 40X.



Hemocitos de organismos de *E. portoricensis* expuestos a 1,00 mg/L de Cd.

La figura 6 muestra los diferentes tipos de hemocitos de *E. portoricensis* expuestos a 1,00 mg/L de Cd. Cuando se observan los diferentes tipos de hemocitos provenientes de los ejemplares de expuestos a 1,00 mg/L de Cd, se puede notar que el deterioro de la membrana celular es más evidente, es decir, es mayor al observado en las células de los organismos expuestos a 0,10 mg/L de Cd , ya que puede apreciarse que las células han perdido parte de su morfología, se observa deformación de las mismas; además es posible notar en muchas de las células expuestas, ruptura de la membrana celular con liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, figura (D).

Figura 6. Hemocitos de *E. portoricensis* expuestos a 1,00 mg/l de Cd, observados al fresco bajo microscopio óptico (A) célula granulosa, (B) célula semigranulosa, (C) célula hialina y (D) célula semigranulosa ahusada. Aumento: 40X



Un estudio realizado por Zapor (2014), indica que el Cd causa daño, en primera instancia, sobre la membrana celular reduciendo su permeabilidad para inhibir la actividad metabólica de las mitocondrias y luego causa trastornos metabólicos. Es notable que a mayor concentración (1,00 mg/L de Cd) del metal, el daño causado a la membrana celular de los hemocitos es significativamente más evidente. Por otra parte, se considera que las mitocondrias como estructura, son el principal objetivo de acción del Cd a nivel subcelular; de igual forma se ha confirmado que el Cd afecta las funciones de las mitocondrias, tanto *in vivo* (Belyaeva *et al.*, 2002) como *in vitro* (Pourahmad y Brien, 2000), siendo quizás esta la razón por la cual se observa el deterioro de las células expuestas. Así mismo se piensa que el Cd promueve la apoptosis, lo que también pudiera explicar los hallazgos obtenidos en esta investigación (Fernández *et al.*, 2003; Giaginis *et al.*, 2006; Johri *et al.*, 2010).

Los organismos expuestos a concentraciones de 0,10 mg/L y a 1,00 mg/L de Cd presentaron diferentes alteraciones en los tipos celulares, puesto que en la menor concentración se evidenciaron alteraciones a nivel de la membrana celular mientras que en la mayor concentración empleada, causó la ruptura parcial de la membrana y

deformación de las células, siendo esto indicativo que el Cd tiene una alta toxicidad a nivel de las células hemocitarias en la especie *E. portoricensis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede apreciar que el efecto tóxico ocasionado por el Cd a las células de la hemolinfa del crustáceo evaluado, en sí mismo, es dosis dependiente, además de ser considerablemente perjudicial, y que dichos efectos, tienen influencia sobre la integridad de los diversos tipos de células hallados en la hemolinfa de la especie *E. portoricensis*, alterando su citoarquitectura, y por ende afectando invariablemente, su eficacia funcional.

Número total de hemocitos de ejemplares de *E. portoricensis* expuestos a concentraciones subletales de Cd.

En la tabla 1 se muestra el número total de hemocitos (hemocitos/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd).

Tabla 2. Resumen del análisis *t-Student* aplicado al número total de hemocitos (hemocitos/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd)

Acuarios	n	$\bar{X} \pm DS$ (hemocitos/mm ³)	<i>p</i>
A (Control)	10	1812,50±66,14	2,49E-07*
B (0,10 mg/L de Cd)	10	3017,50±68,13	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; *p*: distribución estándar; *: diferencias significativas.

Con relación al conteo celular, en los organismos provenientes del acuario A (control) se obtuvo un promedio de número total de hemocitos de 1812,50 ± 66,14 células/mm³, mientras que en los organismos pertenecientes al acuario B (0,10 mg/l de Cd), el número total de hemocitos fue de 3017,50 ± 68,13 hemocitos/mm³, encontrándose diferencias significativas (p<0,05).

La tabla 2, por su parte, muestra el número total de hemocitos (células/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario C (1,00 mg/L de Cd). El estadístico utilizado arrojó diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), mientras que por su parte, en la tabla 3, se señala el número total de hemocitos (células/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* entre los ejemplares pertenecientes al acuario B (expuesto a 0,10 mg/L de Cd) y los del acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd), en donde se puede apreciar que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al conteo de hemocitos en la hemolinfa entre los ejemplares expuestos de ambos acuarios.

Tabla 3. Resumen del análisis estadístico t-Student aplicado al número total de hemocitos (células/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)

Acuarios	n	$\bar{X} \pm DS$ (hemocitos/mm ³)	p
A (Control)	10	1812,50±66,14	0,000332*
C (1,00 mg/L de Cd)	10	1301,25±16,52	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; p: distribución estándar; *: diferencias significativas.

Tabla 4. Resumen del análisis estadístico t-Student aplicado al número total de hemocitos (células/mm³) en la hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario B (expuesto a 0,10 mg/L de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)

Acuarios	n	$\bar{X} \pm DS$ (hemocitos/mm ³)	p
B (0,10 mg/L de Cd)	10	3017,50±68,13	6,65E-06*
C (1,00 mg/L de Cd)	10	1301,25±16,52	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; p: distribución estándar; *: diferencias significativas.

Las diferencias encontradas tras comparar el recuento de los hemocitos en todos los acuarios, muestra que, a mayor concentración, mayor es la disminución en el conteo

celular. Costa *et al.* (2009), obtuvieron variabilidad en el recuento hemocitario causada por exposición a contaminantes tóxicos. Lacerda *et al.* (2006) sugieren que el Cd tiene un efecto negativo sobre los crustáceos, puesto que puede afectar varios procesos fisiológicos y metabólicos, lo que ocurre cuando los organismos expuestos no pueden regular las concentraciones internas del tóxico y se ven rebasadas sus estrategias de desintoxicación y de almacenamiento en formas menos tóxicas.

Al realizar el conteo total de hemocitos de los organismos se puede apreciar que a la menor concentración utilizada del metal (0,10 mg/L de Cd) se observa un aumento de hemocitos en comparación con los valores hallados en los organismos no expuestos o grupo control (acuario A), atribuyéndose éste a uno de los efectos tóxicos del metal. Este aumento quizás es una respuesta del organismo ante el tóxico, posiblemente, con el propósito de contrarrestar los potenciales efectos dañinos del Cd sobre la viabilidad del organismo *E. portoricensis* (Frías-Espericueta *et al.*, 2011).

Por el contrario, al comparar los resultados obtenidos en los organismos expuestos a una concentración mayor (1,00 mg/l de Cd) con respecto a los de los organismos provenientes del grupo control, se evidencia una disminución de hemocitos en los ejemplares expuestos (tabla 3). La disminución de los hemocitos ante la concentración más alta del metal se puede entender como uno de los efectos subletales del contaminante, ya que entre los mismos se ven alteradas algunas reacciones bioquímicas de naturaleza enzimática, lo cual conlleva a que se afecten algunos organelos celulares y por lo tanto generar alteraciones a nivel histológico y/o a nivel de procesos fisiológicos. Entre las reacciones bioquímicas/enzimáticas afectadas se encuentra el daño a mitocondrias, ADN y ribosomas, al respecto, Frías-Espericueta *et al.* (2011) indican que metales como cobre, cadmio y níquel tienen potencial genotóxico.

Autores indican que la disminución del recuento de hemocitos (hemocitopenia) puede

ser generada por apoptosis de los hemocitos. La apoptosis o muerte celular es una de las acciones citotóxicas del Cd en diversos organismos, siendo parte del efecto tóxico que éste le produce al sistema hematológico de los animales (Zhukalin *et al.*, 2007; De Frías *et al.*, 2018).

Debido al daño oxidativo que genera el Cd, ocurren modificaciones del ADN (). Una vez en la célula, el Cd presenta citotoxicidad al inhibir el proceso de reparación del ADN, la proliferación celular y las funciones supresoras de tumores, y provoca estrés oxidativo. Además, el Cd inactiva la proteína supresora de tumores p53, que es importante para la detención del ciclo celular (para evitar que la inestabilidad que se encuentra en el genoma se trasmite a las generaciones venideras) y la regulación de la apoptosis, se encuentra en el núcleo de las células y ayuda a controlar la división y destrucción de las células. evitando el desarrollo de cáncer. La vía de p53 se conoce como una red de intercomunicación de genes y proteínas que responde a diversas señales de estrés, bien sean intrínsecas o extrínsecas, que puede afectar a la replicación del ADN y la división celular. El Cd tiene la propiedad de inactivar la vía p53, induciendo así daño al ADN e inhibiendo la reparación del mismo (Fernández *et al.*, 2003; Harris y Levine, 2005; Aimola *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2020).

Al comparar los grupos expuestos B (0,10 mg/L) y C (1,00 mg/L) de Cd, es evidente que se ocurre una disminución en la producción de hemocitos debido, muy posiblemente, al aumento de la concentración del tóxico, indicando que el organismo a menor concentración de Cd, genera una respuesta inmune adecuada aumentando la producción celular; sin embargo, al encontrarse expuesto a mayores concentraciones del contaminante, el daño celular es quizás, irreparable, lo cual induce a la muerte celular, provocando de esta manera el descenso evidente del conteo hemocitario (Harris y Levine, 2005; Frías-Espericueta *et al.*, 2011).

El conteo total de hemocitos de los ejemplares de *E. portoricensis* presentó diferencias significativas por la exposición al Cd. Éste a la concentración de 0,10 mg/l del metal, provocó un aumento de hemocitos mientras que a 1,00 mg/L, generó un descenso, lo cual es característico del Cd, producir perturbaciones en la producción celular de los invertebrados, pues se han determinado que este metal es uno de los tóxicos que más variaciones significativas causa en la producción de hemocitos (Coles *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2017).

Parámetros celulares

Viabilidad celular

La tabla 4 muestra la viabilidad celular de los hemocitos de ejemplares de *E. portoricensis* del grupo control (acuario A) y del grupo expuesto a 0,10 mg/L de Cd (acuario B), presentando valores de 70,00±8,58% y de 60,50±10,47% de células vivas, respectivamente; el estadístico no demostró diferencias significativas ($p>0,05$) entre las medias obtenidas, lo que evidencia que las medias de ambos grupos, con respecto al parámetro evaluado, se comportan de la misma manera, indicando que, al parecer el tóxico, a esta concentración, no afecta de forma significativa la viabilidad de las células estudiadas.

Tabla 4. Resumen del análisis *t-Student* aplicado a la viabilidad celular de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd).

Acuario	N	Viabilidad (%) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
A	10	70,00±8,58	0,233801NS
B	10	60,50±10,47	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; p: distribución estándar; %: porcentaje de células vivas; NS: no hay diferencias significativas.

En la tabla 5 se observa el porcentaje de viabilidad de las células de la hemolinfa de *E. portoricensis* del grupo control y del grupo expuesto a 1,00 mg/L de Cd, en donde se muestran valores de $70,00 \pm 8,58\%$ y de $53,50 \pm 7,94\%$ de células vivas, respectivamente, el estadístico *t-Student* demostró que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos.

Tabla 5. Resumen del *t-Student* aplicado a la viabilidad celular de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)

Acuario	N	Viabilidad (%) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
A	10	$70,00 \pm 8,58$	0,034068*
C	10	$53,50 \pm 7,94$	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; p: distribución estándar; %: porcentaje de células vivas; NS: no hay diferencias significativas

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos con respecto a la viabilidad celular de los organismos expuestos a Cd: acuario B (0,10 mg/L de Cd) y acuario C (1,00 mg/L de Cd), arrojando promedios de $60,50 \pm 10,47\%$ y de $53,50 \pm 7,94\%$ de células vivas, respectivamente. El estadístico utilizado no encontró diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla 6. Resumen del análisis *t-Student* aplicado a la viabilidad de hemocitos en hemolinfa de ejemplares de *E. portoricensis* del acuario B (expuestos a 0,10 mg/L de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)

Acuario	N	Viabilidad (%) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
B	10	$60,50 \pm 10,47$	0,330511NS
C	10	$53,50 \pm 7,94$	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; p: distribución estándar; %: porcentaje de células vivas; NS: no hay diferencias significativas

La viabilidad de las células estudiadas presentó solo diferencias en los grupos pertenecientes al acuario A y C (tabla 5), en el acuario control se registró una viabilidad de 70,00%, cercano al encontrado por Naranjo (2012), el cual presenta una viabilidad de 75,00% en *Litopenaeus vannamei*, sin embargo, no se obtuvo variaciones tras la exposición a Cd, caso contrario ocurrido con los resultados

obtenidos en *E. portoricensis*, que al someterse a 0,10 mg/L de Cd, no existió significancia, sin embargo, disminuye significativamente al exponerse el organismo a 1,00 mg/l de Cd con respecto al grupo control, lo que evidentemente demuestra que el Cd, a la concentración evaluada (1,00 mg/L) y en ese lapso de tiempo, afecta la viabilidad celular.

En resultados obtenidos por Yang *et al.* (2003), quienes evaluaron la viabilidad de células de Leydig expuestas a variadas dosis de Cd, obtuvieron diferencias significativas con respecto al control, en donde la viabilidad de las células en los grupos expuestos a mayores concentraciones de Cd fue significativamente menor que en los grupos expuestos a menores concentraciones. Al respecto, los estudios realizados por Zhukalin *et al.* (2007), afirman que el Cd tiene un efecto negativo sobre la viabilidad, dependiendo de la dosis que sea aplicada, mostrada por los autores mediante la disminución de la viabilidad de tres líneas celulares tras exponerlas a concentraciones crecientes de Cd; de igual forma, Marcano *et al.* (2009) también encontraron reducciones significativas de la viabilidad celular en 2 especies de microalgas y que estas disminuciones eran más evidentes a medida que la concentración del metal aumentaba.

La viabilidad de las células de la hemolinfa de los ejemplares controles de *E. portoricensis* se podría considerar baja si se compara con otras especies u otro tipo de células, las cuales superan el 80,00% de viabilidad (Antón, 2014; Ravindran *et al.*, 2017), lo cual indica que posiblemente las células de este organismo son más frágiles, tal vez debido a que son más susceptibles a la manipulación o a cualquier otro agente estresor. Con respecto a la exposición al Cd, la viabilidad celular presentó variaciones significativas, puesto que esta disminuyó gradualmente al aumentar la concentración de 0,1 mg/L a 1,00 mg/L de Cd, siendo esto, una de las consecuencias de la exposición a este tóxico, haciéndose evidente que el metal, en base a estos resultados, quizás pudiera generar un desequilibrio en la respuesta inmunológica, así como la

alteración estructural de los linajes de las células de la hemolinfa de *E. portoricensis* (Núñez y Fernández, 2011; Geethanjali *et al.*, 2017).

Adherencia celular

Se muestra en la tabla 7 el resumen de la prueba estadística *t-Student* aplicada a la adherencia celular de los hemocitos del organismo *E. portoricensis* en el grupo control (acuario A) y grupo expuesto a 0,10 mg/L de Cd (acuario B), encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos comparados. La tabla 8, refleja el resumen de la prueba estadística realizada a la adherencia celular de los organismos del acuario A (control) en comparación con la adherencia celular obtenida en el grupo de organismos de *E. portoricensis* expuestos a 1,00 mg/L de Cd (acuario C), observándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

Tabla 7. Resumen de la prueba estadística *t-Student* aplicada a la adherencia celular de los hemocitos de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario B (expuestos a 0,10 mg/l de Cd)

Acuario	N	Adherencia (Células/campo) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
A	10	16,00±0,96	5,43E-05*
B	10	2,00±1,71	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; *p*: distribución estándar; *: diferencias significativas

Tabla 8. Resumen del análisis *t-Student* aplicado a la adherencia a la superficie de los hemocitos de *E. portoricensis* del acuario A (grupo control) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/L de Cd)

Acuario	n	Adherencia (Células/campo) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
A	10	16,00±0,96	0,000408*
C	10	6,00±1,91	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; *p*: distribución estándar; *: diferencias significativas

Así mismo, la tabla 9 muestra los resultados obtenidos con respecto a la adherencia de los hemocitos de los organismos expuestos a Cd, reflejando el análisis estadístico

realizado a los hemocitos pertenecientes al grupo de organismos procedentes del acuario B (0,10 mg/L de Cd) y acuario C (1,00 mg/L de Cd), mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 9. Resumen del análisis *t-Student* aplicado a la adherencia de los hemocitos de *E. portoricensis* del acuario B (expuestos a 0,10 mg/l de Cd) y acuario C (expuestos a 1,00 mg/l de Cd)

Acuario	N	Adherencia (Células/campo) ($\bar{X} \pm DS$)	<i>p</i>
B	10	2,00±1,71	0,044981*
C	10	6,00±1,91	

n: muestra; \bar{X} : media; DS: desviación estándar; *p*: distribución estándar; *: diferencias significativas.

Zhukalín *et al.* (2007) refieren que luego de exponer a una línea celular similar a los osteoblastos humanos a Cd, se observa que la adherencia celular es mayor tras aumentar la concentración de exposición. En esta investigación, por el contrario, los resultados muestran una disminución clara de la adherencia celular en las células provenientes de organismos expuestos con respecto a las células provenientes del grupo control, lo que se traduce en una pérdida de la adherencia celular de los hemocitos expuestos a las diversas concentraciones evaluadas. Lo que significa que efectivamente el Cd tiene la capacidad de ocasionar una pérdida representativa de la adherencia celular en los hemocitos de *E. portoricensis*.

Los compuestos del Cd pueden generar daño oxidativo sobre las células dado por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), esta producción de ROS es generada por la degradación de metalotioneinas en los endosomas, liberando el Cd libre al citosol. El daño oxidativo provoca modificaciones en el ADN, así como daño en las proteínas de membrana, necrosis y apoptosis celular. De igual manera, en animales vertebrados, el Cd se encuentra involucrado en la ruptura del complejo E-

caderina/ β -catenina, estas son proteínas encargadas de la adhesión celular (Fernández *et al.*, 2003; Johri *et al.*, 2010; Urquiza y Carezzano, 2013), lo cual pudiera ayudar a explicar la disminución significativa que se obtuvo en la adhesión celular hemocitaria en los organismos expuestos a Cd, así mismo, estudios realizados por Dong *et al.* (2009) muestran que el Cd causa disfunción endotelial con relación a la función de las integrinas, este hallazgo es importante ya que relaciona el efecto del Cd sobre la estructura y función de una proteína crucial en el proceso de adherencia y por tanto en el proceso de fagocitosis.

Aparentemente, la especie *E. portoricensis*, al ser expuesta a las concentraciones de Cd utilizadas en esta investigación, evidencia disminución notoria de las propiedades de adherencia de sus células hemocitarias, comprometiendo de esta manera una de las reacciones inmunológicas fundamentales para el mantenimiento de la integridad biológica de los organismos, como lo es la fagocitosis, ya que la adherencia es primordial para que el sistema inmunológico pueda armar, de forma exitosa, uno de los mecanismos primordiales de la respuesta inmune de este tipo de organismos (Rowley y Powell, 2007), la incapacidad de poder combatir cualquier agente extraño o patógeno al que pudiera enfrentarse, le generará un sistema inmunocomprometido por la exposición al Cd, aunado a que este metal, afecta tanto el número total de células como la estructura de estas, siendo así mismo, productor principal de estrés oxidativo (Núñez y Fernández, 2011; Ortega *et al.*, 2022), además de ser un metal capaz de causar daño significativo sobre la estructura molecular del colágeno, molécula fundamental en la composición de las membranas biológicas (Wright y Heggland, 2014).

Es también importante resaltar que estos resultados (adherencia y viabilidad), tienen relación con la morfología y citoarquitectura de la célula; el hecho que las células expuestas presenten anomalías en su membrana celular, da cuenta del efecto del Cd sobre las mismas, y esto se interrelaciona con los parámetros de viabilidad y

adherencia, ya que una célula con anormalidades, en una estructura tan fundamental para su integridad biológica como la membrana, por razones lógicas, no puede cumplir a cabalidad con sus funciones normales, así mismo, su tiempo de vida se acorta (Ghiasi *et al.*, 2010; Rowley y Powell, 2007; Wright, y Heggland, 2014), lo que se refleja en los hallazgos encontrados en la presente investigación. De igual manera, considerando que la adherencia es un mecanismo que forma parte fundamental de la respuesta inmune, y que depende de la exacta conformación del citoesqueleto, la cual a su vez depende en gran medida de la presencia de iones Ca^{2+} , y siendo el Cd un metal que afecta el metabolismo de este ion (Tvermoes *et al.*, 2011), es muy probable que quizás el metal está actuando en las células de la hemolinfa, reflejándose directa y/o indirectamente, sobre estos parámetros estudiados.

Todo lo anteriormente presentado, muestra unas condiciones donde se evidencian las consecuencias de la exposición al Cd. En la presente investigación fue posible observar, directa e indirectamente, las diferentes inducciones que ocasiona el Cd a diversos niveles (funcional, celular y morfológico), sobre algunos parámetros inmunes, así como sobre los componentes celulares hematológicos de *E. portoricensis* cuando es expuesto de forma crónica a una dosis subletal de Cd, lo que ejemplifica lo afirmado acerca de la complejidad del modelo de acción del Cd, ya que muchas rutas y procesos están, por lo general, sumamente involucrados e interrelacionados (Antón, 2014).

Todos estos resultados permiten inferir que las concentraciones de Cd utilizadas en esta investigación para el crustáceo *E. portoricensis*, ocasionan alteraciones evidentes en los parámetros hematológicos e inmunológicos evaluados, lo que causaría muy probablemente, comprometimiento de la respuesta inmune innata celular de estos organismos.

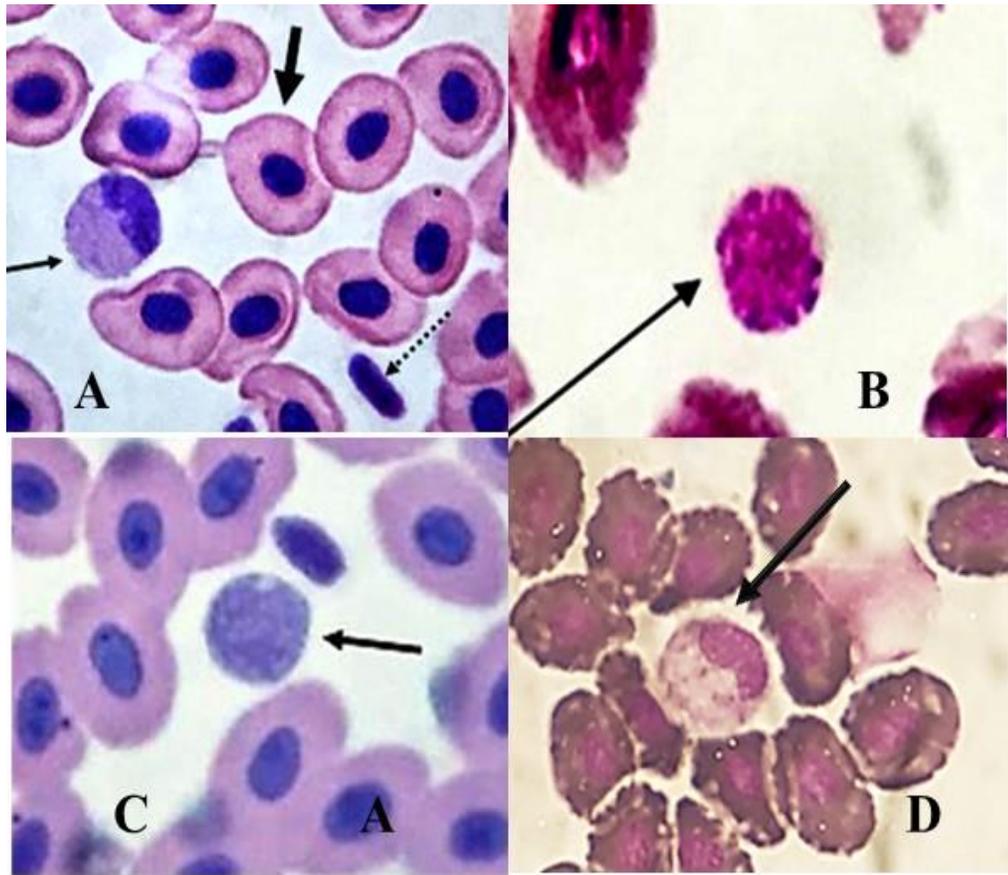
B) Resultados de los parámetros hematológicos y celulares del pez *A. brevifilis*

Descripción morfológica parcial de las células leucocitarias de *A. brevifilis*

Debido a que, hasta la fecha, no se había realizado la descripción de las células blancas de esta especie, se consideró necesario hacer esta definición parcial de las mismas ya que de esta manera se pudo dar una mejor idea del efecto del metal sobre ellas, complementando así, los hallazgos obtenidos.

En este estudio, la descripción parcial de la morfología de los glóbulos blancos permitió identificar cuatro (4) tipos de células diferentes (figura 7), las cuales se clasificaron como células granulocíticas de tipo neutrófilo (A) y basófilas (B); adicionalmente, se identificaron células semejantes a los linfocitos (células linfocíticas) (C) y células semejantes a los monocitos (D).

Figura 7. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. Las flechas negras sólidas largas señalan los tipos leucocitarios, la flecha sólida corta gruesa señala un eritrocito y la flecha negra punteada un trombocito. (A): célula granulocítica de tipo neutrófilo; (B): célula granulocítica de tipo basófila; (C): la flecha señala una célula linfocítica; (D): célula monocítica. Aumento 100X.

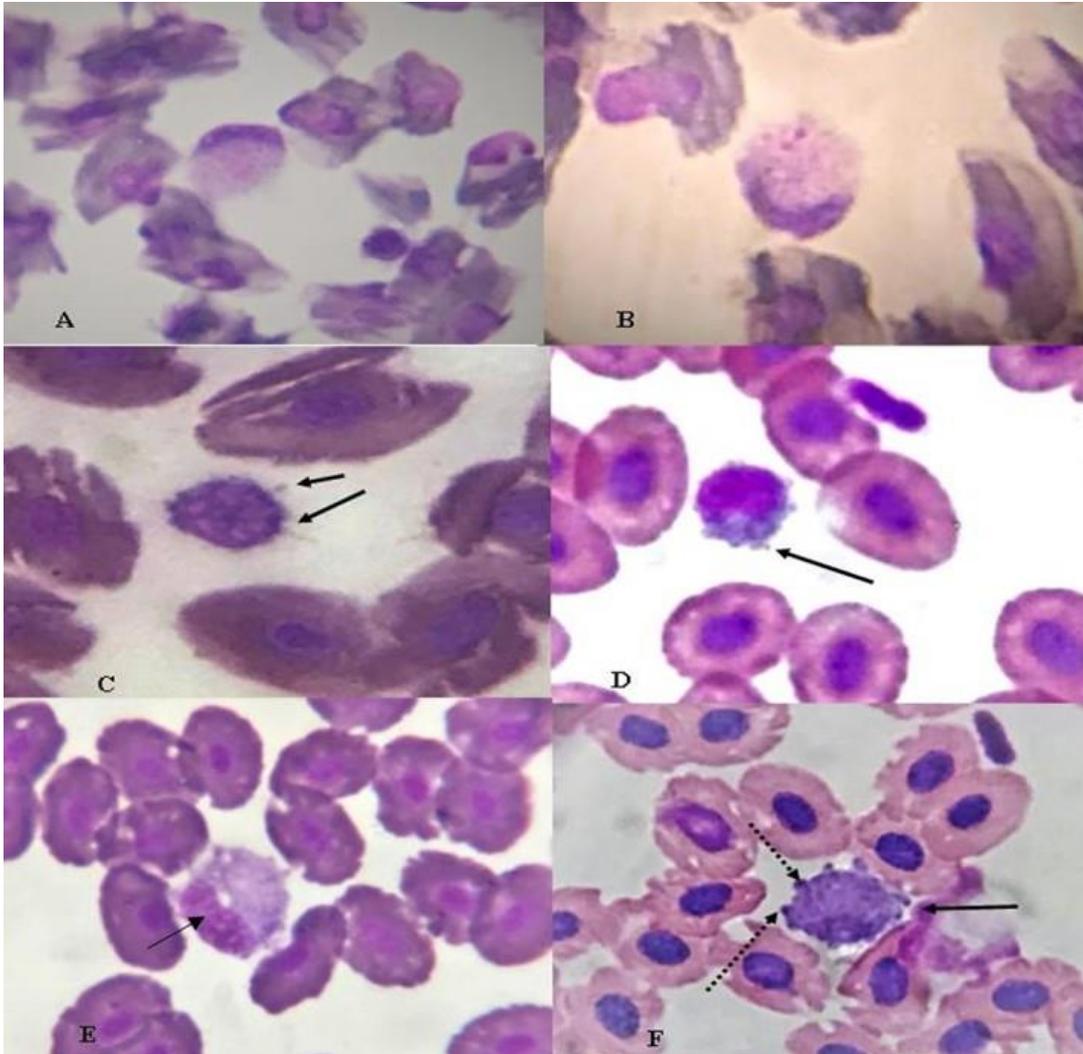


Morfología general de los leucocitos de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a 0,1mg/L de Cd.

La figura 8 muestra imágenes de leucocitos provenientes de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a 0,1 mg/L de Cd.

Figura 8. Leucocitos provenientes de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a 0,1 mg/L de Cd. (A) y (B): células del tipo neutrófilo: se distinguen perturbaciones de la membrana citoplasmática; (C) y (D): células linfocíticas, las flechas señalan proyecciones citoplasmáticas; (E): célula monocítica; (F): célula con protuberancias o vesículas en la membrana citoplasmática (flechas continuas), las flechas discontinuas

señalan las estructuras semejantes a gemaciones. Coloración: Giemsa. Aumento: 100X



En la figura 8 es posible notar que las células, en comparación con las células controles, presentan una serie de anormalidades, siendo una de las más resaltantes, la pérdida de continuidad de la membrana celular (figura 8A y 8B), así como la presencia de abundantes proyecciones citoplasmáticas en las células del tipo linfocito y monocítica (figura 8C, 8D y 8E), además de la presencia de unas células con unas características distintivas (figura 8F), las cuales, exhiben unas estructuras en la superficie de la célula en forma de gemaciones o burbujas. Resultados semejantes a estos fueron hallados por Antón (2014) en glóbulos blancos provenientes de

pronefros de ejemplares de *C. macropomum* expuestos a Cd, atribuyendo este hallazgo, en términos generales, a la acción que tiene el Cd sobre algunas proteínas de unión de membrana, como las integrinas y cadherinas.

Lo observado en esta investigación con respecto a los leucocitos de los organismos expuestos, pudiera también atribuirse al efecto directo del Cd sobre las proteínas de unión. Las cadherinas e integrinas son glicoproteínas transmembrana, dependientes del calcio (Ca), las mismas, son responsables de las uniones célula-célula y cuya función es mantener la integridad y estabilidad de los tejidos. Para que las cadherinas cumplan su papel correctamente requieren interactuar con los filamentos de actina del citoesqueleto y esta interacción se da a través de unas proteínas citosólicas llamadas cateninas, siendo este complejo (cadherina/catenina), responsable de la estabilidad celular (Takeichi 1990; Hajra y Fearon, 2002; Cavey y Lecuit, 2009).

El Cd tiene el potencial de competir con los sitios activos de otros metales dentro de las proteínas, sustituyéndolos, y en este caso, ocupando el lugar del calcio (Ca) en las cadherinas e integrinas, rompiendo el complejo cadherina/catenina (Prozialeck *et al.*, 2003; Wei y Shaikh 2015; Akin *et al.*, 2019), siendo esta otra posible razón por la cual se observen las alteraciones mostradas en las membranas de los leucocitos. Así mismo, el Cd, por sí solo, actúa como radical libre, causando también simultáneamente, peroxidación lipídica, la presencia del Cd dentro de la célula aumenta la producción de ROS por daños causados a organelos, específicamente a las mitocondrias, las cuales son altamente sensibles y vulnerables a metales pesados, lo que a su vez trae como consecuencia la peroxidación de lípidos de la membrana celular, provocando alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y el resto de los organelos celulares, en resumen, la consecuencia de la exposición a Cd *in vivo* es la estimulación de la producción de ROS en la cadena de transferencia de electrones mitocondrial y la inhibición de la

actividad NADPH oxidasa en la membrana plasmática (Heyno *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009; Cuyper *et al.*, 2010).

Los ácidos grasos poli-insaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen, aunque el hidroxilo original se ha inactivado, se forma un radical lipídico que puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo (R-OO), este puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido (R-OOH), el que en presencia de varios complejos metálicos como el Cd puede descomponerse en más radicales, incluyendo entre ellos al radical hidroxilo, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño, en el que se considera que la lipoperoxidación se ha propagado (Halliwell y Aruoma, 1991), siendo entonces este otro mecanismo, lo que quizás, también pudiera explicar la alteración de la morfología de los leucocitos observada en este estudio, implicando que el metal tiene efectos tóxicos sobre los tejidos leucopoyéticos.

En los peces, los valores de los parámetros hematológicos producto de la exposición a Cd varían, estos cambios no están siempre directamente relacionados con las concentraciones de los metales y el tiempo de exposición (Witeska *et al.*, 2010), ya que estas variaciones pueden ser el resultado de la translocación de Cd dentro del organismo (Edward *et al.*, 2013), lo cual trae como consecuencia que tenga acción tóxica en varias vías reguladoras y/o metabólicas, deteriorando las funciones de estas. En esta investigación se puede notar que el Cd, no sólo afecta a las células circulantes de la sangre como lo señalan autores como Witeska *et al.* (2009), quienes hallaron reducciones significativas de los leucocitos en el pez *Cyprinus carpio* luego de someterlo a una dosis subletal de Cd y Salazar-Lugo *et al.* (2009), quienes tras

exponer a ejemplares juveniles de *C. macropomum* a Cd y a variaciones de temperatura, encontraron, que estos organismos no solo incrementan los valores de células linfocíticas y disminuyen las células de tipo neutrófilas luego del periodo de exposición, sino que el Cd también interfiere con el desarrollo y morfología de los leucocitos, como se pudo observar en los frotis.

Datos recabados en relación con los efectos hematopoyéticos de los metales pesados en los peces y mamíferos, señalan que estas sustancias son citotóxicas para las células precursoras, de igual forma, diversos linajes celulares muestran diferente sensibilidad a la toxicidad del metal (Celik *et al.*, 2005, 2009; Som *et al.*, 2009; Antón-Marín, 2022)

La presencia de las proyecciones citoplasmáticas en las células observadas en el presente trabajo, concuerdan que el estrés genotóxico puede provocar muerte celular tanto apoptótica como necrótica, dependiendo de la intensidad del tratamiento. Durante la apoptosis las células muestran una contracción nuclear, citoplasmática y fragmentación de la cromatina; mientras la membrana muestra yemas redondeadas (vesículas extracelulares), las llamadas "*bubbles cells*", las cuales son estructuras características del proceso de apoptosis, aunque aún se desconoce su función real, se las ha relacionado con procesos metastásicos (Antón 2014; Wang y Cheng, 2015; Wei y Shaikh, 2017).

Parámetros hematológicos

En la tabla 10 se presentan los valores de los diversos parámetros hematológicos determinados en ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a de 0,1 mg/L de Cd, así como en los organismos controles.

Tabla 10. Resumen de la prueba estadística *t-Student* aplicada a los diferentes parámetros hematológicos hallados en ejemplares de *Ancistrus brevifilis* controles y expuestos a una concentración subletal de 0,1 mg/L de Cd.

Parámetros	Control ($\bar{X} \pm DE$)	Expuestos ($\bar{X} \pm DE$)	<i>p</i>
Hemoglobina (g/dl)	10,32 ± 1,86	5,11 ± 0,91	0,00009*
Hematocrito (%)	29,85 ± 4,87	19,85 ± 7,33	0,00132*
Glóbulos rojos (10 ⁶ cels/mm ³)	3,73 ± 0,83	2,72 ± 0,42	0,01871*
Glóbulos blancos (cél/mm ³)	5391 ± 1047,75	3987 ± 585,13	0,01243*
Células granulocíticas de tipo neutrófilo (%)	48,57 ± 6,24	29,57 ± 8,50	0,00058*
Células monocíticas (%)	32,57 ± 7,06	34,28 ± 10,11	0,79193 NS
Células linfocíticas (%)	18,71 ± 4,34	34,00 ± 9,20	0,00323*

\bar{X} : Promedio; DE: desviación estándar; *: diferencias significativas; NS: no significativo, g/dl: gramos por decilitros; %: porcentaje; cels/mm³: células por milímetros cúbicos; 10⁶ cels/mm³: millones de células por milímetros cúbicos; *p*: < 0,05.

El presente estudio reveló que en comparación con el grupo control, en el pez *A. brevifilis* la exposición a 0,1 mg/L de Cd durante 15 días, causa una reducción significativa de los parámetros hematológicos, tales como la Hb, el Hto así como el conteo total de glóbulos rojos y de glóbulos blancos. Estos resultados están en concordancia con los de Gill y Eppel (1993) y Karuppasamy *et al.* (2005), quienes encontraron un descenso significativo en los glóbulos rojos, de la Hb, así como del Hto, en la anguila americana *Anguilla rostrata* y en el pez *Channa punctatus*, correspondientemente, después de la exposición a Cd.

De igual forma, estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Mekkawy *et al.* (2011) en *O. niloticus*, quienes reportaron que los peces expuestos a una dosis subletal de Cd durante 15 días mostraron una disminución apreciable en sus glóbulos rojos, de la concentración de Hb y del porcentaje del Hto. Resultados semejantes también fueron observados en un estudio realizado en el pez dulceacuícola *C. macropomum* expuesto a Cd por Salazar-Lugo *et al.* (2011), quienes igualmente

obtuvieron disminuciones de los mismos parámetros.

En los peces, el Cd es bien conocido por inducir toxicidad en las células sanguíneas, a menudo dando lugar a anemia e inmunosupresión (Seong-Gil *et al.*, 2004; Witeska *et al.*, 2009, 2010). La reducción de los parámetros hematológicos anteriormente citados, luego de la exposición a niveles sub-letales de Cd, podría deberse a la destrucción de los glóbulos rojos maduros y/o, a la inhibición de la producción de los mismos debido a una reducción de la hemosíntesis lo que a su vez, produce una hematopatología o causa una crisis hemolítica aguda, lo que conlleva a una anemia severa y a una liberación de iones de hierro (Fe), lo que, por consiguiente, aumenta el estrés oxidativo (Khadre, 1988, Emerit *et al.*, 2001; Nemeth, 2008; Nasser *et al.*, 2015). La anemia que se presenta por exposición crónica al Cd, en el pez *A. brevifilis*, posiblemente también se relacione con la acción directa de este metal sobre los centros hematopoyéticos, que en los peces se encuentra especialmente en el riñón anterior o cefálico, principal órgano de acumulación del Cd en estos organismos (Aitio y Tristcher 2004; Antón, 2014).

El Cd induce estados de anemia en diferentes organismos, considerándose para ello varios mecanismos: a) Por hemólisis debido a una disminución en la capacidad de deformabilidad de los glóbulos rojos (Kunimoto *et al.*, 1985), esto es debido a que el Cd se acumula en los glóbulos rojos afectando el citoesqueleto, lo que ocasiona la destrucción prematura de los mismos por el bazo; b) por deficiencia de Fe, ya que compite con la absorción del Fe duodenal (Hamilton y Valberg, 1974; Horiguchi, 2007), y c) por la anemia renal derivada de la disminución en la síntesis de la eritropoyetina (EPO) (Horiguchi *et al.*, 2010), la cual es una hormona glicoprotéica eritroide específica, producida en los riñones y que se encarga de regular el volumen de glóbulos rojos; Horiguchi *et al.* (2006), proponen que los tres mecanismos se desarrollan interdependientemente con el Fe, siendo este metal un factor común en estos; por otro lado, Azziz *et al.* (2015) determinaron que el Cd puede inducir un

desorden conformacional de la molécula de Hb a nivel de su estructura terciaria y cuaternaria, esto causado por la sustitución del Fe por Cd en la molécula de Hb, lo que, lógicamente, impide el uso eficiente del Fe durante la síntesis de la Hb (Horiguchi, 2007).

En los organismos expuestos a 0,1 mg/L Cd los hallazgos, en cuanto a la concentración de Hb, el porcentaje de Hto y concentración de eritrocitos indican que, en los mismos, el metal promueve estados de anemia, lo que incide a la larga, en el estado de salud de los peces, interfiriendo, por lo tanto, en el normal desarrollo y en la sobrevivencia de los mismos.

Los resultados hallados con respecto a la cantidad de leucocitos, muestran una disminución de estos en los ejemplares del pez *A. brevifilis* expuestos a Cd ($3\,987 \pm 585,13$) en comparación con los organismos controles ($5\,391 \pm 1047,75$), encontrándose diferencias significativas ($p= 0,01243$), una posible explicación es que podría deberse a daños del tejido leucopoyético, al respecto, Salazar-Lugo *et al.* (2010) demostraron daños a nivel del riñón cefálico del pez *C. macropomum* inducidos por la exposición al Cd, de la misma forma, Antón-Marín *et al.* (2015) demostraron, en ese mismo organismo, que el Cd tiene efectos nocivos sobre el riñón cefálico, alterando tanto a los precursores maduros como a los progenitores primitivos hematopoyéticos, induciendo apoptosis celular y/o necrosis del tejido hematopoyético en sí, señalando la afectación significativa de este tipo de células sanguíneas debido a la exposición al metal. De igual manera, Ghiasi *et al.* (2010) en *C. carpio*, estudiando los efectos de dosis subletales de Cd sobre el sistema inmune, hallaron disminuciones significativas de la cantidad total de leucocitos, y que la misma dependía del tiempo de exposición al tóxico, así como de la concentración.

En cuanto a los tipos de glóbulos blancos que se presentaron en mayor número en los ejemplares de *A. brevifilis* controles, fueron las células granulocíticas de tipo neutrófilos ($48,57 \pm 6,24$), seguidas de las monocíticas ($32,57 \pm 7,06$), luego las linfocíticas ($18,71 \pm 4,34$) y en menor proporción, las células granulocíticas de tipo basófilas ($0,14 \pm 0,37$), mientras que en los peces expuestos al Cd se presentó disminución significativa en las células granulocíticas de tipo neutrófilos ($29,57 \pm 8,50$; $P=0,00058^*$) y un aumento en las linfocíticas ($34,00 \pm 9,20$; $p=0,79193^*$); sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en las células monocíticas (tabla 2). Estos resultados concuerdan con los de Salazar-Lugo *et al.* (2009), en el cual hubo un aumento de las células linfocíticas y disminución de las granulocíticas de tipo neutrófilo en el pez *C. macropomum* expuesto a Cd, contrario a los resultados encontrados por Moura *et al.* (1994), en donde se presentó una disminución de linfocitos circulantes en *C. macropomum* expuesto a Cd.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que, posiblemente, estos tipos celulares responden a perturbaciones de naturaleza química, tal como el Cd, lo cual puede llevar al pez a un estado de estrés y por consiguiente a la aparición de patologías que pudieran desencadenar en un desequilibrio funcional del principal órgano encargado de producir los leucocitos. En tal sentido, este hecho puede que sea producto de un mecanismo de defensa activado por los órganos leucopoyéticos del pez en un intento por equilibrar la cantidad de glóbulos blancos circulantes, los cuales se han visto seriamente perjudicados por la acción del Cd, ocasionando a su vez, la alteración de las funciones normales de los órganos vitales (Tavares *et al.*, 2001).

Las respuestas obtenidas de parte de los peces expuestos al metal, en cuanto a los valores totales y porcentuales de los leucocitos, permiten inferir que en *A. brevifilis*, la respuesta inmune, sobre todo, la de tipo celular, se encuentra seriamente afectada por la exposición al Cd, por ende, se encuentra debilitado o vulnerable ante cualquier agente extraño.

En la tabla 11 se muestra el análisis *t-Student* aplicado a los valores promedios de los índices hematimétricos en ejemplares de *A. brevifilis* controles y expuestos a una dosis de 0,1 mg/L de Cd, mostrando diferencias significativas en la hemoglobina corpuscular media (HCM), mientras que con respecto al volumen corpuscular medio (VCM) y en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) no se hallaron diferencias significativas

Tabla 11. Resumen estadístico del *t-Student* aplicado a los índices hematimétricos hallados en ejemplares de *A. brevifilis* controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio de 0,1 mg/dL

Parámetros	Control ($\bar{X} \pm DS$)	Expuestos ($\bar{X} \pm DS$)	p
Hemoglobina corpuscular media (pg)	3,87±0,65	1,88 ± 0,25	0,00678*
		7	
Volumen corpuscular medio(fl)	8,22 ± 1,22	,09 ± 1,87	0,21087 NS
Concentración de hemoglobina corpuscular media (%)	34,28±1,60	28,06±7,79	0,07733 NS

\bar{X} : Promedio; DS: desviación estándar; *: diferencias significativas; NS: no significativo; fl: fentolitro; pg: picogramos; %: porcentaje; p: < 0,05.

Estos resultados difieren con los de Salazar-Lugo *et al.* (2011) en el pez *C. macropomum*, donde, tras la exposición al Cd se produjo un aumento en el VCM, a diferencia del HCM, donde hubo disminución significativa y la CHCM que no mostró diferencias significativas ante la exposición al Cd con relación al grupo control. En tal sentido, a la vista de los resultados obtenidos en esta investigación, se podría señalar que se presenta una anemia hipocrómica, esto puede deberse a que, tras la exposición al Cd, en los peces, ocurren daños a nivel de la hemoglobina, ya sea disminución de la síntesis de la molécula o en el plegamiento de la misma, ya que el Cd causa daño a niveles de ciertos organelos celulares como los ribosomas

encargados de la producción de globinas y las mitocondrias, encargados de producir el grupo hemo, así mismo el Cd puede desplazar el ión ferroso (Fe^{2+}) causando anomalía en la conformación estructural de esta proteína de transporte, o también causar alteraciones a nivel de los tejidos y órganos que impiden la normal maduración y producción de eritrocitos debido a una hematopoyesis ineficiente (Karupassamy *et al.* 2005; Chatterjee y Saxena, 2015).

Con respecto al análisis realizado a los valores obtenidos para la viabilidad de los glóbulos blancos, así como los de adherencia de PMN a superficies en ejemplares de *A. brevivilis* controles y expuestos a 0,1 mg/L, la prueba estadística demostró diferencias significativas entre ambos parámetros evaluados (tabla 12)

Tabla 12. Viabilidad celular y adherencia de polimorfonucleares en ejemplares de *A. brevivilis* controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio.

Parámetros	Control ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	Expuestos ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	p
Viabilidad celular (%)	91,71 \pm 6,15	78,00 \pm 4,24	0,0000*
Adherencia de PMN (cél/c)	56,57 \pm 11,60	18,28 \pm 3,68	0,0005*

\bar{X} : Promedio; DE: desviación estándar; PMN: polimorfonucleares; *: diferencias significativas, células/c: células por campo; %: porcentaje; p: < 0,05.

Estos resultados pudieran reflejar una similitud con el trabajo realizado por Vargas *et al.* (2012) sobre la respuesta inmune innata del pez *C. macropomum*, quienes expusieron a este pez a metales pesados como Cd y Cu, donde los organismos expuestos mostraron un descenso muy significativo de la viabilidad de las células sanguíneas en comparación con los organismos controles, a diferencia de lo hallado por Salazar-Lugo *et al.* (2011), quienes no hallaron variaciones con respecto a la viabilidad celular cuando evaluaron las respuestas de la inmunidad innata en el pez *C. macropomum* expuesto a Cd, donde no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los grupos de peces expuestos y controles. Los resultados hallados en este trabajo posiblemente pudieron deberse a un efecto inmunotóxico bajo

la exposición al Cd lo que podría inducir la muerte celular, impidiendo que las mismas cumplan con funciones inmunológicas posteriores como la quimiotaxis, adherencia y fagocitosis ante agentes externos. Al respecto Velásquez-Vottelerd *et al.* (2015), trabajando con la especie *Ancistrus* exponiéndola a la misma concentración subletal de Cd, determinaron disminución de la viabilidad mitocondrial (VM) y afección en los tioles solubles en ácido (TSA), lo cual puede indicar que hubo aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva, invariablemente, a un aumento en el estrés oxidativo.

Las mitocondrias son unos organelos esenciales para la generación de ATP, están involucradas en otros procesos como la generación natural de especies reactivas del oxígeno (ROS), la muerte celular y los procesos de envejecimiento (Chaiyarit y Thongboonkerd, 2009). Se cree que la función mitocondrial está altamente sintonizada y propensa al daño por metales pesados (Adiele *et al.*, 2010). La presencia de metales como el Cd, aumentan de manera trascendental la producción de ROS, lo que resulta en la peroxidación de lípidos, la escisión del ADN mitocondrial y la inhibición de la síntesis de ATP, lo que conlleva a daño mitocondrial e inducción de apoptosis (Cuypers *et al.*, 2010), pudiendo esto sugerir que posiblemente, en las células estudiadas, esté ocurriendo un proceso similar mediante el cual, el metal está disminuyendo la viabilidad de los leucocitos, es decir, actuando a nivel de las mitocondrias de este tipo de célula aumentando las ROS.

Por su parte, los resultados obtenidos con relación a la adherencia celular en ejemplares de *A. brevipilis*, mostraron diferencias significativas entre el grupo control y expuestos a 0,1 mg/L de Cd; estos hallazgos tiene similitudes a los obtenidos en el estudio realizado por Liu *et al.* (2011), quienes estudiaron el efecto del metal a nivel de las células hepáticas en ratas, donde presumen que la disminución de la respuesta fagocítica en las modalidades evaluadas (adherencia celular) se debe a una respuesta tóxica no específica ante el Cd relacionada con sus propiedades fisicoquímicas, entre

las que se encuentran la afinidad por los grupos sulfidrilos (-SH), hidróxilos (-OH) y carboxilo (-COOH) encontrados en las biomoléculas y a su acción competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales, tales como Zn, Fe y Ca, provocando así la inhibición de las enzimas y las estructuras de ciertas proteínas claves que participan en el proceso de adhesión celular (Mousa, 2004).

Dong *et al.* (2009), realizaron un estudio donde mostraron que el Cd causa disfunción endotelial con relación a la función de las integrinas y las caderinas; dicho descubrimiento es relevante, ya que relaciona el efecto del Cd sobre la estructura y función de proteínas cruciales en el proceso de adherencia y por tanto en el proceso de fagocitosis, lo cual concuerda con el resultado encontrado por Marcano (2011) acerca de la disminución de Ca y Mg en peces expuestos a Cd, los cuales son metales fundamentales para el buen funcionamiento de estas proteínas, lo que sugiere que este es uno de los mecanismos por el cual el Cd influye en el proceso de fagocitosis, afectando la estructura de las integrinas y caderinas y por ende, alterando la fagocitosis, lo que se traduce en disminución de la efectividad de la misma, haciendo que los organismos sean más propensos a infecciones, lo que en consecuencia podría conducir a patologías y/o a una eventual muerte del organismo afectado (Antón, 2014).

De igual manera, el posible aumento de las ROS, conlleva a su vez, a dañar, las proteínas que intervienen en el proceso de adhesión, como por ejemplo, las integrinas, las cuales son sensibles a los cambios en el nanoambiente de los lípidos de membrana (Akin *et al.*, 2019), en consecuencia, alteradas estas proteínas, las células disminuyen su capacidad de adhesión y por lo tanto, de migración, lo que afecta de forma directa, al proceso de fagocitosis, deteriorando, seguramente, la efectividad de la misma, situación que condenaría al organismo a sufrir de diversas patologías, ya sea estas

debidas al efecto directo del metal sobre las células, o como el relacionado con el ataque de organismos oportunistas y/o patógenos (Anexo 3).

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran el efecto perjudicial que causa el Cd sobre los parámetros hematológicos e inmunológicos evaluados en el pez *A. brevifilis* expuestos a una dosis subletal de Cd, sino también sobre el tegumento de los organismos de estudio. El hecho que se evidenciaran alteraciones en la concentración de eritrocitos y de Hb, denota la capacidad que tiene el metal de alterar de forma sustancial estos parámetros en el pez, provocando cuadros de anemia, conllevando esta situación, muy posiblemente, a la afectación de la salud general de los organismos, lo que impediría a éste, poder desarrollarse de forma satisfactoria; de igual manera, el efecto del Cd sobre las respuestas celulares evaluadas, relacionadas con la capacidad inmunológica (concentración de leucocitos, adherencia y viabilidad), según las observaciones obtenidas a lo largo de la presente investigación, pudieran señalar la alteración de la capacidad de las células blancas de cumplir con su papel como guardianes de la integridad del buen estado de salud del organismo, es decir, el Cd es un elemento capaz de causar alteraciones en el sistema hematopoyético e inmune innato del pez, y por consiguiente, comprometer la integridad biológica así como la viabilidad del organismo. En términos generales, a la luz de los resultados obtenidos, se puede suponer que el Cd tiene la capacidad de alterar, mediante varias vías, quizás simultáneas, el sistema hematopoyético e inmune de los organismos estudiados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con respecto al conteaje y a la morfología de los hemocitos de *E. portoricensis*, sugieren, que el efecto del Cd, en el lapso evaluado, es, para esta especie, tóxico-dependiente.

E. portoricensis exhibió cierta capacidad de respuesta celular para enfrentar la presencia del tóxico, sin embargo, al sobrepasarse esta capacidad, el metal afectó de forma negativa esta respuesta.

La exposición a las dos concentraciones de Cd utilizadas, en el tiempo evaluado, alteran la funcionabilidad del proceso de fagocitosis de los hemocitos de *E. portoricensis*, lo que por ende ocasionaría, la depresión del sistema inmune del crustáceo, dejándolo indefenso ante cualquier agente patógeno y/o oportunista, afectando así, la integridad del organismo.

Las anormalidades observadas en los leucocitos de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a Cd, sobre todo a nivel de membrana celular, demuestran el potencial que tiene el metal de afectar las membranas celulares y la sensibilidad de las mismas al metal.

En los peces expuestos, las alteraciones en el Hto, la Hb, el conteaje total de eritrocitos, así como en la HCM, sugieren que el Cd afecta en alguna medida, cuando se expone a la dosis evaluada y durante el tiempo utilizado, al sistema eritropoyético en *A. brevifilis*.

La disminución del conteaje de los leucocitos en los individuos expuestos al metal, evidencia el efecto del tóxico a esa concentración y durante el tiempo estudiado sobre el linaje leucopoyético de *A. brevifilis*.

Las alteraciones de los parámetros inmunológicos evaluados (adherencia y viabilidad celular) en *A. brevis* evidencian, no solo el efecto del metal sobre el sistema inmune del organismo, sino que también sugiere, por tanto, la perturbación del estado de salud de este.

Estos resultados demuestran el efecto del Cd sobre el tejido eritrocitario y leucopoyético de *A. brevis*.

BIBLIOGRAFÍA

Adiele, R.; Stevens, D. y Kamunde, C. 2010. Reciprocal enhancement of uptake and toxicity of cadmium and calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver mitochondria. *Aquat. Toxicol.* 96: 319–327.

Aimola, P.; Carmignani, M.; Volpe, A.; Di Benedetto, A.; Claudio, L.; Waalkes, M.; Van, A.; Tokar, E. y Claudio, P. 2012. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells. *Public Library Sci*, 7: e33647.

Aitio, A. y Tristcher, A. 2004. Effect on health of cadmium. WHO Approaches and conclusions. *Biometals*, 17(5): 491-492.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2000. Toxicological Profile for Cadmium (Update). U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia.

Agency for Toxic Substances Disease Registry (ATSDR). 2012. “Public Health Statement for cadmium”. <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>> (09/04/2012).

Aguilera, L. y Carvajal, J. 1976. La ictiofauna del complejo hidrográfico río Manzanares, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanog. Venezuela. Univ. Oriente*, 44(2): 75-87.

Akin, R.; Hannibal, D.; Loida, M.; Stevens, E.; Grunz-Borgmann, E. y Parrish, AR. 2019. Cadmium and lead decrease cell-cell aggregation and increase migration and invasion in Renca mouse renal cell carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 20(24):6315-6320

Almeida, L.; Araújo, C.; Caio, R.; Dias, C.; Pereira, S. y Amaro, M. 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 133:176- 187.

Alvitrés, V.; Chanamé, J.; Fupuy, J.; Chambergó, A. y Cortez, M. 1999. Cambios en la prevalencia de los helmintos parásitos de *Emerita analoga* por efecto de “El Niño 1997-97”. *Revista Peruana de Biología*, 1: 69-76.

Annabi, A.; Said, K. y Messaoudi, A. 2013. Cadmium: bioaccumulation, histopathology and detoxifying mechanisms in fish. *Amer. J. Res Communi*, 1(4): 60-79.

Antón, M. 2011. Parámetros citológicos, inmunológicos y estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo *Pinctada imbricata* expuesto a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Antón, Y. 2014. El sistema inmune innato del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) como modelo para estudios de inmunotoxicidad. Tesis Doctorado. Universidad de Oriente. Cumaná. 234pp

Antón, Y.; Lemus, M. y Chung, K. 2005. Niveles de Na⁺, K⁺ y Ca⁺² en hemolinfa de *Emerita portoricensis* (Crustacea: Decapoda) durante su ciclo de muda en condiciones de laboratorio. *Boll Inst Oceanogr Venezuela*, Universidad de Oriente, 44(1): 59-66.

Antón-Marín, Y. y Salazar-Lugo, R. 2009. Sistema inmune de los invertebrados. *Rev Electrón Veterinaria*, 10(9): 467-481.

Antón-Marín, Y. 2022. Evaluación de la inmunidad innata celular en polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomun* expuestos a una dosis subletal de cadmio. *Servolab Sci. News*. 1: 45-57.

Antón-Marín, Y.; Rojas, L. y Salazar-Lugo, R. 2015. Ultrastructural changes induced by cadmium in pronephros of *Colossoma macropomum*. *Rev. Científica. FCV-LUZ*. 25(4): 338-345.

Arencibia, D.; Rosario, L. y Curveco, D. 2009. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel*, 19: 40-52.

Arredondo, L.; Benítez, R. y Lemus, M. 2012. Efecto del cadmio sobre la respuesta celular celómica de *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). *Rev Toxicol en línea*, 1:1-17.

Azañero, C.; Reyes, W.; Lujan, H.; Rodriguez, R. y Saucedo, F. 2006. Caracterización hemocitaria del Camarón de Río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) del río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú). *Comunicación Científica*, 2006: 774-781.

Azziz, S.; Moussa, S. y Atef, M. 2015. Conformational disorder of hemoglobin in cadmium toxicity induced in albino rats. *Wulfenia*, 32(3): 32-47.

Banu, S.; Stanley, J.; Lee, J.; Stephen, S.; Arosh, J.; Hoyer, P. y Burghardt, R. 2011. Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-

cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Applied Pharmacol.*, 251(3): 253-266.

Bianchi, T. y Canuel, B. 2011. *Chemical biomarkers in aquatic ecosystems*. Pricenton, University Press. New York.

Blaxhall, P. y Daisley, K. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5: 771-781

Boere, V.; Cansi, E.; Alvarenga, A. y Silva, I. 2011. The burying behavior of the mole crabs before and after an accident with urban sewage effluents in Bombinhas Beach, Santa Catarina, Brazil. *Ambi-Agua*, 6(3): 70-76.

Bosch, A.; O'Neill, B.; Sigge, G.; Kerwath, S. y Hoffman, L. 2016. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. *J. Sci. Food Agric.* 96: 32-48.

Bouck, G. y Ball, R. 1966. Influence of capture methods on blood characteristics and mortality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Transatlantic Amer. Fish. Soc.*, 95(2): 170-176.

Braxhall, P. 1972. The hematological assessment of the health of freshwater fish. *J. Fish. Biol.*, 4: 593-604.

Boyd, R. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *J Chem Ecol*, 36: 46-58.

Briner, W. 2010. Toxicity from metals, old menaces and new threats. *Inter J Environ Res Pub Health*, 7(12): 4278- 4280.

Burgeot, T.; Akcha, F.; Ménard, D.; Robinson, C.; Loizeau, V.; Brach-Papa, C.; Martínez-Gómez, C.; Le Goff, J.; Budzinski, H.; Le Menach, K.; Cachot, J.; Minier, C.; Broeg, K. y Hylland, K. 2017. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Mar Environ Res.* 124: 92-105.

Campbell, T. y Murray, F. 1990. An introduction to fish haematology. *Corp. Cont. Educ. Veterin. Sci.*, 12: 323-533

Cao, C.; Liu, Y.; Wang, W.; Dong, J.; Yang, D.; Liu, H.; Ran, W.; Qu, Y. y Zhao, J. 2018. Seawater acidification aggravated cadmium toxicity in the oyster *Crassostrea gigas*: Metal bioaccumulation, subcellular distribution and multiple physiological responses. *Sci Total Environ.* 642(15): 809-823.

- Capó, M. 2007. *Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. Editorial Tebar, España.
- Carlini, A.; Coria, N.; Santos, M.; Negrete, J.; Juarez, M. y Daneri, G. 2009. Responses of *Pygoscelis adeliae* and *P. papua* populations to environmental changes at Isla 25 de Mayo (King George Island). *Polar Biol.*, 32: 1427-1433.
- Cavey, M. y Lecuit, T. 2009. Molecular base of Cell-cell junctions; Stability and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 1(5): 50-60.
- Celik, A.; Buyukakilli, B.; Cimen, B.; Tasdelen, B.; Ozturk, M. y Eke, D. 2009. Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male Wistar rats. *Toxicol. Mech. Meth.*, 19: 135- 140.
- Celik, A.; Comelekoglu, U. y Yalin, S. 2005. A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis. *Toxicol. Ind. Health*, 21: 243- 248.
- Chaiyarit, S. y Thongboonkerd, V. 2009. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal. Biochem*, 39:249–258.
- Chatterjee S. y Saxena, R. 2015. Preferential elimination of older erythrocytes in circulation and depressed bone marrow erythropoietic activity contribute to cadmium induced anemia in mice. *PLOS ONE* 10(7): 32-69
- Chaves, H.; Arcoverde, A.; Rocha, L.; Javorski, N.; Parreira, P. y Silva, J. 2013. Ecologia populacional de *Emerita brasiliensis* em duas praias na costa litorânea no estado de Pernambuco. *Natureza on line*, 4(2): 67-71.
- Chiarelli, R. y Roccheri, M. 2014. Marine invertebrates as bioindicators of heavy metal pollution. *Open J Metal*, 4(4): 93-106.
- Ching, C. 2019. “Understanding shrimp hemocytes”. “Global aquaculture advocate”. <<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/understandingshrimphemocytes/?healdlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZBA>> (28/01/2019).
- Chovanec, A.; Hofer, R. y Schiemer, F. 2003. *Fish as bioindicators*. En *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*. Elsevier Science. B. Markert, A. Breure y H. Zechmeister. New York. 639- 676pp. ISSN 1875-1114.
- Concon, J. 2009. *Heavy metals in food*. In: *Food Toxicology, Part B: Contaminants and additives*. New York, Dekker, 3(4): 1043-1045.

- Contreras, H.; Jaramillo, E. y Quijón, P. 2000. Natural history of *Emerita analoga* (Stimpson) (Anomura, Hippidae) in a sandy beach of northern Chile. *Rev Chilena Hist Nat*, 73: 705-715.
- Coombs, T. 1979. Cadmium in aquatic organisms. En: *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Amsterdam, Elsevier/North Holland, pp. 93-139.
- Correa-Negrete, J.; Garrido, A.; Prieto, M.; Atencio, V. y Pardo, S. 2009. Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*. *Zootecnia Trop.*, 27(4): 393-405
- Corsolini, S. 2009. Review: Industrial contaminants in Antarctic biota. *J Chromat*, 1216: 598-612.
- Costa, M.; Prado, M.; Gestal, C.; Li, H.; Roch, P.; Novoa, B. y Figueras, A. 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol*, 26(3): 515-523.
- Curtosi, A.; Pelletier, E.; Vodopivec, C.; Louis, R. y Mac, W. 2010. Presence and distribution of persistent toxic substances in sediments and marine organisms of Potter Cove, Antarctica. *Archiv Environmen Contam Toxicol* 59: 582-592.
- Cuypers, A.; Plusquin, M.; Remans, T.; Jozefczak, M.; Keunen, E.; Gielen, H.; Opendakker, K.; Ravindran, Nair, A.; Munters, E.; Artois, T.; Nawro, T.; Vangronsveld, J. y Smeets, K. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23(5): 927-940.
- De Frías, M. 2018. Efectos neurotóxicos del cadmio sobre las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y su implicación en la inducción de alteraciones cognitivas. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Dong, Z.; Wang, L.; Xu, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Z. y Miao, Z. 2009. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. *Toxicol in vitro*, 23(1): 105-110.
- Duressa, T.; Vanlaer, R. y Huybrechts, R. 2015. Locust cellular defense against infections: sites of pathogen clearance and hemocyte proliferation. *Develop Comp Immunol*, 48: 244-253.
- Dutra, J.; Régis, R. y Krohling, W. 2011. Ocorrência de *Emerita brasiliensis* (Decapoda, Anomura) em ciclo circadiano na Praia do Morro, Guarapari, Espírito Santo, sudeste do Brasil. *Natureza on line*, 9(1): 38-42.

- El-SiKaily, A. y Shabaka, S. 2024. Biomarkers in aquatic systems: Advancements, applications and future directions. *Egyptian J. Aquatic Res.* 50(2): 169-182.
- Fazio, F. 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquacult.* 500: 237- 242.
- Ferdous, Z. y Muktadir, A. 2009. A Review: Potentiality of Zooplankton as Bioindicator. *Amer J Applied Sci*, 6(10): 1815-1819.
- Fernández, E.; Gustafson, A.; Andersson, M.; Hellman, B. y Dencker, L. 2003. Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc. *Toxicol Sci*, 76: 162-170.
- Ferrera, A. 2016. “*Emerita portoricensis* (Mole Crab)”. “The online guide to the animals of Trinidad and Tobago” <<https://www.inaturalist.org/observations/1217573>> (18/11/ 2016).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2006. Roma. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper № 500.134pp
- Frías-Espericueta, M.; Aguilar-Juárez, M.; Osuna-López, I.; Abad-Rosales, S.; Izaguirre-Fierro, G. y Voltolina, D. 2011. Los metales y la camaricultura en México. *Hidrobiol*, 21(3): 217-228.
- Gamboa, M.; Reyes, R. y Arrivillaga, J. 2008. Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Bol Mal Salud Amb.*, 48(2): 109- 120.
- García, E.; Lemus, M. y Chung, K. 2000. Kinetic incorporation of mercury in *Emerita portoricensis* (Crustacea: Decapoda). *Rev Biol Trop*, 1: 215-223.
- Geethanjali, R.; Didakar, C. y Angshuman, S. 2017. Cell specific stress responses of cadmium-induced cytotoxicity. *Anim Cells Syst*, 21(1): 23-30.
- Ghiasi, F.; Mirzargar, S.; Badakhshan, H. y Shamsi, S. 2010. Effects of low concentration of cadmium on the level of lysozyme in serum, leukocyte count and phagocytic index in *Cyprinus carpio* under the wintering conditions. *J Fish Aquat Sci*, 5: 113-119.
- Giaginis, C.; Gatzidou E. y Theocharis, S. 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Applied Pharmacol*, 213: 282-290.
- Gill, T. y Epple, A. 1993. Stress-related changes in the hematological profile of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 25(2): 227–235.

Godt, J.; Scheidig, F.; Grosse, C.; Esche, V.; Brandenburg, P.; Reich, A. y Groneberg, D. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occupa Medic Toxicol*, 1(22): 1-6.

Gonçalves, O. 2018. Ecología populacional e parâmetros fisiológicos de *Emerita portoricensis* Schmitt, 1935 (Crustacea, Hippidae) de ambientes costeiros da Paraíba. Trabalho de Conclusão. Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidad Estadual da Paraíba, João Pessoa. Brasil.

Hajra, K. y Fearon, R. 2002. Cadherin and catenin. Alteration in human cancer. *Gen Chromosomes Cancer*. 34: 255-268

Hamilton, D. y Valberg, L. 1974. Relationship between cadmium and iron absorption. *Am. J. Physiol.*, 227: 1033-1037.

Hänninen, O.; Kim, R. y Krzyzanowski, M. 2008. Health risks of heavy metals from long-range transported air pollution in Europe. *Epidemiol.*,9(6): S171-S172.

Harris, L. y Levine, A. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24: 2899-2908.

Hartwig, A. 2000. Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure App Chem.*, 72:1007-1014

Henderson, R., Bechtold, W., Bond, J. y Sun, J. 1989. The use of biological markers in toxicology. *Critic. Rev. Toxicol.* 20(2): 65-82.

Heyno, I; Klose, C. y Krieger-Liszkay, A. 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol.* 179(3):687-99

Horiguchi, H. 2007. Anemia induced by cadmium intoxication. *Arch. Toxicol*, 62: 888-904.

Horiguchi, H.; Aoshima, K.; Oguma, E.; Sasaki, S.; Miyamoto, K.; Hosoi, Y.; Katoh, T. y Kayama, F. 2010. Latest status of cadmium accumulation and its effects on kidneys, bone, and erythropoiesis in inhabitants of the formerly cadmium-polluted Jinzu River Basin in Toyama, Japan, after restoration of rice paddies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 83: 953-970.

Horiguchi, H.; Oguma, E. y Kayama, F. 2006. Cadmium and cisplatin damage erythropoietin-producing proximal renal tubular cells. *Arch. Toxicol*, 80: 680-686.

- Hose, J.; Martin, G.; Tiu, S. y Mckrell, N. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the moltcycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *The Biological Bulletin*, 189(2): 185-199.
- Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. y Beeregowda, K. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Inter Toxicol.*, 7:60-72
- Jan, A.; Azam, M.; Siddiqui, K.; Ali, A.; Choi, I. y Haq, Q. 2015. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Inter J Mol Sc*, 16:29592- 29630. 61.
- Jarvis, T.; Lockhart, J.; Loughry, W.; y Bielmyer. G. K. 2013. Metal accumulation in wild nine-banded armadillos. *Ecotoxicol.*, 22:1053-1062.
- Johri, N.; Jacquillet G. y Unwin R. 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*, 23: 783-792.
- Karupassamy, A.; Subathra, S. y Pavanewsan, S. 2005. Hematological responses to exposure to sublethal concentration of cadmium in air breathing fish *Channa punctatus*. *J. Environ. Biol.*, 26(1): 123-128.
- Khadre, S. 1988. The effect of experimentally induced inflammation on the blood pattern and haemopoietic organs of the teleost, *Clarias lazera*. *Bull. Inst. Oceano. Fish. ARE*. 14(6):191–203.
- Khan, Z.; Elahi, A.; Bukhari, D. y A. Rehman. 2022. Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. *J. Saudi Chem. Soc.*, 26:1-18.
- Khoshnood, Z., Mokhlesi, A. y Khoshnood, R. 2010. Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alterations in liver of *Euryglossa orientalis* and *Psettodes erumei* along North Coast of the Persian Gulf. *African J Biotechnol*, 9(41): 6966-6972.
- Kim, A.; Park, S. y Sung, J. 2020. Cell viability and immune response to low concentrations of nickel and cadmium: an *in vitro* model. *Int J Environ Res Public Health*.17(24):9218
- Koenig, S. 2012. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) and biomarkers of pollution in Mediterranean deep-sea organisms. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

- Kreutz, L.; Gil, L.; Farias, S.; Oliveira, T.; Anziliero, D.; Davi dos Santos, E. y Zanatta, R. 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 30(1):51-57.
- Kunimoto, M.; Miura, T. y Kubota, K. 1985. An apparent acceleration of age-related changes of rat red blood cells by cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 77: 451-456.
- Lacerda, L.; Santos, J. y Madrid, R. 2006. Copper emission factors from intensive shrimp aquaculture. *Mar Pollution Bull*, 52(12): 1823-1826.
- Lárez, C. 2007. Detección de daños en las membranas celulares y en el ADN de la guaraguara, *A. brevifilis* (Eigenmann, 1920) del río Manzanares. Tesis de grado. Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.
- Lárez, C. 2011. Genotoxicidad en células sanguíneas de la guaraguara *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920) bajo condiciones naturales en dos localidades del río Manzanares. Edo. Sucre, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 39(2): 91-107
- Lemus, M. y García, E. 1996. Bioacumulación de mercurio en el cangrejo *Emerita sp.* (Crustacea Decapoda), *Acta Cien Ven*, 47(1): 3-6.
- Leonard, S.; Bower, J. y Shi. X. 2004. Metal-induced toxicity, carcinogénesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem.*, 255:3-10.
- Levinson, S. y McFate, P. 1964. *Diagnóstico de Laboratorio*. Editorial El Ateneo. Barcelona – España.
- Liu, T.; He, W.; Yan, C.; Qi, Y. y Zhang, Y. 2011. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol. Ind. Health*, 27(3): 249- 256.
- Liu, Y.; Chen, Q.; Li, Y.; Bi, B.; Jin, B. y Peng, B. 2022. Toxic Effects of Cadmium on Fish. *Toxics*, 10, 622: 1-16
- Liu, T.; Xing, R.; Zhou, Y.; Zhang, J.; Su, Y.; Zhang, K.; He, Y.; Sima, Y. y Xu, S. 2014. Hematopoiesis toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials*, 35: 2942-2951.
- Łuczyńska, J.; Paszczyk, B. y Łuczyński, M. 2018. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. *Ecotoxicol Environmen Safe.*, 153(30): 60-67

Macías-Mayorga, D.; Laiz, I.; Moreno-Garrido, I. y Blasco, J. 2015. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the mollusc *Crassostrea angulata*? *Aquat. Toxicol.* 161:231-241.

Mamnur, R.; Sardar, S. y Islam, M. 2002. *In vitro* phagocytic study of blood leucocytes and peritoneal macrophages of walking catfish *Clarias batrachus* against *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli*. *Bangladesh J. Fish. Res.*, 6(1): 35-41.

Marcano, L.; Carruyo, I.; Montiel, X.; Soto, P y Morales, C. 2009. Effect of cadmium on cellular viability in two species of microalgae (*Scenedesmus* sp and *Dunaliella viridis*). *Biol Tace Element Res*, 130(1): 86-93.

Marcano, A. 2011. Parámetros bioquímicos y análisis estructural del riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. Tesis de grado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Márquez, A.; Fermín, I.; Senior, W.; De La Cruz, Benítez, A.; Díaz, A.; González, E.; Hernández, E.; González, M. y Hernández, D. 2019. Evaluación de riesgo ambiental por metales pesados en sedimentos de la cuenca del río Manzanares, Venezuela. En las costas mexicanas: contaminación, impacto ambiental, vulnerabilidad y cambio climático. *Zenodo*. 1: 1–26.

Martin, G. y Hose, J. 1992. Vascular elements and blood (Hemolymph). Microscopic anatomy of invertebrates. *Decapod Crustacea*, 10:117-146.

Martins, M.; Vieira, F.; Jeronimo, G.; Mouriño, J.; Dotta, G.; Speck, G.; Bezerra, A.; Pedrotti, F.; Buglione-Neto, C. y Pereira, G. 2009. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish. Physiol. Biochem.*, 35: 219-222.

Martinez-Morata, I.; Sobel, M.; Tellez-Plaza, M.; Navas-Acien, A.; Howe, C. y Sanchez, T. 2023. A state-of-the-science review on metal biomarkers. *Curr Environ Health Rep*. 210(3): 215-249.

Meng, Y.; Guo, Z.; Yao, H.; Yeung, K. y Thiyagarajan, V. 2019. Calcium carbonate unit realignment under acidification: a potential compensatory mechanism in an edible estuarine oyster. *Mar. Pollut. Bull.*, 139: 141-149.

Mekawwy, A.; Mahmoud, U.; Wassif E. y Naguib, M. 2011. Effects of cadmium on some haematological and biochemical characteristics of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) dietary supplemented with tomato paste and vitamin E. *Fish Physiol. Biochem.*, 37: 71–84.

Ministerio Del Poder Popular Para Ciencia y Tecnología. Código de Ética y Bioseguridad. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACYT). 2007; 33-35.

Moullac, G. y Haffner, H. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquacul*, 191:121-131.

Moura, M.; Farías, I. y Val, A. 1994. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Braz. J. Med. Boil. Res.*, 27: 1589-1598.

Mousa, S. 2004. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life Sc.* 75(1): 93-105.

Musilova, J.; Arvay, J.; Vollmannova, A.; Toth, T. y Tomas, J. 2016. Environmental contamination by heavy metals in region with previous mining activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 97: 569-575.

Naranjo, C. 2012. Efectos del cadmio sobre las respuestas inmunológicas y estabilidad lisosomal en *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca: Penaeidae) y posterior estimulación con bacterias. Trabajo de grado. Postgrado de Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Cumaná.

Nasser, A.; Abdel-Wahab, A.; El-Sayed, Y. y Hassan, Y. 2015. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. *Saudi J. Biol. Sci.*, 22(5): 543–550.

Nayak, A.; Lage, C. y Kim, C. 2007. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci.*, 98(1): 118-124.

Nemeth, E. 2008. Iron regulation and erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 5: 169-175

Núñez, G. y Fernández, L. 2011. Biología y acumulación de cadmio en camarones peneidos. En: *Metales en camarón de cultivo silvestre: importancia, efectos y transferencia trófica*. Páez Osuna, F. (ed). México, 159-204.

Núñez, G. y Fernández, L. 2018. Efecto de lixiviado de manglar en la toxicidad de níquel y cadmio en el camarón estuarino (*Hippolyte zostericola*) de la Laguna de Términos, Campeche. *Kuxulkab*, 24(48): 17-30.

- Nusetti, O.; Marcano, L.; Zapata, E.; Esclapés, 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. *Interciencia*, 29(6): 324-328.
- Ortega, P.; Aguilar, H.; Green, S.; Zanotto, F.; Chung, S. y Moreira, R. 2022. Experimental effects of cadmium on physiological response of *Callinectes danae* (Crustacea, Portunidae) from environments with different levels of Cd contamination. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol Pharma.* 251: 109210.
- Ortiz, M.; Ocaña, F. y Lalana, R. 2013. Clave ilustrada para identificar los cangrejos topos (Decapoda, Anomura, Hippoidea) de las aguas marinas cubanas, con un nuevo registro. *Rev Cuban Cienc Biol*, 2(2): 31-40.
- Palencia, P. 1995. Clave identificadora para los peces de la cuenca alta de los rio Uribante y Doradas. Edo. Táchira, Venezuela. *Rev Ecol.*, 3(1-3): 1-4.
- Peris, M. 2005. Estudio de metales pesados en suelos bajo cultivos hortícolas de la provincia de Castellón, España. Tesis, Ingeniera Química. Universidad de Valencia, Facultad de Ingeniería.
- Pérez, G. y Azcona, M. 2012. Los efectos del cadmio en la salud. *Rev. Esp. Méd. Quir.*, 17(3): 199-205
- Polanía, J. 2010. Indicadores biológicos para el monitoreo de puertos en Colombia. *Gestión y Ambiente*, 13(3): 75-86.
- Pourahmad, J. y Brien, J. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxicity mechanisms for Cu^{+2} and Cd^{+2} . *Toxicol*, 143: 263-273.
- Prozialeck, W.; Lamar, P. y Lynch. S.M. 2003. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin and beta-catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol.* 189: 180–195.
- Rainbow, P. 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environmen Inter*, 33(4): 576-582.
- Ramírez, A. 2002. Toxicología del cadmio. *Anal Facult Med*, 63(1): 51-64.
- Ramirez, P. y Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología. México-DF. 428p

- Ravindran, D.; Ridiandries, A.; Vanags, L.; Henriquez, R.; Cartland, S. y Tan, J. 2017. Chemokine binding protein “M3” limits atherosclerosis in apolipoprotein E mice. *Pub Library Sci*, 12(3): e0173224.
- Riveros, W. 1993. *Fisiología Humana. Técnicas de laboratorio*. Imprenta de la Universidad Oriente, núcleo de Sucre. Pág. 55.
- Rodrigues, E. y Pardal, M. 2014. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environ Inter*, 70: 158-182.
- Rodríguez, J. y Mandalunis, P. 2018. A review of metal exposure and its effects on bone health. *J Toxicol*. <<https://doi.org/10.1155/2018/4854152>> (1/11/2018).
- Rodríguez-Serrana, M.; Martínez-de la Casa, N.; Romero-Puertas, M.; del Río, L. y Sandalio, L. 2008. Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas*, 17: 139-146.
- Rojas-Espinosa, O. y Arce-Paredes, P. 2004. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. 3ra parte B. *Bioquim*. 29(2): 55-67.
- Rojas-Espinosa, O.; Arce-Paredes, P.; Islas, S.; Becerril, L. Y Ponce, M. 2024. Phagocytosis: A practical approach for evaluating neutrophil function in health and disease. *Modern Res Inflammation*. 13(2): 9-28
- Romero, K. 2009. Contaminación por metales pesados. *Rev Cient Cien Médic*, 12(1): 45-46.
- Rondón, I.; Pardo, D. y Eslava, P. 2010. Efecto de los herbicidas sobre el sistema inmune: una aproximación en peces. *Rev. Cs. Vt.*, 4: 122.
- Rowley, A. y Powell, A. 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific?. *J Immunol*, 179(11): 7209-7214
- Rubio-Vargas, A.; Pereira, T.; Ferreira, M.; Neto, F.; Castro, C.; Pinto, A.; Gallucci, M.; Alves, C.; Ferreira, D.; Opuskevitch, I.; Penner, D.; Esquivel-Muelbert, J.; Prodocimo, M.; Choueri, R. y Oliveira, C. 2024. Pollutant bioaccumulation in sentinel fish chronically exposed in Iguaçu river reservoirs (Southern Brazil) and human health risk of fish consumption. *Chemosphere*, 349: 140812.
- Ruellet, T. y Davin, J. 2007. Polychaete-amphipod ratio revisited. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 215-224.
- Salazar, R. 1993. Efectos de dosis subletales de cobre sobre el sistema inmunitario, metabolismo y crecimiento del poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida:

Amphinomidae). Tesis MSc. Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

Salazar, R.; García, N.; Villalobos, L. y Lemus, M. 2006. Immunological response of the freshwater fish *Colossoma macropomum* as a biomarker of copper exposure. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 77(6): 925- 930.

Salazar-Lugo, R.; Blando, Y.; Centeno, L. y Lemus, M. 2011. Variaciones en los parámetros hematológicos y en la respuesta inmune inespecífica de la cachama negra *Colossoma macropomum* expuesta a cadmio. *Saber.*, 23(1): 28-35.

Salazar, R. y Reyes, R. 2000. Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 4(13): 17-22.

Salazar, R.; García, N.; Villalobos, L. y Lemus, M. 2006. Immunological response of the freshwater fish *Colossoma macropomum* as a biomarker of copper exposure. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 77(6): 925- 930.

Salazar-Lugo, 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*. *Rev. Científica.*, 1: 1-9.

Salazar-Lugo, R.; Romero, R. y Centeno, L. 2012. Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* (Characiformes: Characidae). *Saber.*, 24(1): 49-55.

Salazar-Lugo, R.; Vargas, A.; Blanco, Y.; Marcano, A. y Rojas, L. 2010. Análisis estructural del riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. VIII Congreso Científico. Universidad de Oriente, Maturín, Venezuela.

Sastre, M. 1990. Relationships between life history stages and population fluctuations in *Emerita portoricensis*. *Bull Mar Sci*, 47: 526-535.

Seong-Gil, K.; Jae-Won, K. y Ju, K. 2004. Effect of dietary cadmium on growth and haematological parameters of juvenile rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquacult. Res.*, 35: 80-86.

Silveira, R. 1992. Manual de técnicas hematológicas y hemoquímicas aplicadas a peces de cultivo. *Bol. Tecn. E.N.A.C.U.T.*, 1: 15- 35.

Stephan, E. 1977. *Methods for calculating LC₅₀*. En: *Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM SPT 634*. Mayer, F. y Hamilink, J (eds). American Society for Testing Material, Philadelphia: 65-84.

Strak, M.; Rodopolou, S.; Wolf, K.; Hvidtfeldt, U.; Stafoggia, M.; Atkinson, R.; Hoogh, K.; Katsouyanni, K.; Hoek, G. y Brunekreef, B. 2019. Effects of Low-Level Air Pollution: A Study in Europe. *Environ Epidemiol.*, 3(1): 384-387.

Sumampouw, O. y Risjani, Y. 2014. Bacteria as indicators of environmental pollution: review. *Int. J. Ecosys.*, 4(6): 251-258.

Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* 59:237-252.

Tarasco, M.; Cardeira, J.; Viegas, M.; Caria, J.; Gil, M.; Gavaia, P.; Cancela, M. y Laizé, V. 2019. Anti-Osteogenic activity of cadmium in Zebra fish. *Fishes*, 4(11): 1-15.

Tavares, M.; Ferreira da Silva, E.; Ruas, M. y Carneiro, P. 2001. Physiological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (characidae) to acute stress. *B. Inst. Pesca.*, 27: 43-48.

Teitelbaum, D. 2012. Introducción a la toxicología ocupacional y ambiental. McGraw Hill, 56:1001-1011.

Thompson, L. y Darwish, W. 2019. Environmental chemical contaminants in food: Review of a global problem. *J. Toxicol.*, 4: 1-14.

Travis, C. y Haddock, A. 1980. Interpretation of the observed age-dependency of Cd body burdens in man. *Environ. Res.*, 22: 46-52.

Trenberth, K. y Karl, T. 2003. Modern Global Climate. *Sc.* 302(5651): 1719-1723.

Tonguthai, K. 1997. Diseases of the freshwater praw, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Aquatic Animal Health Research Institute*, 4(2): 1-4.

Tvermoes, B., Bird, G. y Freedman, J. 2011. Cadmium induces transcription independently of intracellular calcium mobilization. *Pub Library Sci*, 1(6): e20542.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. *Ecological effects test guidelines*.

Urquiza, S. y Carezzano, F. 2013. Las uniones celulares y la emergencia de los animales. *Biol*, 11(2): 353-363.

- Van der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13(2): 57–149
- Vargas, A. 2009. Respuesta inmunológica celular inespecífica de *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) expuesto a los metales cobre y cadmio. Trabajo de grado para optar por el título de *Magister Scientiarum* en Biología Aplicada, mención ecotoxicología, Universidad de Oriente. Cumaná.
- Vargas, A.; Blanco, Y. y Salazar–Lugo, R. 2012. Efecto del cobre y cadmio sobre la respuesta inmune innata del pez *Colossoma macropomum*. *Rev. Toxicol.*, 29: 90-94.
- Velásquez-Vottelerd, P.; Antón, Y. y Salazar, R. 2015. Cadmium affects the mitochondrial viability and the acid soluble thiols concentration in liver, kidney, heart and gills of *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920). *Open Vet. J.*, 5(2):166-172.
- Villanueva, S.; Botello, A. y Paez, F. 1988. Evaluación de algunos metales pesados en organismos del río Coatzacoalcos y de la laguna del Ostión, Veracruz, México. *Contaminación Ambiental*, 4: 19-31.
- Vogt, L.; Model, J y Vinagre, A. 2018. Effects of organotins on crustaceans: update and perspectives. *Front Endocrinol*, 9: 65.
- Volke, T.; Velasco, J. y De la Rosa, D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México. 146pp.
- Walker, C.; Sibly, R.; Hopkin, S.; Peakall, D. 2012. *Principles of Ecotoxicology*. Cuarta edición. CRC Press. London. Pag. 386.
- Wang, L. y Cheng H. 2015. A review of soil cadmium contamination in China including a health risk assessment. *Environ Sci Pollution Res*, 22: 16441 -16452.
- Wang, Y.; Hu, M.; Chiang, M.; Shin, P. y Cheung, S. 2013. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol*, 32: 381-390.
- Wei, Z. y Shaikh. Z. 2017. Cadmium stimulates metastasis-associated phenotype in triple-negative breast cancer cells through integrin and catenin signaling. *Toxicol.*; 328:70–80.

- Witeska, M.; Kondera, E.; Lipionoga, J. y Jastrzebska, A. 2010. Changes in oxygen consumption rate and red blood parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. after acute copper and cadmium exposures. *Fresen. Environ. Bull.*, 19: 115-122.
- Witeska, M.; Kondera, E.; Lipionoga, J. y Nienaltowska, R. 2009. The changes in blood leukocyte profile of common carp induced by acute exposures to copper and cadmium. *Fresen. Environ. Bull.*, 18: 1534-1540.
- World Health Organization. (WHO). 2007. Health risks of heavy metals from long range transboundary air pollution. European Committee. Alemania. p144.
- Wright, D., y Hegglund, S. 2014. The effects of cadmium on type I collagen in the extracellular matrix of osteoblast-like Saos-2 cells. *J. Idaho Academy Sci.*, 50(1):106-110
- Xu, P.; Liu, D. y Jiang, W. 2009. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biol. Plantarum*. 53(2): 387-390.
- Xian. J.; Wang, A.; Ye, C.; Chen, X. y Wang, W. 2010. Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca⁽²⁺⁾ concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 152(2):182-188.
- Yang, J.; Arnush, M.; Chen, Q.; Wu, X.; Pang, B. y Jiang, X. 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicol*, 17: 553-560.
- Yu, B.; Wang, X.; Dong, K.; Xiao, G. y Ma, D. 2020. Heavy metal concentrations in aquatic organisms (fishes, shrimp and crabs) and health risk assessment in China. *Mar. Pollut. Bull.*, 159: 111505.
- Zamora, F.; Rodríguez, N.; Torres, R. y Yendis, H. 2008. Efecto del riego con aguas residuales sobre propiedades químicas de suelos de la planicie de Coro. Estado Falcón (Venezuela): *Bioagro.*, 2:193-199.
- Zapor, L. 2014. Evaluation of the toxic potency of selected cadmium compounds on A549 and CHO-9 cells. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*, 20(4): 573-581.
- Zar, J. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd Edition, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River.

Zelikoff, J. 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish another non-mammalian sentinel, species: predictive value for mammals. *Toxicol.*, 129(1): 63- 71.

Zhu, W. y Su, J. 2022. Immune functions of phagocytic blood cells in teleost. *Rev Aquac.* 12(2): 630- 646.

Zhukalin, M.; Blanksma, M.; Silva, T; Suyehira, S.; Harvey, W.; Heggland, S. y Craig, P. 2007. Characterization and in vitro cytotoxicity testing of ethanolamine-derived cadmium chelating agents. *BioMetals*, 20: 61-72.

Zúñiga, M.; Rojas, A. y Caicedo, G. 1993. Indicadores ambientales de calidad de agua en la Cuenca del río Cauca. *Asoc Ingen Sanit Antioquia Medellín, Colombia.* 2:17-28.

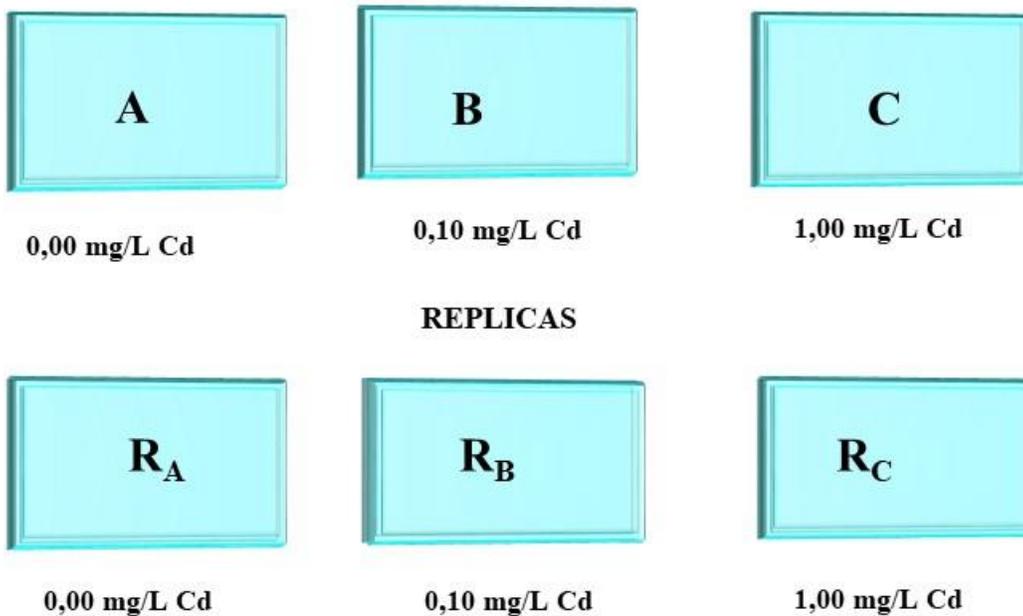
ANEXOS

Anexo 1.- Esquema del bioensayo para *E. portoricensis*

BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Emerita portoricensis*

Aclimatación: 7 días
Exposición: 15 días

n= 60 organismos
10 organismos / acuario



Toma de muestra (hemocianina)



REALIZACIÓN DE PRUEBAS CELULARES E INMUNOLÓGICAS

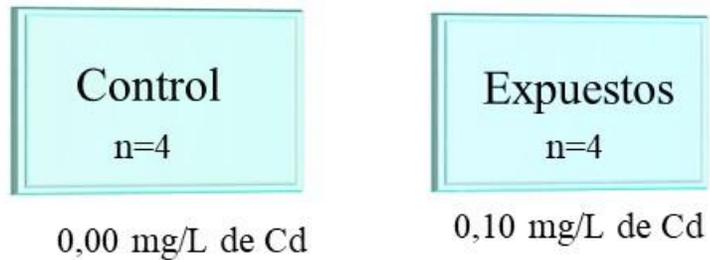
Anexo 2.- Esquema del bioensayo para *A. brevifilis*

BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Ancistrus brevifilis*

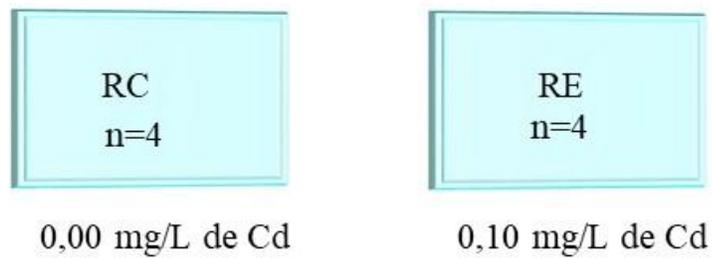
Aclimatación: 7 días

Exposición: 15 días

**n= 16 organismos
4 organismos / acuario**



REPLICAS

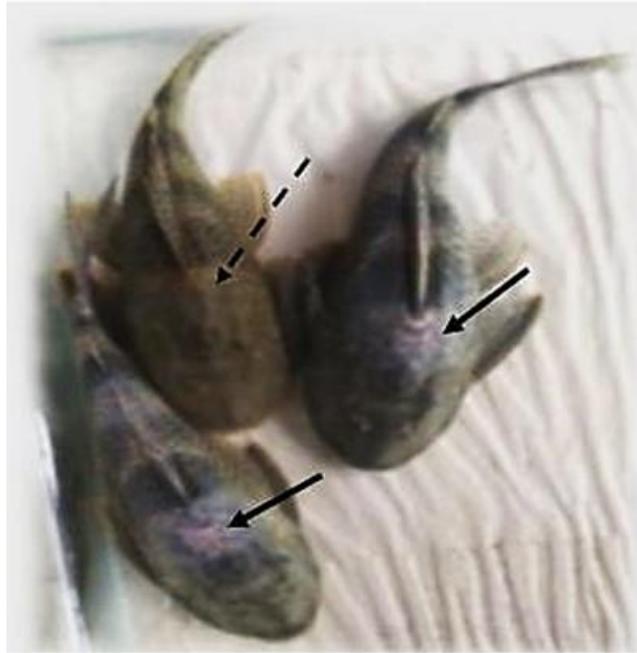


Toma de muestra sanguínea



REALIZACIÓN DE PRUEBAS CELULARES E INMUNOLÓGICAS

Anexo 3.- Ejemplares de *A. brevifilis* luego de la exposición a 0,10 mg/L de Cd. Nótese las zonas decoloradas (señaladas con flechas punteadas) que presentan los organismos.



HOJAS DE METADATOS

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

Título	Efectos de la exposición al cadmio sobre algunos parámetros celulares, hematológicos, e inmunológicos del crustáceo <i>Emerita portoricensis</i> y del pez <i>Ancistrus brevifilis</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código ORCID / e-mail	
Antón Marín Yanet del Valle	ORCID	0000-0002-1144-7831
	e-mail	yanetanton2019@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

emerita
ancistrus
Cadmio
Fagocitosis
sistema inmune

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

Área o Línea de investigación:

Área	Subáreas
Ciencias	Bioanálisis
Línea de Investigación: Inmunotoxicidad y biomarcadores de estrés metálico	

Resumen (abstract):

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo fundamental evaluar algunos parámetros celulares, hematológicos e inmunológicos del crustáceo *Emerita portoricensis* y del pez dulceacuícola *Ancistrus brevifilis*, para determinar las alteraciones de los mismos ante la exposición a una dosis subletal de Cd. Para esto se tomaron hembras adultas de *E. portoricensis* recolectadas en la zona intermareal de la comunidad de San Luis, Cumaná, estado Sucre, Venezuela. A partir del LC₅₀ obtenido (3,21 mg/L), se tomaron dos concentraciones subletales para la exposición (0,10 mg/l y 1,00 mg/l). Se realizó un bioensayo semiestático, estableciéndose como período de exposición, 15 días. Luego de cumplido este lapso, se procedió a la toma de la muestra sanguínea de los organismos (expuestos y control) con jeringas para insulina y por punción de la membrana artrodial, colocándose las muestras de hemolinfa en tubos Eppendorf con EDTA, para la realización de los parámetros celulares e inmunológicos. Por otro lado, se utilizaron ejemplares juveniles de *A. brevifilis* colectados en el río Manzanares, Cumaná, estado Sucre, los cuales fueron transportados hasta el Laboratorio de Fisiología Humana y de Peces de la Universidad de Oriente, donde fueron colocados en acuarios de vidrio previamente preparados. La aclimatación (15 días), se realizó con fotoperiodos de 12/12 horas, con registros de la temperatura y pH del agua; finalizado este lapso se procedió a someterlos al bioensayo de toxicidad subletal (15 días), al final del cual se procedió a la toma de muestra sanguínea. Para diferenciar los valores de los diferentes parámetros estudiados en ambas especies (*E. portoricensis* y *A. brevifilis*) entre el grupo de organismos expuesto *versus* el grupo control, se utilizó un *t*-Student. Los resultados obtenidos para *E. portoricensis* muestran un aumento de hemocitos en los organismos expuestos a 0,10 mg/l de Cd y una reducción de estos en los expuestos a 1,00 mg/l de Cd. Las células expuestas al metal mostraron irregularidades tanto en la membrana celular

como en la forma de la célula en 0,10 mg/l de Cd y en 1,00 mg/l de Cd, evidenciándose que la exposición al Cd causa ruptura de la membrana celular en todos los tipos de células observadas, ocasionando de esta manera que la viabilidad celular disminuya a medida que aumentan las concentraciones del metal, mientras que la adherencia celular es menor en especímenes expuestos a 0,10 mg/l de Cd y 1,00 mg/l de Cd, lo que generaría también la disminución de la capacidad de fagocitosis del crustáceo y por consiguiente la competencia de la respuesta inmune, dejándolo expuesto a cualquier agente externo. Por otra parte, los resultados obtenidos con respecto a *A. brevivilis*, la exposición a 0,1 mg/L de Cd *versus* el grupo control, causa una reducción significativa de los parámetros hematológicos, tales como la Hb, el Hto así como el conteo total de glóbulos rojos y de glóbulos blancos, en el porcentaje de células granulocíticas del tipo neutrófilas y linfocíticas, así como en el HCM; de igual manera, con relación a la adherencia y a la viabilidad celular. Todos estos hallazgos permiten concluir que, posiblemente el Cd causó algún tipo de efecto deletéreo sobre los parámetros evaluados, por lo que se consideró que los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación, indican que el efecto del Cd sobre las respuestas celulares relacionadas con la capacidad inmunológica y hematopoyética de estas células, muestran la alteración del potencial de los leucocitos de cumplir con su papel como defensores de la integridad de los organismos; es decir, el Cd es un elemento capaz de, además de causar anemia, producir alteraciones en el sistema hematopoyético e inmune innato del pez, y por consiguiente, puede comprometer su integridad biológica y por lo tanto, derivar en disminución o pérdida de la viabilidad del organismo. En resumen, ambas especies ven afectada su capacidad de respuesta defensiva bajo los efectos del Cd, aun cuando, las dosis del mismo, sean subletales.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código ORCID / e-mail										
	ROL										
		CA		AS		TU		JU	X		
	ORCID										
	e-mail										
e-mail											
	ROL										
		CA		AS		TU		JU	X		
	ORCID										
	e-mail										
e-mail											

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2025		
------	--	--

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo
NSUASO_ AMYV2025

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo: Profesor Asociado

Nivel Asociado con el Trabajo: Profesor Asociado

Área de Estudio: Bioanálisis

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE - VENEZUELA

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.

RECIBIDO POR *[Signature]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Cordialmente,
[Signature]
JUAN A. BOLANOS CUNPEL
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/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”.



Prof. Yante Aptón

AUTOR