

VARIACIONES EN LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE LA CACHAMA NEGRA *Colossoma macropomum* EXPUESTA A CADMIO

CHANGES IN THE HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND NON-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE OF BLACK CACHAMA *Colossoma macropomum* CADMIUM EXPOSED

RAQUEL SALAZAR LUGO¹, YVIS BLANCO¹, LUISA CENTENO², MAIRIN LEMUS³

¹Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Postgrado Biología Aplicada, Dpto. de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Tucupita, estado Delta Amacuro

³Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente
Email: raquelugove@yahoo.com

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron algunas respuestas hematológicas e inmunológicas del pez *Colossoma macropomum* expuesto a 0,2 y 1 ppm de cloruro de cadmio durante 15 días. Los parámetros evaluados fueron hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), conteo total de células rojas (RBC), hemoglobina corpuscular media (HCM), volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y los parámetros inmunes: viabilidad celular, fagocitosis y conteo total y diferencial de leucocitos. El análisis se realizó a los 7 y 15 días de exposición a cadmio y una vez que los peces fueron depurados por 21 días. Se observó una disminución significativa de los parámetros Hb, Hto, MCV y MHC sin cambios en la CHCM; el cadmio indujo linfocitosis y neutropenia, disminución de los eritrocitos y de la respuesta fagocítica de los polimorfonucleares, el conteo total de leucocitos estuvo entre 9873 ± 2266 (control) y 6187 ± 3432 (15d $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$) indicando que no se observaron cambios estadísticamente significativos en este parámetro. La viabilidad celular se mantuvo en $95\% \pm 2$ en todos los grupos. La depuración permitió la recuperación de la respuesta hematológica excepto para los eritrocitos que permanecieron disminuidos ($367000 \pm 104000 \text{ cel/mm}^3$ en $0,2 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ y $338000 \pm 8680 \text{ cel/mm}^3$ en $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$; peces controles $598000 \pm 9910 \text{ cel/mm}^3$), el conteo total de leucocitos disminuyó con la depuración ($4170 \pm 1680 \text{ cel/mm}^3$ en $0,2 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ y $5310 \pm 3840 \text{ cel/mm}^3$ en $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$; peces controles $9873 \pm 2266 \text{ cel/mm}^3$) independientemente de la concentración del metal; sugiriendo que el cadmio podría inducir daño en el sistema hematopoyético y un debilitamiento del sistema inmune del pez.

PALABRAS CLAVES: *Colossoma*, cadmio, hemoglobina, linfocitosis, anemia, toxicidad.

ABSTRACT

The hematological and nonspecific immunological responses of freshwater fish *Colossoma macropomum* exposed to 0.2 and 1 ppm of cadmium concentrations was evaluated during 15 days and subsequent recovery. Hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), Red Blood Cells (RBC), White Blood Cells (WBC), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), total and differential counts of leukocytes, Cell viability and phagocytosis were analyzed at 7, 15 days of cadmium exposure and during 21 days of depuration. After Cd exposed fish (15d), a significant decrease was observed in the Hb, Ht, MCV and MHC without changes on the MCHC; lymphocytosis and neutropenia were observed, RBC and phagocytic response showed a significant decrease. The total count leukocytes values were between 9873 ± 2266 (control) and 6187 ± 3432 (15d $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ exposed) indicating that there are not significant changes in this parameter during Cd exposed fish. Cell viability was $95 \pm 2\%$ in control and Cd-exposed fish. Cd- depuration fish showed a recovery of Hb, Ht, MCH and MCV; lymphocytes and neutrophils, reaching a range similar to control fish. However, RBC ($367000 \pm 104000 \text{ cell/mm}^3$ in $0,2 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ exposure and $338000 \pm 8680 \text{ cell/mm}^3$ in $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ exposed), total count leukocytes ($4170 \pm 1680 \text{ cell/mm}^3$ in $0,2 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ exposure group and $5310 \pm 3840 \text{ cell/mm}^3$ in $1 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ exposed group) and phagocytic response remained lower than control (Erythrocytes in control fish: $598000 \pm 9910 \text{ cell/mm}^3$; Leukocytes in control fish: $9873 \pm 2266 \text{ cell/mm}^3$); this results is showing that cadmium induced anemia and a possible damage in hematopoietic system, it is suggesting a weakening on immune system of *C. macropomum*.

KEY WORDS: *Colossoma*, cadmium, hemoglobin, lymphocytosis, anemia, toxicity.

INTRODUCCIÓN

Los parámetros hematológicos y la química sanguínea en peces son utilizados como indicadores rápidos de cualquier perturbación fisiológica que pueda afectar la

salud de la población piscícola; mas aún, en las prácticas actuales, donde es común hablar de cultivos intensivos los cuales incrementan la susceptibilidad de los peces a sufrir infecciones, enfermedades nutricionales y diversas reacciones al ambiente (Sadnes *et al.* 1988).

Se ha demostrado que los peces sufren alteraciones considerables de los valores hematológicos después de la captura y el estrés, afectando principalmente la concentración de hemoglobina, el tamaño de los eritrocitos, la concentración y las fracciones proteínicas del plasma (Fischer 1990). Igualmente, se han demostrado variaciones en los patrones hematológicos de peces sometidos a estrés por tóxicos ya sea en condiciones de laboratorio o en ambientes naturales (Pratap 2008).

La íntima relación entre los sistemas hematológicos e inmunológicos en todos los vertebrados, convierte a estos parámetros en una buena herramienta indicativa de los efectos de tóxicos presentes en el ambiente. La evaluación inmunológica y hematológica en peces podría dar información indirecta sobre las condiciones de salud del ecosistema en donde habitan estos organismos, dado al papel relevante que juegan los peces en su medio ambiente (Tuzen 2009).

La especie escogida para este estudio, *Colossoma macropomum*, conocido en Venezuela como cachama, es parte importante de las pesquerías de los ríos Apure, Caroní, Guanare, Meta, Portuguesa y Orinoco (Machado 1982). Está ampliamente distribuida en América del Sur y es muy abundante en las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco (Eigenmann 1975).

La resistencia de la especie a la manipulación y a las enfermedades así como su abundancia en los ríos del país la hacen un organismo adecuado para estudios de toxicidad en ambientes dulceacuícolas. Se han realizado algunos trabajos sobre los parámetros hematológicos de la especie en ambientes naturales (Tavares-Dias *et al.* 1998, Rocha 1998, Centeno *et al.* 2007) y en condiciones de laboratorio se ha evaluado la respuesta hematológica e inmune no específica a la exposición subletal a tóxicos tales como el cobre (Salazar-Lugo *et al.* 2006), y al herbicida Paraquat (Salazar-Lugo *et al.* 2009a). En este trabajo se evalúa las respuestas hematológicas e inmunológicas de *Colossoma macropomum* a la exposición y subsiguiente depuración a cadmio, metal no esencial encontrado en concentraciones moderadas en algunas cuencas de Venezuela y asociado con el incremento a padecer cáncer en las poblaciones humanas (Senior *et al.* 2008, Akersson 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra poblacional

Se utilizaron 110 peces juveniles de cachama con $13,46 \pm 0,5$ cm de largo y un peso de $40,69 \pm 0,1$ g; los peces fueron donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) ubicado en la Isla Cocuina, Tucupita, estado Delta Amacuro. Allí fueron recolectados en las lagunas de

crías; luego, fueron transportados hasta el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico, Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Manejo y aclimatación

Una vez en el laboratorio, los peces fueron colocados en acuarios de vidrios de 60 L de capacidad, llenados con agua aireada y de clorada previamente y se cubrieron con bolsas negras alrededor con la finalidad de no alterar a los organismos. Para prevenir infecciones fúngicas en los peces, al agua se le agregaron 0,01 mL de solución de verde de malaquita al 3 % durante 24 horas.

El tiempo de aclimatación se fijó en quince días; diariamente se realizó recambio del 60-80% del agua y ésta se mantuvo con sistema de aireación compuesto por aireadores y piedras difusoras. Toda la aclimatación se realizó con fotoperíodo de 12/12 horas; la temperatura del laboratorio se controló durante el día a $23^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ y durante la noche a temperatura ambiente. La alimentación de los peces se realizó *ad libitum*, todas las mañanas antes de realizar el recambio de agua, con alimento comercial granulado (cachamarina, PURINA).

Después de la aclimatación los peces estuvieron aptos para los bioensayos, los cuales se dividieron en tres etapas: la primera etapa comprendió la determinación de la concentración letal media (CL50) del organismo para el cadmio (Cd), la segunda etapa se realizó con dos dosis subletales escogida considerando la dosis letal media determinada en la primera etapa y una última etapa de depuración al cadmio en los peces expuestos.

Determinación de la dosis letal media (CL50 - 96 horas)

La CL50 96 horas, para cadmio en la especie, fue determinada siguiendo la metodología propuesta por La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), de acuerdo a Peltier y Weber (1985). Todos los bioensayos consistieron en un sistema con recambio de agua cada 24 horas, constituidos por acuarios de vidrio con capacidad de 60 litros de agua. Se realizaron dos réplicas por cada concentración probada y cada acuario contenía 8 peces de tallas similares. No se utilizó sustrato y los peces fueron alimentados durante la realización de la prueba, después del recambio de agua y antes de agregarle la dosis del metal correspondiente, eliminando siempre los restos de alimento que no fueron consumidos.

Las concentraciones requeridas de cadmio se prepararon a partir de una solución madre de cloruro de cadmio 1000 mg/L ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), y fueron de 128, 64 y 32, 16, 8, 2,

1 y 0,2 ppm. Cada acuario se llenó con 32 litros de agua de clorada y aireada con las concentraciones específicas, luego se colocaron los organismos y se procedió a observar durante las 96 horas siguientes el comportamiento de los peces. Se consideró muerto el pez que presentó hiperextensión de las aletas, rigidez corporal y falta de respuesta a la estimulación mecánica, generalmente estos peces se encontraban en el fondo del acuario.

Bioensayos subletales

Partiendo de la CL50 obtenida en el ensayo anterior, se seleccionaron dos concentraciones subletales a utilizar en las siguientes experiencias; las cuales fueron de 0,2 y 1 ppm de Cd. Los organismos fueron expuestos durante 15 días a estas concentraciones. Para tal fin fueron colocados cuatro (4) acuarios cada uno con ocho (8) organismos de tallas similares en la concentración de 0,2 ppm y cuatro acuarios cada uno con 12 organismos en la de 1 ppm de Cd, se les suministró alimento *ad libitum* cada 24 horas en forma alterna a los cambios de agua y recambio de la dosis del metal. Ambos experimentos fueron realizados con sus respectivos controles. A todos los organismos se les tomó muestras sanguíneas, a los grupos expuestos a Cd, antes de exponerlos, luego después de exponerlos al Cd, a los 7 y a los 15 días de exposición.

Experimento de depuración

Una vez finalizado el período de exposición a un grupo de organismo expuestos tanto a 0,2 ppm como a los de 1ppm, se les permitió depurarse por 21 días; para tal fin se colocaron acuarios libres de Cd, con agua de clorada y aireada y se alimentaron como se describió anteriormente. Al final del ensayo se tomaron las muestras sanguíneas.

Toma de muestra sanguínea

Antes de proceder a la toma de muestra, cada organismo fue pesado en una balanza analítica marca Ohaus (+/- 0,001 g) y medida su longitud estándar con un ictiómetro. El peso y longitud promedio fue de $13,46 \pm 0,5$ cm y $40,69 \pm 0,01$ g, respectivamente. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la arteria caudal a nivel del arco hemal utilizando jeringas desechables de 3 mL, previamente lavadas con heparina sódica; las muestras se mantuvieron en frío para preservar la viabilidad de las células.

Análisis hematológico

Se realizaron determinaciones de hematocrito por el método del microhematocrito (Blaxhall y Daisley 1973); concentración de hemoglobina (Hb), utilizando el método de la cianometahemoglobina según Blaxhall y Daisley (1973). El conteo de leucocitos y eritrocitos se realizó en una cámara de Neubauer, según Blaxhall y Daisley (1973). Para los índices hematimétricos se emplearon las formulas matemáticas propuestas por Levinson y McFatc (1964): Volumen corpuscular medio (VCM): $VCM = Hto (\%) \times 10 / GR (\times 109/L)$; Hemoglobina corpuscular media: $HCM = Hb (g/dL) \times 10 / g (\times 109/L)$; Concentración de hemoglobina corpuscular media: $CHCM = Hb (g/dL) \times 100 / Hto (\%)$. La formula leucocitaria se calculó utilizando el método del extendido según Lynch *et al* (1977). Para la identificación de las células, el extendido se coloreó con el método de Giemsa, luego se observó al microscopio óptico.

Análisis inmunológicos

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó el método de exclusión con azul de tripano al 0,4%. Para observar la capacidad fagocítica de los polimorfonucleares, éstos se extrajeron utilizando el método descrito por Eggleton *et al.* (1989) y modificado por Salazar-Lugo *et al.* (2006). Para la fagocitosis se tomó una alícuota de 50 μ L de la suspensión de polimorfonucleares preparada anteriormente y se mezcló con 50 μ L de la suspensión de levaduras, se incubó durante 60 minutos a 40°C, transcurrido este tiempo se agitó la suspensión brevemente y se colocó una gota de la misma en una cámara de Neubauer, para su posterior observación en un microscopio óptico. Se contaron como células fagocíticas, aquellas que presentaron dos a tres levaduras en su interior, diferenciándose éstas de las que no estaban fagocitadas por su carácter refringente.

Análisis estadístico

La dosis letal media (DL50) para el cadmio se calculó utilizando el programa computarizado Sthephan (1977). Para determinar las posibles diferencias entre los grupos experimentales y los controles se efectuaron análisis de varianza simple sobre los parámetros hematológicos e inmunológicos medidos en peces expuestos a cloruro de cadmio:

Un estudio previo demostró que todos los datos eran independientes, homogéneos y normales. Aquellos análisis que resultaron significativos estadísticamente se le aplicó una prueba a posteriori Student-Newman-Keuls (SNK; Sokal y Rohlf 1980).

RESULTADOS

Concentración letal media a las 96 horas de cadmio en *C. macropomum*

La concentración letal media de cloruro de cadmio (CL 50) fue de 38,47 ppm según el método logarítmico, con unos límites de confiabilidad entre 18,49 y 109,15.

Exposición a 0,2 y 1 ppm de cloruro de cadmio durante 7 y 15 días

La exposición subletal a concentraciones de 0,2 y 1 ppm de cloruro de cadmio produjo un efecto diferencial altamente significativo sobre la hemoglobina y hematocrito en los grupos experimentales. Los peces expuestos por 15 días al metal presentaron los promedios de hemoglobina y hematocrito más bajo (Figura 1). Igualmente, los eritrocitos de los grupos expuestos a cadmio presentaron los valores promedios más bajos, indiferentemente de la concentración y del tiempo de exposición (Figura 2A).

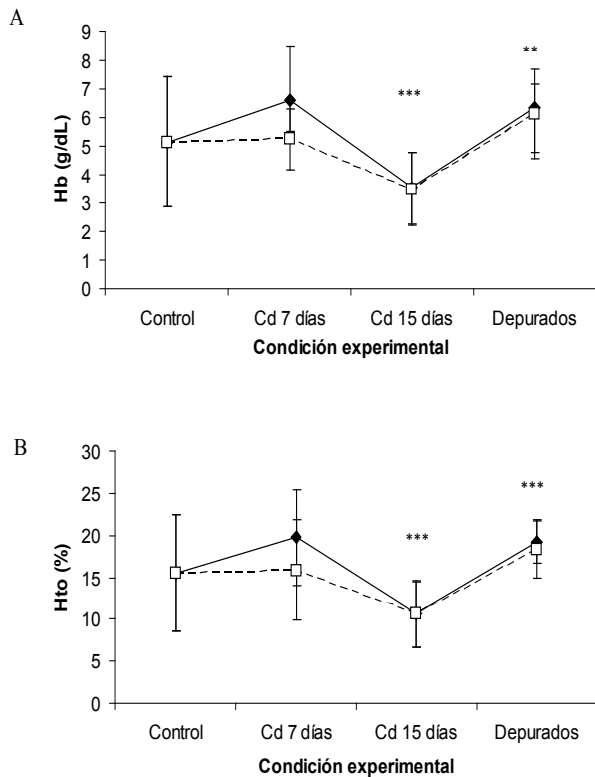


Figura 1. Valores de Hemoglobina (Hb, A) y Hematocrito (Hto, B) de *C. macropomum* expuesto a dos concentraciones subletales de cadmio. Cuadrado negro: 0,2 ppm cadmio y cuadrado blanco: 1 ppm de cadmio. Control: peces no expuestos; Cd 7 días: peces expuestos a Cd por 7 días; Cd 15 días: peces expuestos a Cd por 15 días; depurados: peces depurados por 21 días; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

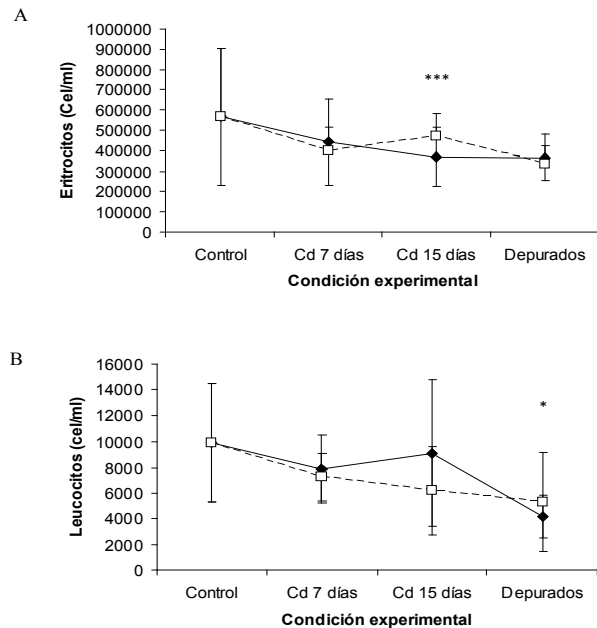


Figura 2. Número total de eritrocitos (A) y leucocitos (B) de *C. macropomum* expuesto a dos concentraciones subletales de cadmio. Cuadrado negro: 0,2 ppm cadmio y cuadrado blanco: 1 ppm de cadmio. Control: peces no expuestos; Cd 7 días: peces expuestos a Cd por 7 días; Cd 15 días: peces expuestos a Cd por 15 días; depurados: peces depurados por 21 días. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Los siete días de exposición al metal producen un aumento en el VCM que nuevamente a los quince días de exposición a Cd los valores promedios disminuyen. En los peces expuestos por quince días a 1 ppm de Cd se observó disminución significativa en la HCM. Para la CHCM el ANOVA demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales (Tabla 1).

Parámetros inmunológicos

La viabilidad celular no varió entre las diferentes condiciones experimentales mostrando valores de $95 \pm 2\%$. Cuando se evalúa el conteo total de leucocitos se observó que disminuye con el tiempo de exposición en los peces expuestos a 1 ppm de cadmio, no así en los expuestos a 0,2 ppm en donde se observó una recuperación de la respuesta a los 15 días de exposición (Figura 2B). Igualmente los granulocitos neutrófilos y los eosinófilos disminuyeron en los peces expuestos.

No se observaron cambios significativos en el número de linfocitos de peces expuestos a cadmio a la concentración de 1 ppm; aunque se observó aumento en los linfocitos a los 15 días de exposición a cadmio en

la concentración de 0,2 ppm, este aumento no resultó significativo (Tabla 2).

Se observó variación en la respuesta fagocítica tanto en los controles como en los peces expuestos, la respuesta

fagocítica disminuye en los peces expuestos a cadmio 7 días, (control $20 \pm 5\%$; expuestos a cadmio 5-8%); esta respuesta no presentó diferencias significativas entre los grupos en el tiempo de 15 días.

Tabla 1. Índices hematimétricos de la cachama *Colossoma macropomum* expuesta a dos concentraciones de cadmio y depurada.
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)
CONTROL	295 ± 26	122 ± 87	33 ± 1
0,2 ppm Cd (7 D)	482 ± 272*	169 ± 82	33 ± 0,5
1 ppm Cd (7 D)	413 ± 93*	137 ± 33	33 ± 0,6
0,2 ppm Cd (15 D)	309 ± 104	106 ± 45	33 ± 1
1 ppm Cd (15 D)	243 ± 118	77 ± 44***	34 ± 1
Depurados Cd 0,2 ppm	529 ± 79**	177 ± 26	33 ± 1
Depurados Cd 1 ppm	543 ± 13**	181 ± 0,3**	33 ± 0,75

Tabla 2. Contaje de diferencial de leucocitosis de la cachama *Colossoma macropomun* expuesto a dos dosis de cadmio y depurada

	Linfocitos cel/ml	Neutrófilos cel/ml	Eosinófilos cel/mL	Monocitos cel/mL
CONTROL	8299 ± 4575	1245 ± 905	0-253	0-286
0,2 ppm Cd (7D)	7677 ± 2563	174 ± 147***	0-120	0-120
1 ppm Cd (7D)	7124 ± 1839	108 ± 70***	0-130	0-130
0,2 ppm Cd (15D)	9112 ± 5941	173 ± 248***	0-58	0
1 ppm Cd (15D)	6077 ± 3361	76 ± 74***	0-240	0
Depurados Cd 0,2 ppm	3189 ± 1647***	895 ± 35***	0-177	0-137
Depurados Cd 1 ppm	4515 ± 3766***	784 ± 572***	0-32	0

Experimento de depuración

Algunos parámetros evaluados se recuperaron una vez que los organismos fueron depurados de cadmio. La hemoglobina y el hematocrito aumentaron significativamente en los peces depurados, alcanzando valores superiores a los de los peces controles (Figura 1A). Igualmente los índices hematimétricos VCM, HCM aumentaron significativamente con la depuración de los peces (Tabla 1).

A diferencia de esos parámetros, los eritrocitos mantuvieron valores semejantes a los observados en los organismos expuestos (Figura 1A) y los leucocitos disminuyeron en los grupos depurados, presentando los valores más bajos de los grupos evaluados. Esta disminución

fue independiente de la concentración de cadmio a la que fueron expuestos los peces. El contaje diferencial determinó que los linfocitos disminuyeron en los peces depurados y los neutrófilos aumentaron pero no lograron alcanzar los valores registrados para el grupo control. El grupo de peces depurados (1 ppm Cd) presentaron el rango de eosinófilos mas bajo (0-32); en este mismo grupo no se observaron monocitos (Tabla 2)

La respuesta fagocítica se observó disminuida en las células provenientes de los organismos depurados (4-5% en los expuestos). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales para la viabilidad celular la cual se mantuvo en $95\% \pm 2$.

DISCUSIÓN

La concentración letal media (CL50 96 horas) de cadmio determinada para alevines de *Colossoma macropomum* fue de 38,47 ppm, valor que puede ser considerado muy elevado si se toma en cuenta que este metal ha sido reportado como sumamente tóxico y no bioesencial (Sadiq 1992). A diferencia de lo aquí reportado, en otras especies de peces dulceacuícolas, como es el caso de *Oreochromis mossambicus*, se ha determinado que la CL50 96 horas para cadmio fue de 11,99 ppm (James 2000). Los resultados en relación a CL50 96 horas en cachama parecen indicar que estos peces son capaces de tolerar altas concentraciones de cadmio. En cachamas provenientes de ambientes naturales, aparentemente no contaminados, se reportan concentraciones moderadas de cadmio (Salazar-Lugo 2009).

Durante los ensayos de exposición no se observaron cambios en el comportamiento del pez ni en la morfología externa; a diferencia de lo que ha sido reportado en *Cyprinus carpio*, *Australoheros facetum*, *Astyanax fasciatus* tres especies de peces dulceacuícola expuestos a concentraciones subletales de cadmio durante 4-7 días en donde se observaron cambios en la velocidad y actividad del nado (Eissa *et al.* 2010). Estos resultados demuestran que la utilización de parámetros de comportamiento en evaluaciones ambientales debe ser hecha con sumo cuidado ya que difieren de la especie y de la susceptibilidad al tóxico y en todo caso, deben ser definidos para cada especie.

Esta observación sumada a un CL50 para cadmio elevado y al reporte de Salazar-Lugo (2009) sobre la moderada presencia de cadmio en peces provenientes de ambientes naturales aparentemente no impactados, indica que la cachama posee un eficiente sistema de detoxificación para este metal que le permite tolerar concentraciones de cadmio que pudiesen ser nocivas para otras especies, sin producirle un efecto adverso e irreversible en su fisiología.

Los parámetros hematológicos, hemoglobina y hematocrito, siguen la tendencia ya conocida para otras especies de peces expuestos a cadmio la cual se caracteriza por una disminución de estos parámetros (Karuppasamy *et al.* 2005). La anemia observada por exposición al metal probablemente este relacionada con la acción directa sobre los centros hematopoyéticos que en peces se encuentran en el riñón, principal órgano de acumulación de cadmio en *C. macropomum* y en otros organismos (Aitio y Tristcher 2004, Hernández 2007). Esta observación está sustentada en la disminución de los eritrocitos en los peces expuestos lo cual no es el

resultado de la disminución en la fragilidad globular como lo demostró Salazar-Lugo *et al.* (2009b). Está establecido que los riñones son los órganos críticos en la exposición subletal del cadmio y la disfunción renal es el efecto crítico a la toxicidad crónica del cadmio (Nordberg 2009).

El período de depuración al cadmio permitió a los peces la recuperación de los parámetros hematológicos (hemoglobina y hematocrito), lo cual puede ser explicado por la capacidad de respuesta bioquímica que pudiera poseer este organismo, como por ejemplo la posibilidad de desencadenar respuestas tales como la sobreexpresión de proteínas enlazadoras del metal como las metalotioneinas (Ghedira *et al.* 2010). Sin embargo, la función inmune no se recuperó demostrada por la disminución en la capacidad fagocítica en relación con los expuestos y en el porcentaje de leucocitos y específicamente de linfocitos; este efecto probablemente sea el resultado de daños inducidos por el metal en órganos leucopoyéticos. Salazar-Lugo *et al.* (2010) demostraron daños en el riñón cefálico de la cachama *C. macropomum* inducidos por exposición crónica a cadmio; el riñón cefálico es el principal órgano leucopoyético en peces. Quizás otras evaluaciones, por ejemplo la determinación de la muerte bacteriana inducida por polimorfonucleares, o una cuantificación de la actividad fagocítica por métodos colorimétricos podrían ayudar a explicar mejor este resultado.

El tiempo empleado para la detoxificación al metal (21 días) no fue suficiente para recuperar la respuesta celular (número de eritrocitos y leucocitos), un mayor tiempo de depuración podría ayudar a visualizar si esta respuesta ha sido afectada permanentemente por la exposición al cadmio. Los resultados observados en los parámetros evaluados indican que la respuesta inmunológica inespecífica en *C. macropomum* es sensible a la toxicidad subletal del cadmio y podría ser considerada en las determinaciones del estado de salud del pez.

CONCLUSIONES

La concentración letal media a las 96 horas de cloruro de cadmio (CL50), en alevines de *Colossoma macropomum* fue de 38,47ppm.

La exposición a dosis subletales de 0,2 y 1 ppm de cadmio origina alteraciones de los parámetros hematológicos: hemoglobina, hematocrito, eritrocitos, leucocitos, índices hematimétricos y de la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares.

Las dos concentraciones de cadmio empleadas afectan los parámetros evaluados de una manera similar lo que

sugiere que el efecto del cadmio sobre los parámetros evaluados depende más del tiempo de exposición que de la concentración del metal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con recursos provenientes del proyecto FONACIT-UDO G2005000775, y con aportes del Consejo de Investigación, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente y del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Tucupita, estado Delta Amacuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITIO A., TRISTCHER A. 2004. Effect on health of cadmium. WHO Approaches and conclusion. *Biometals* 17(5): 491-492.
- BLAXHALL P., DAISLEY R. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish. Biol.* 5: 771-781.
- CENTENO L., SILVA-ACUÑA R., BARRIOS R., SALAZAR-LUGO R., MATUTE C., PÉREZ J. 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro. *Zootecnia Trop.* 5(4):237-243.
- EGGLETON P., GARZAN R., FISHER D. 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymer. *Immunol. Meth.* 121: 105-113.
- EISSA BL., OSSANA NA., FERRARI L., SALIBIÁN A. 2010. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(4):1032-1039.
- FISCHER C. 1990. Variación de algunos parámetros sanguíneos del coro-coro (*Orthopristis ruber*). Tesis de Grado. Dpto. de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. pp 72.
- GHEDIRA J., JEBALI J., BOURAOUI Z., BANNI M., GUERBEJ H., BOUSSETTA H. 2010. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *Fish Physiol. Biochem.* 36(1):101-107.
- HANDY R. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of same toxicological process. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 135: 25-38
- HERNÁNDEZ MA. 2005. Patrón de proteínas en diferentes tejido de *Colossoma macropomum* expuesto a cobre y cadmio. Trabajo de Grado. Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, pp. 82.
- JAMES R. 2000. Effect of zeolite on reduction cadmium level in water and improvement of haematological parameters in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish.* 47: 29-35.
- JARUP L., AKESSON A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problema. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238: 201-208.
- KARUPPASAMY A., SUBATHRA S., PAVANESWAN S. 2005. Haematological responses to exposure to sublethal concentration of cadmium in air breathing fish *Channa punctatus*. *J. Environ. Biol.* 26(1):123-128.
- LEVINSON S., MCFATE P. 1964. Diagnóstico de Laboratorio. Editorial El Ateneo. Barcelona – España. 124 pp.
- MACHADO A. 1982. Estudio sobre la subfamilia Servasalminae (Teleosties, Characidae). Parte 1. Estudio comparado de los juveniles de las cachamas de Venezuela. *Act. Biol. Venezuelica.* 11: 1-101.
- NORDBERG GF. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218:192-200.
- PELTIER W., WEBER C. 1985. Methods for measuring the acute toxicity on effluent to freshwater and marine organisms. *Envi. Mari. Translab.* 60: 484-632.
- PRATAP HB., WENDERLAAR BONGA SE. 2007. Calcium homeostasis in low and high calcium water acclimatized *Oreochromis mossambicus* exposed to ambient and dietary cadmium. *J. Environ. Biol.* 28(2):385-395.
- ROCHA P. 1998. Efeito do pH nos parâmetros hematológicos e no ganho de peso de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Bol. Biol. Tropic. Recur. Natur. INPA.* 36: 474-479.

- SADIQ M. 1992. Toxic metals chemistry in marine environments. Editorial Marcel Dekker. New York. 390 pp.
- SADNES K., LIE O., WAAYBO R. 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adulted farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. J. Fish. Biol. 129-136.
- SALAZAR-LUGO R. 2009. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. REDVET Rev. Electrón. Vet. vol 10 N° 11. <<http://www.veterinaria.org/revista/redvet/m111109.html>>
- SALAZAR-LUGO R., GARCÍA N., VILLALOBOS B., 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., ESTRELLA A., OLIVEROS A., ROJAS-VILLARROEL E., VILLALOBOS DE B LUZ B., LEMUS M. 2009a. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 27(3): 321-326
- SALAZAR-LUGO R., LEÓN A., LEMUS M. 2009b. Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. Rev. Científica. XIX, 1: 1-9.
- SALAZAR-LUGO R., VARGAS A., BLANCO Y., MARCANO, A., ROJAS L., 2010. Análisis estructural del riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. VIII Congreso Científico Universidad de Oriente. Maturín, Venezuela.
- SOKAL R., ROHLF F. 1980. Biometry. W. H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A. 776 pp
- STHEPHAN C. 1977. Methods for calculating of LC50. En: American Society for Testing and Materials (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Mayer, F. & Hamelink, E. (eds.), Philadelphia, Pensylvania, pp 65-84.
- TAVARES-DIAS M., SANDRIN E., SANDRIN A. 1998. Característica hematológica de Tambaquí (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818. (Osteichthyes: Characidae) en Sistema de Monocultivo Intensivo. I. Serie eritrocitaria. Rev. Brasil. Biol. 58: 197-202.
- TUZEN M. 2009. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black sea, Turkey. Food. Chem. Toxicol. 47(6)1785-1790.