



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

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS  
HEMATOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS EN EL PEZ *Ancistrus brevifilis*  
(EIGENMANN, 1920)  
(Modalidad: Tesis de grado)

JOSÉ DAVID MAESTRE GAMARDO Y MIGUEL ENRIQUE NÚÑEZ VÁSQUEZ

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

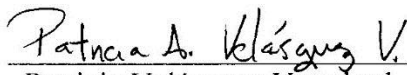
CUMANÁ, 2020

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS  
HEMATOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS EN EL PEZ *Ancistrus brevifilis*  
(EIGENMANN, 1920)  
(Modalidad: Tesis de grado)

APROBADO POR:



Profra. Yanet Antón Marín  
Asesor



Patricia Velásquez Votteler  
Jurado principal



Prof. Fernando Herrera  
Jurado principal

## ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	viii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	10
Población y muestra.....	10
Manejo y aclimatación.....	10
Bioensayo experimental.....	11
Toma de muestra sanguínea.....	11
Análisis hematológicos .....	12
Determinación del porcentaje de hematocrito .....	12
Determinación de la concentración de hemoglobina.....	12
Recuento diferencial de leucocitos .....	13
Determinación de los índices hematimétricos .....	14
Volumen corpuscular medio.....	14
Hemoglobina corpuscular media .....	14
Concentración de hemoglobina corpuscular media .....	15
Análisis inmunológicos.....	15
Obtención de leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica .....	15
Viabilidad celular de los leucocitos .....	15
Adherencia a superficies de polimorfonucleares .....	16
Análisis de los resultados.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	18
Descripción morfológica parcial de las células leucocitarias de <i>Ancistrus brevifilis</i> .....	21
Células granulocíticas del tipo neutrófilo .....	22
Células granulocíticas del tipo basófilas.....	23
Células linfocíticas.....	23
Células monocíticas .....	24

Morfología general de los leucocitos de ejemplares de <i>A. brevifilis</i> expuestos a 0,1mg/l de Cd.....	25
Parámetros hematológicos .....	29
CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA .....	40
APÉNDICES .....	52
HOJAS DE METADATOS .....	61

## DEDICATORIA

A

Mi más grande amor, mi madre Yurima Gamardo, gracias por tanto mami, por tu amor, esfuerzo, trabajo, dedicación y sacrificio en todos estos años, por ser mi apoyo en todo momento y brindarme el aliento que necesité en los momentos en los que sentí que decaía, para mí siempre serás la mejor del mundo, Dios te haga eterna. TE AMO.

Mi segundo padre Francisco De la Rosa por su apoyo y motivación incondicional en todo momento.

Mis ángeles: padre Douglas Maestre†, desde el cielo sigue protegiéndome como sentí que lo hacías en todo momento.

A mi abuelita linda, Melania Baldán†, gracias por todo tu cariño que Dios te tenga a su lado y sigas protegiendo a la familia.

Mi gran tía Yairu Gamardo†, no me alcanzarán las palabras del diccionario para decirte lo mucho que te extraño, serás siempre la luz de mis ojos, fuiste esa persona que me alentaba en mis momentos de quebranto, siempre tus consejos y palabras eran los más acertados en todo momento. Fuiste mi impulso, apoyo y motor siempre, mis triunfos todos serán dedicados en tu memoria y siempre recordaré de ti "Persistir y nunca desistir". Te amaré siempre.

Mi familia Gamardo Baldán, pilar fundamental en todo momento: Abuelo: Juan Gamardo; hermanos, tías: Yuraima, Milena, Yamilet, Janett (gracias por tus excelentes consejos) y en especial a Eloina (te amo mucho, gracias por ser mi segunda abuela y estar siempre pendiente y presente en mí), primos (José G, Jesús, Ángel, Moisés, Víctor, Yairet, Luisannys, Yairelys y Yannelys), sírvalos de inspiración.

Mis primas y hermanas: Paola Baldán (gracias por estar, por tus sabias palabras y por el impulso que me dabas, te amo), y sin duda alguna a Jenny, Yanetzy y Yolennys Carias gracias primas, porque con ustedes viví excelentes momentos, compartí risas, alegrías y lágrimas, siempre estarán presentes en mi mente y las llevaré eternamente en mi corazón.

La familia Rios Villahermosa por hacerme sentir como uno más de ellos, en especial a mi comadre, amiga y hermana de vida Mily Rios, gracias por todo y por regalarme a las niñas de mis ojos Anna Isabella y Alanna Susej.

Mi compañero de tesis Miguel Núñez, hermano, agradecido estaré contigo siempre, hicimos un excelente equipo, gracias por ser un excelente amigo desde el día uno que comenzamos esta hermosa carrera y por siempre persistir.

La mejor amiga que pudo regalar la UDO Darelbys Sánchez, contigo pude constatar que la amistad perdura en el tiempo sin importar las adversidades, gracias por motivarme a no decaer. También a mi familia udistas: Mafe Cumana, Solmarlys Marval, Sonia Lanza, Gilse Planes, Ari Parejo, Francymar Yegrez, Keicber Villarroel y Raudimar Márquez, gracias por ser parte de mis alegrías, risas y llanto.

Mi familia salsera Zandunga, Jeza, Luis, Rebeca, Gabo, Tamiche y Adrian en especial a mi súper y eterna jefa Lena Castillo, Everest Guix y Carmen Penott, quienes me dieron el apoyo y aliento cuando lo necesitaba en todo momento.

A todos muchas gracias, Dios los bendiga.

*José David Maestre*

## DEDICATORIA

A

Mi madre, Marianella Vásquez por tu apoyo, por ser una madre ejemplar, por no dejarme caer y darme las palabras de aliento cuando las he necesitado para seguir adelante, gracias por todo ese amor de madre y esa preocupación por la formación e integridad de cada uno de tus hijos, ser madre y padre es un rol que muchas mujeres no hacen y tú eres admirable por cumplir ese papel en la familia. No hay palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, tu hijo menor el que ya te falta por ver cumplir esta meta profesional. ¡Eres admirable, mami! TE AMO.

Mi abuela Gladys†, gracias mi abuela por ser parte también parte de mi formación personal y espiritual, por inculcarme los valores morales y cristianos, por acompañarme siempre en mis buenos y malos momentos. Gracias a Dios pude disfrutar de tu cariño y amor de abuela durante mucho tiempo, es triste saber que ya no estás entre nosotros, pero sé que te encuentras en un lugar mejor y que desde el reino de los cielos recibiré tus bendiciones, te recordaré siempre mi abuela, ¡la Bendición!

Mis hermanos, Jesús Antonio (Toño), Carlos Jesús (Carlitos) y Carlos Enrique (Kike) gracias a ustedes por su apoyo y preocupación hacia mi persona, agradecido enormemente por todas las cosas que he necesitado y han estado ustedes para auxiliarme y brindarme esa mano de hermano para salir adelante.

Mis hermanas Marielle y Michelle Núñez por extenderme su mano y apoyo cuando más lo he necesitado, gracias, Michelle por compartir tus conocimientos del Bioanálisis cuando apenas era un estudiante de los primeros semestres y recibirme en tu laboratorio.

Mi compañero de tesis, David Maestre por su apoyo y permitirme participar en este trabajo de investigación, que hemos sacado adelante con mucho esfuerzo y dedicación, gracias por tus consejos y palabras para nunca rendirnos.

Mi amigo, Danny Rengel por su apoyo incondicional durante muchos años y sobre todo en el momento de la realización de este trabajo, gracias porque también formas parte de mi familia, porque los amigos son la familia que uno puede elegir y en las que también pueden existir diferencias, pero ante todo estamos ahí en los momentos difíciles.

Mis compañeros y amigos que me regaló la vida universitaria: María Fernanda Cumana, Luis Valero, Sonia Lanza, Ariana Parejo, Yaneisi López, Solmarlys Millán y María Laura Luna, gracias por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por su apoyo a lo largo de esta carrera. ¡Muchas gracias!

*Miguel Núñez*

## AGRADECIMIENTOS

A

Dios, primeramente, gracias a él por todas las cosas buenas que nos brinda, principalmente la vida, gracias por llevarnos de la mano para realizar este trabajo y lograr nuestras metas para crecer y avanzar en nuestros proyectos de vida.

La Dra. Yanet Antón Marín, un agradecimiento muy especial para usted profesora, por su asesoría, dedicación, por ese amor, paciencia que tiene por la carrera y por cada uno de sus estudiantes y asesorados, en especial para nosotros que nos ha orientado y llevado de la mano con sus consejos, amistad y por ser una madre académica para nosotros. Estaremos eternamente agradecidos por ayudarnos en todo momento, gracias por ser tan atenta.

El Dr. William Velásquez por su apoyo y por permitirnos realizar el mantenimiento de los acuarios y muestreo de nuestro trabajo en los espacios del Laboratorio de Fisiología de Peces de la antigua Escuela de Enfermería, Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Doris Zapata, por su ayuda con los aireadores y mangueras para los acuarios donde se tuvieron los peces para el bioensayo experimental.

Luis Rondón, por su ayuda y apoyo en todo momento para la búsqueda y captura de los peces.

Danny Rengel, gracias por su apoyo para el traslado de los peces hasta la Escuela de Enfermería.

Ariana Parejo y Fabio Lopes, que nos brindaron también su colaboración cuando trabajamos en conjunto en el muestro de nuestros trabajos.

Marian Romero y Héctor Ramos por su colaboración con las computadoras para culminar satisfactoriamente este trabajo.



## LISTA DE TABLAS

Tabla1. Resumen de algunos parámetros de comportamiento, aspecto externo y características del agua de los acuarios de los ejemplares de <i>A. brevifilis</i> controles y expuestos a una concentración subletal de 0,1 mg/l de Cd.....	188
Tabla 2. Valores hematológicos hallados en ejemplares de <i>Ancistrus brevifilis</i> controles y expuestos a una concentración subletal de 0,1 mg/l de Cd.....	30
Tabla 3. Índices hematimétricos hallados en ejemplares de <i>A. brevifilis</i> controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio de 0,1 mg/dl.....	333
Tabla 4. Viabilidad celular y adherencia de polimorfonucleares en ejemplares <i>A. brevifilis</i> controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio.....	344

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación de la zona de captura de los ejemplares de *A. brevifilis*. La flecha blanca señala el lugar de recolecta.....10
- Figura 2. Ejemplares de *A. brevifilis*, control y expuestos a 0,1 mg/l de cadmio durante 15 días. En el tegumento se observan, en cuanto al aspecto morfológico, algunas diferencias entre el organismo control y los expuestos. Las flechas negras sólidas señalan simultáneamente, organismos expuestos, así como la descamación y aclaramiento del tegumento, siendo más evidente a nivel de la aleta dorsal, la flecha discontinua apunta a un pez del grupo control. .... 21
- Figura 3. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha continua delgada señala una célula granulocítica de tipo neutrófilo, donde se observa el núcleo excéntrico, así como granulaciones finas en todo el citoplasma. La flecha más gruesa señala un eritrocito, la flecha punteada señala un trombocito. Aumento 100X. .... 222
- Figura 4. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula granulocítica de tipo basófila mostrando los característicos gránulos de color violeta intenso. Aumento 100X..... 233
- Figura 5. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula linfocítica. Aumento 100X..... 244
- Figura 6. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula monocítica. Aumento: 100X. .... 255
- Figura 7. 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 alrededor de la misma (flechas continuas), las flechas discontinuas señalan las estructuras semejantes a yemas. Coloración: Giemsa. Aumento: 100X..... 266

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo fundamental evaluar algunos parámetros hematológicos e inmunológicos en el pez dulceacuícola *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920) expuesto a una concentración subletal de cadmio (0,1mg/l). Se utilizaron ejemplares juveniles de *A. brevifilis* colectados en el río Manzanares, Cumaná, estado Sucre, los cuales fueron transportados en bolsas plásticas negras, conteniendo agua y oxígeno, 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 diarios de la temperatura y pH del agua; finalizado este lapso se procedió a someterlos al bioensayo de toxicidad subletal (15 días). Para esto, se colocaron 16 peces, repartidos en cuatro acuarios, divididos en dos grupos: expuestos y control; con 4 organismos por acuario con su respectiva réplica, utilizándose un sistema de ensayo semi-estático, al final del cual se procedió a la toma de muestra sanguínea. Para comparar los valores de los diferentes parámetros estudiados entre el grupo de organismos expuesto *versus* el grupo control, se utilizó un *t*-Student. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas con respecto a la concentración de Hb, porcentaje de Hto, conteo de leucocitos y eritrocitos, en el porcentaje de células granulocíticas del tipo neutrófilas y linfocíticas, así como en el HCM; de igual manera, se hallaron diferencias con relación a la adherencia y viabilidad celular. Todos estos hallazgos permiten concluir que, posiblemente el Cd causó algún tipo de efecto dañino 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 salud del organismo; es decir, el Cd es un elemento capaz de causar anemia así como alteraciones en el sistema hematopoyético e inmune innato del pez, y por consiguiente, comprometer la integridad biológica y por lo tanto, derivar en disminución o pérdida de la viabilidad del organismo.

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la población a nivel mundial, ha traído como consecuencia, la construcción de grandes y pequeños complejos industriales; así como, el establecimiento de asentamientos urbanos aledaños a las zonas de los ríos y 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 biológicamente activas, entre los cuales se incluyen cientos de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, de naturaleza antropogénica. 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 la muerte de los organismos que habitan en él (Trenberth y Karl, 2003; Jackson, 2008; Rondón *et al.*, 2010; Musilova *et al.*, 2016; Thompson y Darwish, 2019).

En un ambiente contaminado, la frecuencia de individuos enfermos en una población de organismos puede aumentar significativamente (Flores-Lopes y Thomaz, 2011). Es así que, con el transcurrir de los años, se ha observado un incremento manifiesto en la frecuencia de aparición de patologías en las poblaciones de peces (Kim y Faisal, 2010; Mihaich *et al.*, 2017); estos resultados han sido evaluados tomando en consideración los efectos de los contaminantes de origen antropogénico sobre los diferentes sistemas y órganos, los cuales emitirán ciertas respuestas, algunas generales, otras más específicas, ante dichas sustancias. Esta situación ha promovido la búsqueda, en estos organismos, de pruebas que permitan evaluar el estado de salud general y sobre todo, de inmunocompetencia, razón por la cual, que ha llevado a utilizar para el monitoreo ambiental, la evaluación de la inmunotoxicidad en peces (Manciocco *et al.*, 2010; Antón, 2014; Antón-Marín *et al.*, 2015).

Los metales pesados, son uno de los grupos de contaminantes más peligrosos por su persistencia y toxicidad, ya que pueden incorporarse a la cadena alimenticia 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 por los peces e incorporados a la cadena trófica, causando problemas de salud en los consumidores finales, como el hombre. Un elemento perteneciente a este grupo de metales es el cadmio (Ramírez, 2002; FAO, 2006; Concon, 2009).

El cadmio (Cd) es un elemento divalente, con una masa atómica de 112,411 u, con un punto de fusión 320,9 °C y punto de ebullición de 767 °C. Es fácilmente soluble en ácidos minerales, con los que forma las sales correspondientes y es insoluble en agua, aunque sus sales de cloro y sulfato sí lo son. 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. Recorre grandes distancias con el viento y en los cursos de agua (Rodríguez-Serrana *et al.*, 2008). La incorporación natural de Cd procede, principalmente, de la actividad volcánica, lixiviación de rocas e incendios forestales. Las fuentes antropogénicas de cadmio varían desde productos de la extracción de zinc, combustión de carbón, escoria de las minas, material catódico de baterías, producción de hierro, acero, fertilizantes y pesticidas (Coombs, 1979).

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 tan diversos 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 (Travis y Haddock, 1980).

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 interactúan de forma compleja, siendo su solubilidad, influenciada por la dureza del agua, el pH y la presencia de sulfuros coloidales (Peris, 2005; Zamora *et al.*, 2008). Cuando las aguas procedentes de los ríos llegan al mar, el ion  $\text{Cd}^{2+}$  tiende a unirse a partículas en suspensión y/o depositarse en los sedimentos; quedando así localizado en las zonas aledañas a la costa 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 (ATSDR, 2012).

En países industrializados, el Cd puede detectarse en prácticamente todos los tejidos de personas adultas. Una vez absorbido, es transportado por la sangre a 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. También tiene importancia el tejido óseo como lugar de acumulación del metal (ATSDR, 2012; Thompson, y Darwish, 2019).

En el ser humano incorpora al organismo, aproximadamente un tercio del Cd al que está expuesto, junto con los alimentos de origen animal que consume y dos tercios con los de origen vegetal. La presentación y severidad de los signos, síntomas y alteraciones en el organismo se relacionan con las cantidades, el tiempo de exposición y con la vía de entrada del metal. En exposición crónica se observa anemia, disfunción renal, cálculos renales, osteoporosis, osteomalacia, trastornos respiratorios, hipertensión, trastornos nerviosos (cefalea, vértigo, alteración del sueño, temores, sudoración, contracciones musculares involuntarias), pérdida de peso y apetito, cáncer de próstata y pulmón. En intoxicación aguda hay neumonitis y edema pulmonar, gastroenteritis, náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea, fallo renal y finalmente, pueden ocurrir aberraciones

cromosómicas, efectos teratogénicos y congénitos (Jarup *et al.*, 2012; Pérez y Azcona, 2012).

La bioacumulación del Cd en la biota acuática está bien documentada. En los peces, por ejemplo, el Cd se acumula en altas concentraciones en el hígado, riñones y en el tracto gastrointestinal, siendo inmunotóxico; de igual forma se cree que podría tener efectos carcinogénicos, así como también ocasionar pobre mineralización de los huesos, anemia, retardo en el crecimiento, anormalidades del desarrollo y del comportamiento (Scheiner *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 2001; Annabi *et al.*, 2013).

El Cd es capaz de inducir, en hígado y riñones, la síntesis de proteínas ricas en cistina denominadas metalotioneínas. Las metalotioneínas son responsables de la retención del metal en dichos órganos, y ejercen una acción protectora al facilitar la eliminación de éste mediante la formación de un complejo cadmio-metalotioneína, el cual puede ser filtrado por el glomérulo y excretado en la orina (WHO, 1992; Osorio *et al.*, 1997). Aunque su mecanismo de acción tóxica no está completamente dilucidado, se cree que el Cd tiene gran afinidad por radicales nucleofílicos presentes en las proteínas; de esta forma se produciría la inhibición de numerosas enzimas debido a la fuerte unión del Cd a los grupos -SH de las mismas. Por otro lado, compite con otros metales esenciales, como es el caso del zinc (Zn), del cobre (Cu), del hierro (Fe) y del calcio (Ca), desplazándolos de sus sitios de unión a las enzimas y alterando distintas rutas bioquímicas. Algunos de los procesos afectados son el transporte del Cu al interior de las células, o el metabolismo del Ca por la unión del Ca a la calmodulina (Ramírez, 2002; Capó, 2007; Klaasen *et al.*, 2009).

Por otra parte, según Zelikoff (1998), los peces ofrecen múltiples ventajas como modelos para estudios inmunotoxicológicos, dentro de esas ventajas enumera: 1.-Son especies, generalmente, de relativo gran tamaño, aportando un buen número de células para los estudios. 2.-Sirven como modelo, tanto de laboratorio como en el campo, pudiendo ser expuestos a contaminantes. 3.-El costo de obtención y mantenimiento es, por lo general, bajo. 4.-Tienen mayor diversidad morfológica, por lo tanto, proporcionan

mayor número de modelos para los estudios. 5.- Los resultados obtenidos con ellos pudieran servir para establecer referencias evolutivas y lo que permite realizar estudios con otros vertebrados; razones por las cuales los peces están siendo utilizados cada vez con mayor frecuencia como modelos para trabajos experimentales de naturaleza ecotoxicológica (Chovance *et al.*, 2003; Bianchi y Canuel, 2011).

Los ambientes acuáticos naturales contienen elevadas concentraciones de microorganismos, lo que significa que los organismos que viven en ellos se encuentran en íntimo contacto con grandes cantidades de patógenos. Igualmente, el medio acuático está continuamente expuesto a agentes estresores, tanto naturales como antropogénicos; por ejemplo, cambios de temperatura y contaminantes químicos, factores estos que pueden provocar daños sobre la salud de los organismos que habitan en él. Por otra parte, se establece que la distribución de los contaminantes en el medio está determinada 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, bien a través de las branquias o del sistema digestivo (Koenig, 2012; Annabi *et al.*, 2013). Por esta razón, la evaluación inmunológica y hematológica en peces podría dar información sobre las condiciones de salud del ecosistema en donde residen estos organismos, debido al papel relevante que juegan estos en su medio ambiente y por la estrecha relación que guardan con el medio ambiente en el cual habitan (Tuzen, 2009).

Investigadores como Braxhall (1972), Armed y Elliot (1982), Campbell y Murra (1990) y Silveira (1992) 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 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).

Los estudios hematológicos sobre peces han permitido demostrar experimentalmente que las variaciones en las condiciones ambientales, tales como el pH, la temperatura y el



oxígeno, entre otros factores, producen modificaciones fisiológicas en el organismo, que se manifiestan mediante la alteración considerable en los niveles de algunos parámetros sanguíneos, los cuales pueden perjudicar la salud de las poblaciones piscícolas (Conroy, 1972; Pérez. *et al.*, 1983), afectando por ejemplo, la concentración de hemoglobina (Hb), la cantidad de eritrocitos sanguíneos, y el porcentaje de hematocrito (Hto), ayudando estos parámetros a dilucidar, de forma directa e indirecta, el estado de salud general de un organismo, de una población y en consecuencia, de un ecosistema; siendo ejemplo de esto, la observación de Htos anormales, los cuales revelan alteraciones de la actividad hematopoyética, deficiencias nutricionales u otros problemas de salud, así como la posible exposición a tóxicos (Antón, 2014).

El estrés puede comprometer la eficacia del sistema inmune, generalmente alterando (en primera instancia), la respuesta innata, la cual, en los peces, es la principal y más relevante línea de defensa; de esta forma, se pueden ver afectados mecanismos fundamentales necesarios para obtener una buena respuesta inmunitaria (Nayak *et al.*, 2007). Así mismo, el sistema inmune de los peces es altamente sensible a tóxicos, ya sean de origen orgánico o inorgánico. Los contaminantes inorgánicos, tal como los metales, pueden producir leucopenia, atrofia de órganos linfoides y supresión de la respuesta humoral (Bosch *et al.*, 2016; Tarasco *et al.*, 2019). Los contaminantes de origen orgánico, como los fenoles, tributilos, hidrocarburos aromáticos y bifenilopoliclorados, igualmente producen leucopenia y tienen efectos negativos sobre la capacidad de los macrófagos y la respuesta humoral inmune (Dunier y Siwicki, 1993; Salazar *et al.*, 2006). Debido a que este sistema incluye respuestas celulares y bioquímicas que pueden ser medidas en el laboratorio, es posible observar el efecto que los tóxicos pueden causar en, por ejemplo, el recuento diferencial y total de leucocitos, en la viabilidad, así como en la actividad fagocítica de estos (Martins *et al.*, 2009; Kreutz *et al.*, 2011; Antón, 2014).

Por otro lado, los ríos son las principales formas de transporte de constituyentes químicos provenientes de la acción humana. La biodisponibilidad de estos

contaminantes puede estar relacionada con su distribución en el sedimento, con la cantidad de partículas suspendidas en la columna de agua y con otros factores fisicoquímicos y bióticos que afectan la bioacumulación y su toxicidad (Sadiq, 1992; Gefford *et al.*, 2002). Ceo La cuenca del río Manzanares, valioso cuerpo de agua de la región nororiental de Venezuela, ubicada en el estado Sucre, tiene su vertiente en el macizo del Turimiquire y desemboca en la entrada del Golfo de Cariaco, donde ejerce gran influencia, sobre todo hacia el oeste de la costa del Golfo, cercana a la ciudad de Cumaná (Aguilera y Carvajal, 1976), teniendo gran importancia hidrológica y ecológica. En sus alrededores se desarrollan diversas actividades de agricultura, pesca y recreación, albergando a lo largo de sus márgenes, diversos centros poblados. Estudios han revelado que el río Manzanares, sobre todo en la cuenca alta y media, a lo largo de los años, paulatinamente ha disminuido su caudal, a la vez que ha sido impactado con contaminantes de origen antropogénico, dichos contaminantes proceden, tanto de los desechos derivados de las diversas actividades agrícolas que se desarrollan en la zona, así como de la descarga de aguas servidas (sin tratamiento); de igual forma, sumado a lo anteriormente mencionado, en la cuenca media se vierten los desechos químicos del Central Azucarero de Cumanacoa (Senior *et al.*, 2004; Ruíz *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Castro-Moreno *et al.*, 2017).

En Venezuela, son pocos los trabajos realizados donde se hayan evaluado los parámetros hematológicos e inmunológicos en peces expuestos a tóxicos ambientales. Al respecto, destacan los trabajos realizados por Barroso (1996), quien determinó las respuestas inmunológicas y hematológicas del pez *Hypostomus watwata* inducidas por la exposición a xenobióticos; de igual forma, son resaltantes los estudios realizados sobre las respuestas hematológicas, inmunológicas y bioquímicas del pez *Colossoma macropomum* por Salazar-Lugo *et al.* (2009) y Antón (2014), quienes determinaron el efecto de xenobióticos en esta especie, todo esto con la finalidad de proponer a esta especie como organismo bioindicador de toxicidad en ambientes dulceacuícolas neotropicales.

La especie *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920), perteneciente al orden Siluriformes, familia Loricariidae (Aguilera y Carvajal, 1976; Palencia, 1995), conocido comúnmente como guaraguara, es un pez autóctono y 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 (Ruiz *et al.*, 2005). Es un pez nocturno, bentónico, que habita y se alimenta en el fondo de los ríos, principalmente de algas y de algunos invertebrados.

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 las células sanguíneas del pez. 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*, su estudio demostró que el Cd es capaz de disminuir los niveles de tioles en todos los órganos, así como, dañar significativamente las mitocondrias de hígado y riñón, lo cual indica su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno y en consecuencia, peroxidación lipídica, con la subsiguiente cadena de alteraciones derivadas de este hallazgo.

El biomonitoreo de peces dulceacuícolas, reviste suma importancia, dado que pudieran ser utilizados como organismos centinelas en estudios inmunoecotoxicológicos, para evaluar las consecuencias de los contaminantes químicos en dichos ecosistemas, estimando, que estos estudios son necesarios para incrementar el conocimiento acerca del impacto que pueden generar las sustancias derivadas de la actividad humana, sobre el medio ambiente. Sumado al hecho que, esta especie, en particular, envuelve cierto interés económico, ya que actualmente es utilizada en varios estados del país como parte del desarrollo de cultivos piscícolas; así mismo, este organismo en condiciones naturales

sirve de alimento a las diversas comunidades aledañas a su hábitat, constituyéndose en una importante fuente proteica para los seres humanos habitantes de la zona (Lárez, 2011). Por todo lo anteriormente expuesto, se consideró de relevancia realizar un trabajo de investigación donde se evalúen algunos parámetros hematológicos e inmunológicos en el pez *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920) cuando este organismo es expuesto crónicamente a una dosis subletal de cadmio.

## METODOLOGÍA

### Población y muestra

Se utilizaron ejemplares juveniles de *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920); estos fueron colectados en el río Manzanares, sector Agua Santa (Lat 10°, 34' N, Long 64°, 10' S) en la carretera Cumaná-Cumanacoa, municipio Montes, estado Sucre (figura 1). Se utilizó como arte de pesca chinchorros de malla de 0,50 cm de diámetro, 5 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 el Laboratorio de Fisiología Humana y de Peces de la antigua Escuela de Enfermería, Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

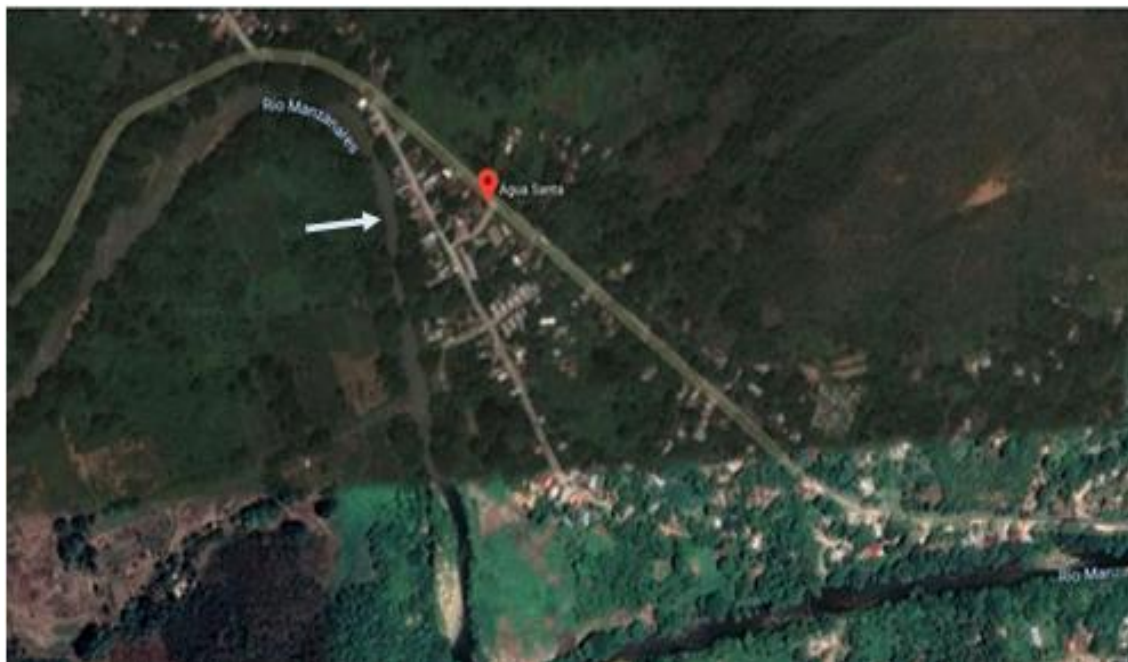


Figura 1. Ubicación de la zona de captura de los ejemplares de *A. brevifilis*. La flecha blanca señala el lugar de recolecta.

### Manejo y aclimatación

Una vez en el laboratorio, los peces fueron colocados en acuarios de vidrios de 54 L de capacidad, con dimensiones de 60cm de largo, 30cm de ancho x 30cm de altura, todos con agua, previamente aireada y declorada; los acuarios se cubrieron con bolsas negras para no alterar a los organismos. Para prevenir infecciones fúngicas en los peces, se le

agregó al agua 0,01 ml de solución de verde malaquita al 3%. El tiempo de aclimatación fue de siete días, tiempo durante el cual, se realizó diariamente recambio del 80% del agua, manteniéndose con sistemas de aireación, compuestos por aireadores y piedras difusoras.

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  $27,32 \pm 1,36$  °C y  $6,80 \pm 0,45$ , respectivamente. La alimentación de los peces se realizó *ad libitum*, todas las mañanas antes de hacer el recambio de agua, con alimento comercial granulado marca Sera<sup>®</sup>.

Al finalizar el tiempo de aclimatación, los peces fueron considerados aptos para someterlos al bioensayo de toxicidad.

### **Bioensayo experimental**

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 (apéndice 1). Partiendo del  $LC_{50}$  determinado para *A. brevifilis* (11, 81 mg/l) por Velásquez-Vottelerd *et al.* (2015), se tomó una concentración subletal de cadmio (0,1 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.

### **Toma de muestra sanguínea**

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 (+/- 0,001g) 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).

### **Análisis hematológicos**

#### Determinación del porcentaje de hematocrito

El hematocrito (Hto) expresa la relación volumétrica entre el paquete celular y el plasma, el método utilizado para la determinación de éste fue el de microhematocrito (Blaxhall y Daisley, 1973). Para esto, se llenaron con sangre tubos capilares de 75 mm de longitud x 12 mm de diámetro, los cuales se sometieron a centrifugación durante cinco 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.

#### Determinación de la concentración de hemoglobina

La concentración de hemoglobina (Hb) en los peces se determinó utilizando el método de la cianometahemoglobina (Blaxhall y Daisley, 1973). Para tal fin, se tomaron 20  $\mu$ 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 hemoglobina por decilitro de sangre total (g/dl). Para la elaboración de la curva patrón se utilizó un estándar de Hb de 16 g/dl, a partir de este, se prepararon diluciones: 2, 4, 8, 12 y 14 g/dl.

Se obtuvieron las absorbancias de las seis concentraciones y se graficaron en una hoja de Excel, a partir de la cual se hallaron las concentraciones de las muestras de interés (apéndice 2)

Determinación del conteo diferencial de las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos)  
El conteo de eritrocitos y leucocitos se realizó en una cámara de Neubauer, para lo cual se mezclaron 20  $\mu$ l sangre con 1,98 ml de solución Dacie para peces, según Blaxhall y Daisley (1973); 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 sedimentar 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 el cuadrado central de la cámara y los leucocitos en los cuatro cuadrantes laterales específicos para estos. El resultado fue expresado en millones y miles de eritrocitos y leucocitos, respectivamente, por milímetros cúbicos de sangre (cél/mm<sup>3</sup>).

#### 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 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 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 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*, Salazar-Lugo *et al.* (2012) y por Antón (2014) para *Colossoma macropomum*.

#### Determinación de los índices hematimétricos

Los índices hematimétricos relacionan los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito y número de glóbulos rojos), siendo útiles para comparar las condiciones fisiológicas de organismos sometidos a diferentes condiciones 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:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto (\%)} \times 10}{\text{G.R (x10}^6\text{/l)}}$$

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:

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{G.R (x10}^6\text{/l)}}$$

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:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 100}{\text{Hto (\%)}}$$

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

### **Análisis inmunológicos**

#### Obtención de leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se obtuvieron por modificación de la técnica de Mamur *et al.* (2002). 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 se resuspendió 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 nuevamente 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

La viabilidad celular se realizó mediante la técnica de exclusión del azul de tripano al 0,4% (Salazar, 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 células de otras.

En este método, 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 número 3, se conservó en frasco ámbar y bajo refrigeración. Se mezclaron 50 µl de solución de azul de tripano con 50 µl de la suspensión de leucocitos, se agitó durante 20 segundos y luego, con una micropipeta, se llenó una cámara de Neubauer con la mezcla y se procedió a efectuar el conteo de las células. 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 debido a que el citoplasma permitió el paso del colorante. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de células vivas utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Número total de células vivas}}{\text{Número total de células contadas (vivas + muertas)}} \times 100$$

#### Adherencia a superficies de polimorfonucleares

Se utilizó la técnica de Rojas-Espinosa y Arce-Paredes (2011), 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 incubarlas 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 a un análisis de *t*-Student, para la toma de decisiones se utilizó un nivel de significancia del 95%, esto con la finalidad de determinar si existen diferencias entre los diferentes parámetros evaluados entre el grupo de organismos expuestos al tóxico *versus* el grupo control, 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 (Zar, 1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se describe, tanto el comportamiento, como algunas características morfológicas y del agua de los acuarios observadas durante el periodo de bioensayo, en ejemplares de *Ancistrus brevifilis* controles y expuestos a 0,1 mg/l de Cd.

Tabla1. Resumen de algunos parámetros de comportamiento, aspecto externo y características del agua de los acuarios de los ejemplares de *A. brevifilis* controles y expuestos a una concentración subletal de 0,1 mg/l de Cd.

Parámetros	Control	Expuestos (0,1mg/l)
Desplazamiento (7 días)	En el fondo del acuario, moviéndose de un extremo a otro, agrupados en las esquinas, hacia donde había menos reflejo de luz. Algunos pegados a las paredes del acuario.	Igual al observado en los organismos controles
Desplazamiento (15 días)	Al igual que a los 7 días.	Igual al observado en los organismos controles
Apetito (7 días)	Se comían la cantidad de alimento que diariamente se les agregaba.	Igual al observado en los organismos controles
Apetito (15 días)	Al igual que a los 7 días.	Igual al observado en los organismos controles
Tegumento (7 días)	No se evidenciaron afecciones.	Descamación con pérdida de coloración en algunas zonas (figura 2)
Tegumento (15 días)	No se observaron anomalías.	Afecciones a nivel de las escamas de la aleta dorsal. La superficie corporal presentó mayor cantidad de mucosidad.
Respuesta ante estímulos externos (7 días)	Reflejo de huida y movimiento de aletas	Reflejo de huida y movimiento de aletas
Respuesta ante estímulos externos (15 días)	La respuesta fue igual a la observada a los 7 días	Igual a lo observado en los organismos controles

Continuación...

Agua de los acuarios (7 días)	Clara, se mantuvo limpia durante la alimentación diaria	Turbia, con mayor presencia de heces. Películas de moco en la superficie del acuario
Agua de los acuarios (15 días)	Igual que la observada a los 7 días	Turbia, con mayor cantidad de heces. Películas de moco en la superficie del acuario

---

La apreciación, en los ejemplares de *A. brevifilis* sometidos a una concentración subletal de 0,1 mg/l de Cd de aspectos tales como descamación, pérdida de coloración zonal, así como el aparente aumento en la cantidad de deposiciones de heces y la mayor producción de moco, muy posiblemente representan respuestas ante la condición de estrés, evidenciada por la exposición al metal, al respecto, Velasquez-Vottelerd *et al.* (2015), durante los últimos días del bioensayo de Cd, también hallaron alteraciones físicas en el organismo tales como daño en la piel y pérdida de escamas.

Aunque estos peces son conocidos como limpiadores o aseadores de acuarios, se pudo observar que, en el agua en los acuarios de los organismos sometidos a la exposición metálica, la turbidez era apreciable en comparación con el agua de los acuarios controles, esto ocasionado por la mayor cantidad de excreción de materia fecal por parte de los peces expuestos al tóxico, lo cual sugiere el posible efecto estresante causado por el Cd en dichos organismos. En tal sentido, se observó que los peces expuestos durante 15 días presentaron, además, ciertas afecciones a nivel del tegumento en sus aletas dorsales, lo cual les provocó descamación en el área afectada, lo que posiblemente haya causado disminución del movimiento de sus aletas, tanto pélvicas como dorsales, aunque mantuvieron el reflejo de huida y el apetito parecido al de los peces controles.

En un trabajo realizado por Hirt y Domitrovic (2002) en el pez *Cichlasoma dimerus* sometido a diferentes concentraciones de Cd, se reportaron cambios parecidos a los

observados en la presente investigación, con la diferencia que a nivel del tegumento de *C. dimerus* hubo una descamación y oscurecimiento, mientras que *A. brevifilis* reaccionó a la exposición crónica con descamación y aclaramiento notable a nivel de la aleta dorsal (figura 2), esto puede ser producto del efecto directo del metal o de alguna infección oportunista; de igual manera se ha documentado que el Cd causa intenso oscurecimiento o aclaramiento del tegumento, así como la formación de una película de mucus más espesa y abundante en cuerpo y branquias (Cavas *et al.*, 2005; El-Naggar *et al.*, 2009).

Por otro lado, los resultados descritos difieren con los obtenidos por Salazar-Lugo *et al.* (2011), quienes reportaron que en el pez *C. macropomum*, no hubo cambios en el comportamiento ni en la morfología externa cuando éste fue expuesto a concentraciones subletales de Cd. Los resultados hallados en *A. brevifilis* coinciden con lo reportado en la especie dulceacuícola *C. carpio* expuesta a Cd, donde se observaron cambios en la velocidad y actividad del nado (Eissa *et al.*, 2010). Sin embargo, el Cd no afectó la alimentación de los peces en este estudio, a diferencia de los resultados obtenidos por McGeer *et al.* (2002) en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), quienes hallaron que hubo disminución en el consumo de alimentos por parte de los peces desde la primera semana de exposición al metal.

Las manifestaciones corporales observadas en los peces durante este trabajo pudieran ser atribuidas a que el Cd, generalmente, produce un sofocamiento en los peces, así como pérdida de equilibrio. Esto se puede adjudicar a los precipitados o coagulados de mucoproteínas producidos como defensa, los cuales se depositan sobre el epitelio branquial, lo cual podría, a su vez, causar un bloqueo del intercambio de gases, de la excreción de productos de desecho y de la osmoregulación (Hirt y Domitrovic, 2002).

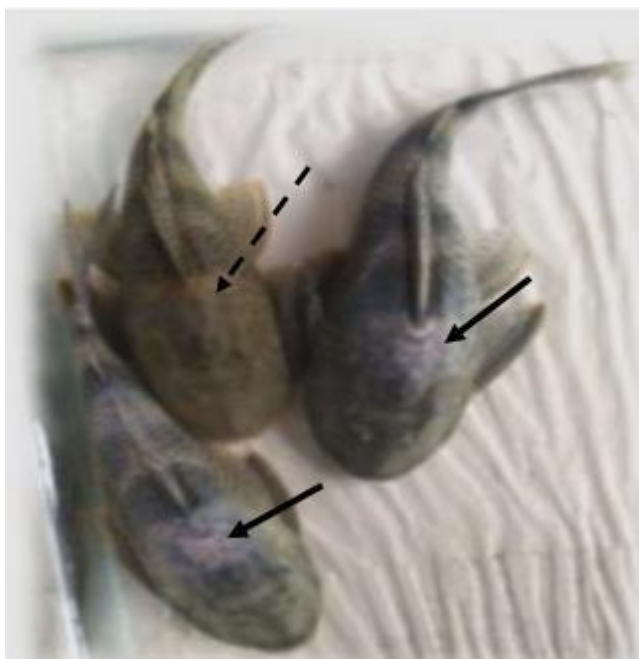


Figura 2. Ejemplares de *A. brevifilis*, control y expuestos a 0,1 mg/l de cadmio durante 15 días. En el tegumento se observan, en cuanto al aspecto morfológico, algunas diferencias entre el organismo control y los expuestos. Las flechas negras sólidas señalan simultáneamente, organismos expuestos, así como la descamación y aclaramiento del tegumento, siendo más evidente a nivel de la aleta dorsal, la flecha discontinua apunta a un pez del grupo control.

Estos hallazgos demuestran que la utilización y observación de parámetros de comportamiento en bioensayos, debe ser realizadas obligatoriamente y con sumo cuidado, ya que difieren de la especie utilizada, así como de la susceptibilidad de dicha especie al tóxico; de igual manera, es necesario realizar el reporte de los mismos a nivel de comportamiento y de aspecto externo del organismo, debido a que pueden dar una idea del efecto que pudiera estar causando el tóxico en el organismo de interés (Salazar-Lugo *et al.*, 2011).

#### Descripción morfológica parcial de las células leucocitarias de *Ancistrus brevifilis*

Debido a que, hasta la fecha, no se ha realizado la descripción de las células blancas de esta especie, se consideró hacer esta definición parcial de las mismas. En este estudio, la descripción parcial de la morfología de los glóbulos blancos permitió identificar cuatro (4) tipos de células diferentes, las cuales se clasificaron como células granulocíticas de



tipo neutrófilo y basófilas; adicionalmente, se identificaron células semejantes a los linfocitos (células linfocíticas) y células semejantes a los monocitos.

#### Células granulocíticas del tipo neutrófilo

Estas células se observaron redondas, con un núcleo de color violeta intenso, generalmente excéntrico de forma redondeada, y en ocasiones arriñonado. La cromatina, por lo general, se observa compacta y a veces se presenta en grumos, mientras que el citoplasma se advirtió de color rosa pálido, presentando granulaciones finas, algunas de color violeta (figura 3).

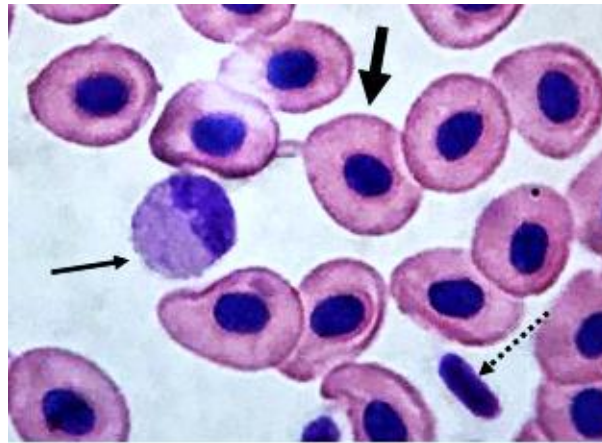


Figura 3. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha continua delgada señala una célula granulocítica de tipo neutrófilo, donde se observa el núcleo excéntrico, así como granulaciones finas en todo el citoplasma. La flecha más gruesa señala un eritrocito, la flecha punteada señala un trombocito. Aumento 100X.

La morfología normal de este tipo de células es similar a la descrita para *Salminus maxillosus* por Veiga *et al.* (2000), y para *C. macropomum* por Romero (2012). Por otra parte, estos resultados en cuanto a forma y tamaño del núcleo difieren a los presentados en *Rhamdia quelem* por Gianceselli *et al.* (2005), *Salminus afinnis* por Atencio-Garcia *et al.* (2007), y en *Porichthys porosissimus* por Galeano *et al.* (2010), en los cuales los autores reportaron núcleos bilobulados, tamaños más grandes, y en algunas ocasiones presencia de vacuolas en el citoplasma.

#### Células granulocíticas del tipo basófilas

Estos tipos de células se observaron redondas, con un núcleo de forma redonda, de color violeta, ocupando casi todo el citoplasma, el cual, por su parte se distinguió muy escaso, de color rosado claro, con pocos gránulos, los cuales se observaron de color violeta intenso y de tamaño irregular, distribuidos de forma variable, tanto en el citoplasma como en el núcleo (figura 4).

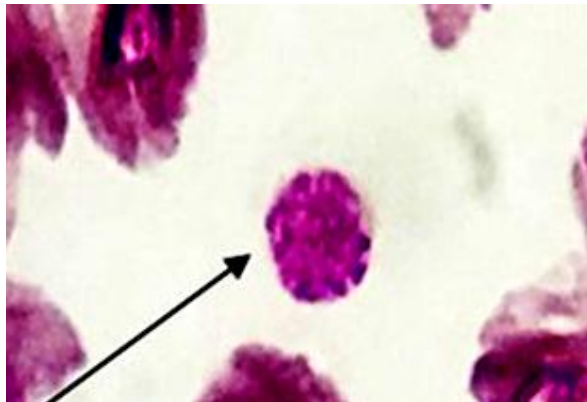


Figura 4. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula granulocítica de tipo basófila mostrando los característicos gránulos de color violeta intenso. Aumento 100X.

Resultados similares fueron encontrados en *Oreochromis niloticus* por Hahn-Von-Hessberg *et al.* (2011), *Sorubim cuspicaudus*, por Correa-Negrete *et al.* (2009), mientras que, por otro lado, Salazar-Lugo *et al.* (2009), no reportaron la presencia de células basófilas en *C. macropomum*.

#### Células linfocíticas

Esta clase de células se observaron redondas, el núcleo, que la abarca en casi su totalidad, se visualizó redondo y de color violeta, con cromatina, habitualmente compacta. El citoplasma, de color violeta muy pálido, se presentó escaso, sin granulaciones, pero si con eventuales vacuolas (figura 5).

Estos resultados observados concuerdan con los reportados para *Astronotus ocellatus* por Iannacone *et al.* (2006) y para *Sorubim cuspicaudus* por Correa-Negrete *et al.* (2009).

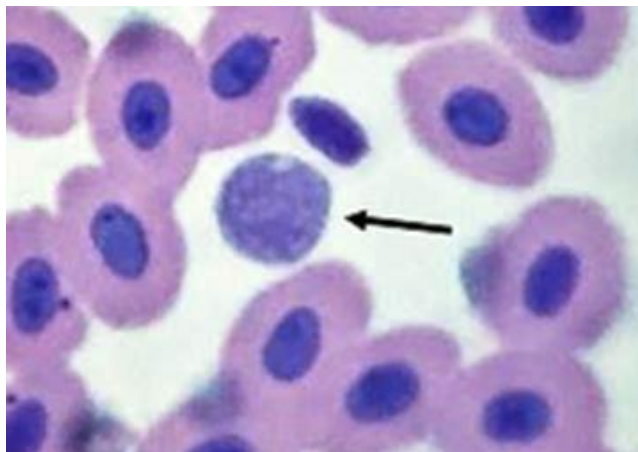


Figura 5. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula linfocítica. Aumento 100X.

#### Células monocíticas

Estas células se observaron de formas redondeadas y grandes. El núcleo se observó de forma variable, redonda u ovalada, y en algunas ocasiones con ligera forma arriñonada; de color violeta claro, con la cromatina algo dispersa. El citoplasma se advirtió violeta azulado, con la presencia de vacuolas en su interior, se distinguieron escasas granulaciones, las cuales se vieron finas (figura 6). Células semejantes a estas fueron reportadas en el pez cebra (Crowhurst *et al.*, 2002), en *Schroederichthys chilensis* (Valenzuela *et al.*, 2003), en *Porichthys porosissimus* (Galeano *et al.*, 2010) y en *Hoplosternum littorale* (Tavares-Díaz y Marques, 2005).

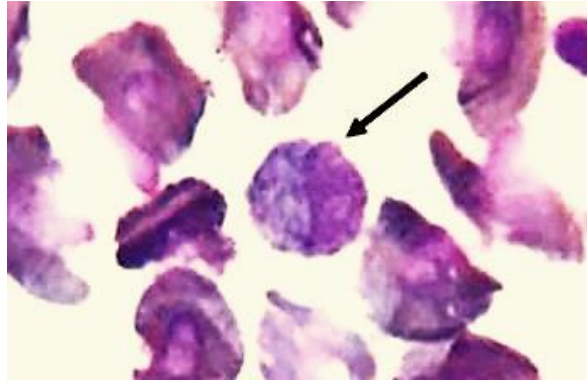


Figura 6. Frotis con coloración de Giemsa proveniente de ejemplares controles de *A. brevifilis*. La flecha señala una célula monocítica. Aumento: 100X.

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

Los frotis realizados a las muestras sanguíneas provenientes de ejemplares expuestos a la dosis subletal de Cd muestran glóbulos blancos con evidentes alteraciones en el citoplasma, sobre todo a nivel de la membrana citoplasmática (figura 7).

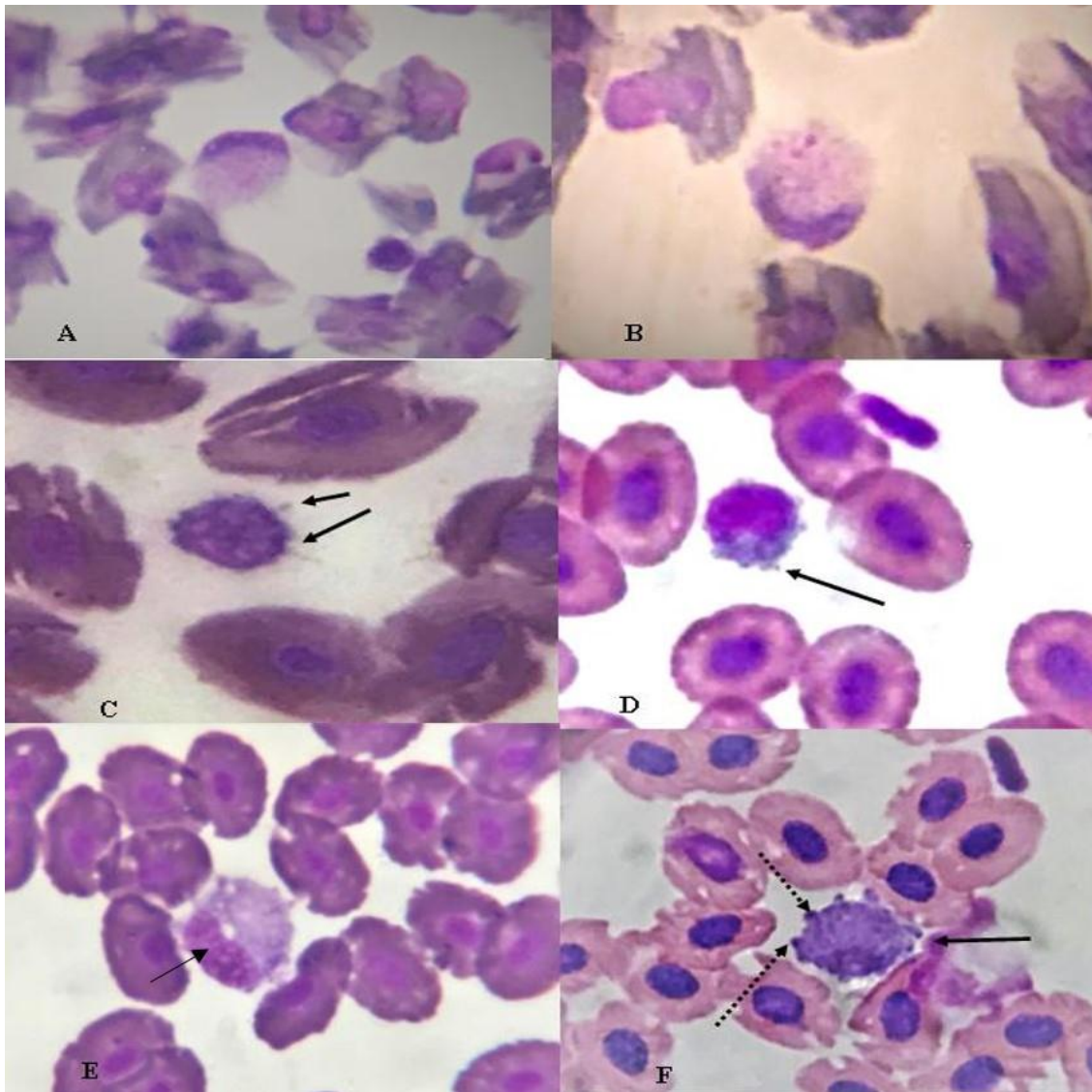


Figura 7. Leucocitos provenientes de ejemplares de *A. brevifilis* expuestos a 0,1 mg/l de Cd. **A y B:** células del tipo neutrófilo: se distinguen perturbaciones de la membrana citoplasmática; **C y D:** células linfocíticas, las flechas señalan proyecciones citoplasmáticas; **E:** célula monocítica; **F:** célula con protuberancias o vesículas alrededor de la misma (flechas continuas), las flechas discontinuas señalan las estructuras semejantes a yemas. Coloración: Giemsa. Aumento: 100X

En la figura 7 es posible notar que las células presentan una serie de anomalías, por ejemplo, la pérdida de continuidad de la membrana celular (figura 7A y 7B), así como la presencia de abundantes proyecciones citoplasmáticas en las células del tipo linfocito y monocítica (figura 7C, 7D y 7E), además de la presencia de unas células con unas características distintivas (figura 7F), 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 pronfros 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 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 traslocación 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, lesionando las funciones de estas. En este trabajo 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) 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 (Som *et al.*, 2009) y mamíferos (Celik *et al.*, 2005, 2009) indican que estos son citotóxicos para las células precursoras, de igual forma, diversos linajes celulares muestran diferente sensibilidad a la toxicidad del metal.

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 (Waalkes, 2000; Antón 2014; Wang *et al.*, 2015; Wei y Shaikh, 2017).

#### Parámetros hematológicos

En la tabla 2 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 2. Valores 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 ( $\bar{X} \pm DE$ )	P
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 <sup>3</sup> )	3,73 ± 0,83	2,72 ± 0,42	0,01871*
Glóbulos blancos (cél/s/mm <sup>3</sup> )	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 ± 15,11	0,79193 NS
Células linfocíticas (%)	18,71 ± 4,34	34,00 ± 9,20	0,00323*
Células basófilas (%)	0,14 ± 0,37	0 ± 0	0,35591 NS

$\bar{X}$ : Promedio; DE: desviación estándar; \*: diferencias significativas; NS: no significativo, g/dl: gramos por decilitros; %: porcentaje; cels/mm<sup>3</sup>: células por milímetros cúbicos;  $10^6$  cels/mm<sup>3</sup>: 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 (apéndice 2). Estos resultados están en concordancia con los de Gill y (1993) y Karuppasamy *et al.* (2005), quienes encontraron un descenso significativo en los glóbulos rojos, Hb y 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, Hb y Hto. Resultados semejantes también fueron observados en el estudio realizado en el pez dulceacuícola *C. macropomum* 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: 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; por deficiencia de Fe, ya que compite con la absorción del Fe duodenal (Hamilton y Valberg, 1974; Horiguchi, 2007), y 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 regula 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, ya que 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 y basófilas (tabla 2; apéndice 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 3 se muestran los valores promedios y las desviaciones estándar de los índices hematimétricos en ejemplares *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 en el volumen corpuscular medio (VCM) y en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) no se hallaron diferencias significativas (apéndice 2).

Tabla 3. 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
Volumen corpuscular medio(fl)	8,22 ± 1,22	7,09 ± 1,87	0,21087 NS
Hemoglobina corpuscular media (pg)	2,87±0,65	1,88 ± 0,25	0,00678*

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 pueden diferir 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 una alteración en la conformación estructural de esta proteína de transporte, o también daños causados a nivel de los tejidos y órganos que impide la normal maduración y producción de eritrocitos debido a una hematopoyesis ineficiente (Karupassamy *et al.* 2005; Chatterjee y Saxena, 2015).

La tabla 4 muestra los valores obtenidos para la viabilidad de los glóbulos blancos, así como los de adherencia de polimorfonucleares en ejemplares de *A. brevifilis* controles y expuestos a 0,1 mg/l; la prueba estadística demostró diferencias significativas entre ambos parámetros evaluados (Apéndice 2)

Tabla 4. Viabilidad celular y adherencia de polimorfonucleares en ejemplares *A. brevifilis* controles y expuestos a una dosis subletal de cadmio.

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

$\bar{X}$ : Promedio; DE: desviación estándar; \*: diferencias significativas, céls/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 cadmio y cobre, donde los organismos expuestos mostraron un descenso muy significativo de la viabilidad de las células sanguíneas en comparación con los organismos controles. Por otra parte, difiere del trabajo elaborado 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 producir la muerte celular, impidiendo que las células 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, 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 transcendental 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 *A. brevifilis*, 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 en relación a la adherencia celular en ejemplares de *A. brevifilis* mostraron diferencias significativas entre el grupo control y expuestos a 0,1 mg/l de Cd; estos resultados 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 ( $\text{SH}$ ), hidróxilos ( $\text{OH}$ ) y carboxilo ( $\text{COOH}$ ) 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 dañar a su vez, 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 fagocitosis, 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.

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 este 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 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 simultaneas, el sistema hematopoyético e inmune.



## CONCLUSIONES

Se describieron cuatro (4) tipos celulares: células granulocíticas de tipo neutrófilo, células monocíticas, células linfocítica y células basófilas en sangre de *A. brevifilis*, las cuales muestran algunas similitudes, a nivel tintorial, con las halladas en otros peces, aunque con ciertas particularidades con relación a la forma, tamaño y tipos de gránulos.

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

Las alteraciones significativas en la hemoglobina, el hematocrito, el contejo total de glóbulos rojos, así como en la hemoglobina corpuscular media en los peces expuestos, sugieren que el Cd afecta en alguna medida, cuando se expone a la dosis evaluada y durante el lapso utilizado, al sistema eritropoyético en *A. brevifilis*.

La disminución del contejo de glóbulos blancos en los individuos expuestos al metal da cuenta del efecto perturbador del tóxico a esa concentración y durante el tiempo estudiado sobre el linaje leucopoyético de *A. brevifilis*.

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

## RECOMENDACIONES

Realizar estudios complementarios para una mejor caracterización de las células leucocitarias en el pez *A. brevifilis*, por ejemplo, coloraciones histoquímicas.

Determinar la posible alteración, ante el estrés metálico, de algunos parámetros bioquímicos como, por ejemplo, los niveles de enzimas hepáticas, de cortisol, de proteínas totales y albúmina.

Determinar otros parámetros inmunológicos como lo son: fagocitosis, quimiotaxis, proteína C reactiva, lisozima, superóxido dismutasa, entre otros.

## 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.

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.

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

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.

Annabi, A.; Said, K. y Messaoudi, A. 2013. Cadmium: bioaccumulation, histopathology and detoxifying mechanisms in fish. *Amer. J. Res. Commun.* Disponible en: [www.usa\\_journals.com](http://www.usa_journals.com). ISSN: 2325-4076.

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

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.

Armed, D. y Elliot, A. 1982. Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111: 337-341.

Atencio-Garcia, V.; Genes, F.; Madariaga, D. y Pardo, S. 2007. Hematology and blood chemistry of juveniles rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) Captured in the River Sinú. *Acta Biol. Colomb.*, 12: 27-40.

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

- Barroso, F. 1996. Parámetros hematológicos e inmunológicos en *Hypostomus watwata*, con síndrome inflamatorios inducido por exposición a xenobióticos. Tesis de Maestría. Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- 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.
- 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 mor-tality 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.
- Campbell, T. y Murra, F. 1990. An introduction to fish haematology. *Corp. Cont. Educ. Veterin. Sci.*, 12: 323-533.
- Capó, M. 2007. *Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. Editorial Tebar, España.
- Castro-Moreno, A.; Contreras-Gaspar, R.; Perez-Gómez, L.; Cotoret-Brito, I.; Cerillos, M.; Torres-Arzuayus, P.; Zamora, R. y Arcia, D. 2017. *Cumaná 500 años: una historia ilustrada*. Editor Banco Interamericano de Desarrollo (BID). Programa Ciudades Emergentes y Sostenibles. Primera Edición.
- Cavas, T.; Garanko, N. y Arkhipchuk, V. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food. Chem. Toxicol.*, 43: 569-574.
- 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.
- Chovance, A.; Hofer, R. y Schiemer, F. 2003. Fish as bioindicator. En: *Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier Science. B.A. Markert, A.M. Breure y H.G. Zechmeister. New York. Págs. 639-676.
- Concon, J. 2009. *Heavy metals in food*. In: *Food Toxicology, Part B: Contaminants and additives*. New York, Dekker, 3(4): 1043-1045.
- Conroy, D. 1972. Studies on the haematology of the Atlantic salmon *Salmo salar*. *Sym. Zool. Soc. Lond.*, 30: 101-127.
- 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.
- Crowhurst, M.; Layton, J. y Lieschke, G. 2002. Caracterización morfológica y citoquímica de leucocitos. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 483-492.
- 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.
- 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.
- Dunier, M. y Siwicki, A. 1993. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish a review. *Fish. Shell. Immunol.*, 3: 423-438.
- Edwards, J.; Kolman, K.; Lamar, P.; Chandar, N.; Fay, M. y Prozialeck, W. 2013. Effects of cadmium on the sub-cellular localization of  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -catenin-regulated gene expression in NRK-52E cells. *Biometals*., 26(1): 33-42.

- Eissa, B.; Ossana, N.; Ferrari, L. y Salibián, A. 2010. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58(4): 1032-1039.
- Emerit, J.; Beaumont, C. y Trivin, F. 2001. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.*, 55: 333-339.
- El-Naggar, A.; Mahmoud, A. y Tayel S. 2009. Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alternation in liver of *Oreochromis aureus* in relation to water quality at different localities along the Rie Nile. *Egypt World J. Fish Marin. Sci.*, 1(2): 105–114.
- Flores-Lopes, F. y Thomaz, A. 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Braz. J. Biol.*, 71(1): 179-188.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).2006. Roma. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper № 500.134pp.
- Galeano, N.; Prat, M.; Guagliardo, S.; Schwerdt, C. y Tanzola, R. 2010. Características hematológicas de *Porichthys porosissimus* (Pisces: batrachoidiformes) en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Analecta Vet.*, 30(1): 5-11.
- Gefford, A.; Gefford, O.; His, E. y Armiard, J. 2002. Relationships between metal bioacumulation and metallothionein levels in larvae or *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 233: 131-142.
- 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. Aquatic Sc.* 5(2): 113-119.
- Gianeselli, M.; Vanotti, M.; Hernández, D. y Domitrovic, H. 2005. Caracterización morfológica de leucocitos de *Rhamdia quelen*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Argentina.
- 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.
- Hahn-Von-Hessberg, C.; Grajales-Quintero, A. y Gutiérrez-Jaramillo, A. 2011. Parámetros hematológicos de *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas. *Vet. Zootec.*, 5(1): 47-61.

- Hajra, K. y Fearon, R. 2002. Cadherin and Catenin Alteration in Human Cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 34:255-268.
- Halliwell, B. y Aruoma, O. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett*; 281: 9-19.
- Hamilton, D. y Valberg, L. 1974. Relationship between cadmium and iron absorption. *Am. J. Physiol.*, 227: 1033-1037.
- 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.
- Hernández, A. y Hansen, A. 2012. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(1): 115-127.
- Hirt, L. y Domitrovic, H. 2002. Toxicity and histopathological response in *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) exposed to cadmium chloride in acute and sublethal tests. *Rev. Ictiol.*, 10 (1/2): 17-32.
- 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.
- Iannacone, J.; Falcon, W. y Vargas, R. 2006. Parámetros hematológicos del Acauraguazú *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) (Cichlidae: perciformes). Laboratorio de Ecofisiología Animal. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima.
- Jackson, J. 2008. *Colloquium Paper: Ecological extinction and evolution in the brave new ocean*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 11458-11465.
- Jarup, L.; Hellström, L.; Alfvén, T.; Carlsson, M.; Grubb, A.; Pattersson, C.; Spang, G., Schutz A. y Elinder, C. 2012. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the Oscar study. *Occupational and Environmental Medicine*, 3(6): 668-672.

- Karupassamy, A.; Subathra, S. y Pavaneshwan, 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.
- Kim, R. y Faisal, M. 2010. Comparative susceptibility of representative Great Lakes fish species to the North American viral hemorrhagic septicemia virus. Sublineage IVb. *Dis. Aquat. Org.*, 91(1): 23- 34.
- Klaasen, C.; Liu, J. y Diwan, B. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 238: 215–220.
- Koenig, S. 2012. Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) and biomarkers of pollution in Mediterranean deep-sea organisms. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de 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.
- 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.
- 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.



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.

Manciocco, A.; Coluccio, P. y Passantino, A. 2010. Considerations on psychophysical welfare of fish employed in scientific procedures and on recommendation 2007/526/EC. *Ann Ist. Super Sanità*, 46(2): 198-203.

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.

Martínez, G.; Senior, W. y Márquez, A. 2006. Especiación de metales pesados en la fracción disuelta de las aguas superficiales de la cuenca baja y la pluma del Río Manzanares, Estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas.*, 32(2): 239-257.

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.

McGeer, J.; Szebedinzky, C.; McDonald, D. y Wood, C. 2002. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicol.*, 50:231-243.

Mekkawy, 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.

Mihaich, E.; Schafers, C.; Dreier, D.; Hecker, M.; Ortego, L.; Kawashima, Y.; Dang, Z.; y Solomon, K. 2017. Challenges in assigning endocrine-specific modes of action: recommendations for researchers and regulators. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 13(2): 280-292.

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

Molina, C.; Ibañez, C. y Gibon, F. 2013. Proceso de biomagnificación de metales pesados en un lago hiperhalino (Poopó, Oruro, Bolivia): posible riesgo en la salud de consumidores. *Ecol.*, 47(2): 99-118.

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.
- 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.
- Osorio, L.; Tovar, A. y Fortoul, T. 1997. En: *Introducción a la toxicología ambiental*. Albert Palacios, Lilia América. Metepec; ECO., 13: 211-261.
- Palencia, P. 1995. Clave identificadora para los peces de la cuenca alta de los ríos 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.
- Pérez, J.; Ojeda, G. y Antón, A. 1983. Blood Parameters in fishes. II. Oxygen affinity, Root effect, pH and the number of hemoglobin in some marine fishes of Eastern Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. UDO.*, 22(2): 29-34.
- 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.
- Ramírez, A. 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental ocupacional con indicadores biológicos. Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1): 51-64.

- Reyes, R.; Salazar, R. y García, E. 2001. Incorporation of cadmium by *Acetabularia calyculus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 149-155.
- 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. 2011. A practical approach to phagocytic function.
- Romero, Z. 2012. Caracterización morfológica y citoquímica de las células inmunocompetentes de hígado, riñón y sangre del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tesis de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- 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.
- Ruíz, L.; Salazar, S.; Pérez, J. y Alfonsi, C. 2005. Diversidad íctica del sistema hidrográfico Rio Manzanares, Edo. Sucre. Venezuela. *Bol. Centro. Investig. Biol.*, 39(2): 9-107.
- Sadiq, M. 1992. *Toxic metal chemistry in marine environments. Environments sciences and pollution control*. Serie. 1. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Salazar, R. 1993. Efectos de dosis subletales de cobre sobre el sistema inmunitario, metabolismo y crecimiento del poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomididae). Tesis M.Sc. 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-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.

Scheiner, B.; Dayle, F. y Kawatra, S. 1989. *Biotechnology in minerals and metal processing*. Society of Mining Engineers Inc. Littleton (CO).

Senior, W.; Fermín, I. y Mata, F. 2004. Diagnóstico ambiental y participación comunitaria para el control de la contaminación del río Manzanares. Tesis de grado. Edo. Sucre, Venezuela.

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.

Som, M.; Kundu, N.; Bhattacharyya, S. y Homechaudhuri, S. 2009. Evaluation of hemopoietic responses in *Labeo rohita* Hamilton following acute copper toxicit. *Toxicol. Environ. Chem.*, 9: 87-98.

Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *AnnuRev 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.

Tavares-Diaz, M. y Marques, J. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 22(4): 215-220.

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.

Tuzen, M. 2009. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black sea, Turkey. *Food. Chem. Toxicol.*, 47(6): 1785-1790.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines.
- Valenzuela, A.; Oyarsun, C. y Silva, V. 2003. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot, 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae) la serie blanca. *Gayana Concepción*, 67(1): 130-136.
- 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.
- Veiga, M.; Egami, M.; Ranzani-Paiva, M. y Rodrigues, E. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1840) (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18(2): 245-250.
- 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.
- Waalkes, M. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Bioch.*, 79: 241-244.
- Wang, J.; Kaletsky, R.; Silva, M.; Williams, A.; Haas, L.; Androwski, R. y Barr, M. 2015. Cell-specific transcriptional profiling of ciliated sensory neurons reveals regulators of behavior and extracellular vesicle biogenesis. *Cur. Biol.*, 25(24): 3232–3238.
- 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.
- WHO. 1992. Environmental Health Criteria 134: Cadmium, International Programming Chemical Safety (IPCS), Geneva, Switzerland.
- 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.

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.

## APÉNDICES

### Apendice 1: Esquema del bioensayo experimental

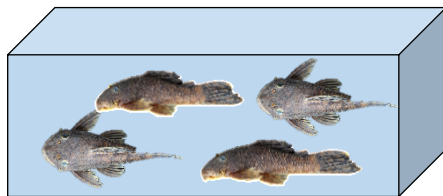
Organismos: *Ancistrus brevifilis*



**Periodo de aclimatación:** 7 días

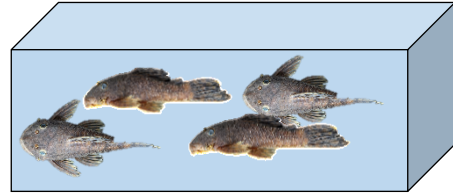
**Bioensayo:** Periodo de exposición (15 días)

**Acuario 1 (control)**



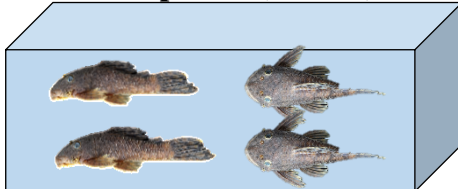
[0,00 mg/l] Cd

**Acuario 2 (expuestos)**



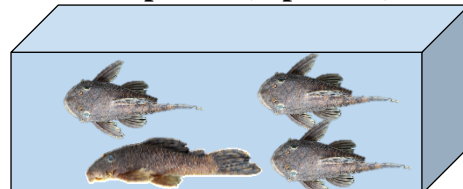
[0,1 mg/l] Cd

**Replica 1 (control)**



[0,00 mg/l] Cd

**Replica 2 (expuestos)**

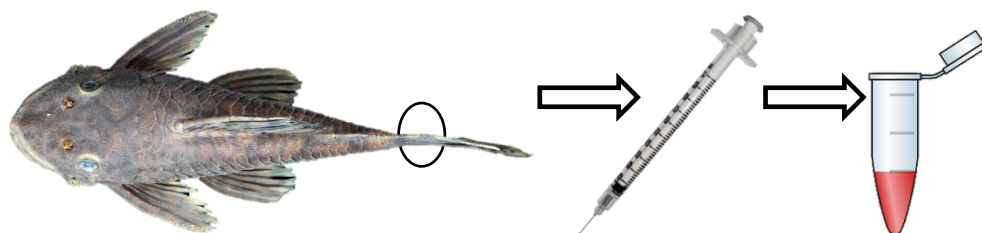


[0,1 mg/l] Cd

4 organismos por cada acuario

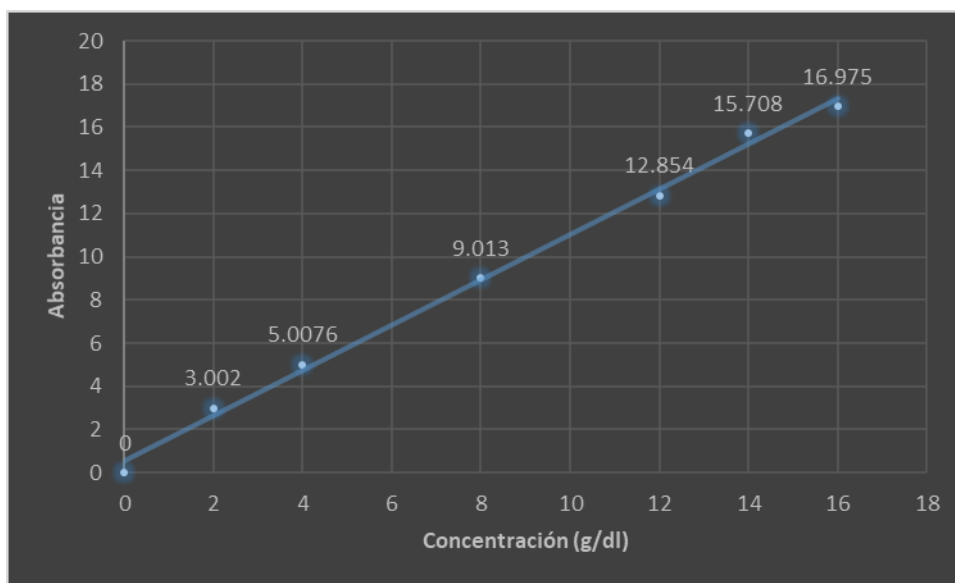
Número total de organismos = 16

### Toma de muestra



Apéndice 2. Curva de calibración de hemoglobina y Resumen del estadístico *t*-Student para los diversos parámetros determinados

### Curva de calibración de hemoglobina





### Resumen del estadístico *t*-Student para los diversos parámetros determinados

Hemoglobina		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Control	Expuestos
Mean	10.32000	5.11000
Variance	3.47043	0.83913333
Observations	7.00000	7
Hypothesized Mean Difference	0.00000	
df	9.00000	
t Stat	6.64003	
P(T<=t) one-tail	0.00005	
t Critical one-tail	1.83311	
P(T<=t) two-tail	0.00009 *	
t Critical two-tail	2.26216	

Hematocrito		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>control</i>	<i>Expuesto</i>
Mean	29.85714286	19.8571429
Variance	23.80952381	53.8095238
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	3.003065918	
P(T<=t) one-tail	0.006636967	
t Critical one-tail	1.812461123	
P(T<=t) two-tail	0.013273935 *	
t Critical two-tail	2.228138852	

Glóbulos rojos		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	3.737142857	2.72285714
Variance	0.700990476	0.17802381
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	2.862275031	
P(T<=t) one-tail	0.009355428	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	<b>0.018710856</b>	
t Critical two-tail	2.262157163	

GB		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	5391	3978.57143
Variance	1097795	342380.952
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	3.113922049	
P(T<=t) one-tail	0.006219965	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	<b>0.01243993</b> *	
t Critical two-tail	2.262157163	

VCM		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	8.227142857	7.09571429
Variance	1.510857143	3.50292857
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	1.33688262	
P(T<=t) one-tail	0.105438788	
t Critical one-tail	1.812461123	
P(T<=t) two-tail	0.210877576	NS
t Critical two-tail	2.228138852	

HCM		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	2.875714286	1.88142857
Variance	0.434828571	0.04654762
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	7	
t Stat	3.791559859	
P(T<=t) one-tail	0.003394537	
t Critical one-tail	1.894578605	
P(T<=t) two-tail	0.006789073	*
t Critical two-tail	2.364624252	

CHCM		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	34.28571429	28.06
Variance	2.571428571	60.8115667
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	7	
t Stat	2.068958725	
P(T<=t) one-tail	0.038667771	
t Critical one-tail	1.894578605	
P(T<=t) two-tail	0.077335542	NS
t Critical two-tail	2.364624252	

Granulocitos		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	48.57142857	29.5714286
Variance	38.95238095	72.2857143
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	11	
t Stat	4.766239364	
P(T<=t) one-tail	0.000292103	
t Critical one-tail	1.795884819	
P(T<=t) two-tail	0.000584206	*
t Critical two-tail	2.20098516	

Monocitos		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	32.57142857	34.2857143
Variance	49.95238095	228.571429
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	-0.271769717	
P(T<=t) one-tail	0.395965225	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.791930451	NS
t Critical two-tail	2.262157163	

Linfocitos		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	18.71428571	34
Variance	18.9047619	84.6666667
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	9	
t Stat	-3.973880237	
P(T<=t) one-tail	0.001617798	
t Critical one-tail	1.833112933	
P(T<=t) two-tail	0.003235597	*
t Critical two-tail	2.262157163	

Basófilos		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	0.142857143	0
Variance	0.142857143	0
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
t Stat	1	
P(T<=t) one-tail	0.177958842	
t Critical one-tail	1.943180281	
P(T<=t) two-tail	0.355917684	NS
t Critical two-tail	2.446911851	

Adherencia		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	56.57142857	18.2857143
Variance	134.6190476	13.5714286
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	7	
t Stat	8.321002016	
P(T<=t) one-tail	3.54211E-05	
t Critical one-tail	1.894578605	
P(T<=t) two-tail	0.000071	*
t Critical two-tail	2.364624252	

Viabilidad		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	<i>Control</i>	<i>Expuestos</i>
Mean	91.71428571	78
Variance	37.9047619	18
Observations	7	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	11	
t Stat	4.852860552	
P(T<=t) one-tail	0.000254216	
t Critical one-tail	1.795884819	
P(T<=t) two-tail	<b>0.000508433</b> *	
t Critical two-tail	2.20098516	

## HOJAS DE METADATOS

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

<b>Título</b>	“EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS EN EL PEZ <i>Ancistrus brevifilis</i> (EIGENMANN, 1920)”
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
José David Maestre Gamardo	<b>CVLAC</b>	23.433.894
	<b>e-mail</b>	jdmaestre08@gmail.com
	<b>e-mail</b>	
Miguel Enrique Núñez Vásquez	<b>CVLAC</b>	21.093.118
	<b>e-mail</b>	Miguel.01en@gmail.com
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

<i>Ancistrus brevifilis</i>
Cadmio
Concentración subletal



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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Sub-área
Ciencias	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

La presente investigación tuvo como objetivo fundamental evaluar algunos parámetros hematológicos e inmunológicos en el pez dulceacuícola *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920) expuesto a una concentración subletal de cadmio (0,1mg/l). Se utilizaron ejemplares juveniles de *A. brevifilis* colectados en el río Manzanares, Cumaná, estado Sucre, los cuales fueron transportados en bolsas plásticas negras, conteniendo agua y oxígeno, 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 diarios de la temperatura y pH del agua; finalizado este lapso se procedió a someterlos al bioensayo de toxicidad subletal (15 días). Para esto, se colocaron 16 peces, repartidos en cuatro acuarios, divididos en dos grupos: expuestos y control; con 4 organismos por acuario con su respectiva réplica, utilizándose un sistema de ensayo semi-estático, al final del cual se procedió a la toma de muestra sanguínea. Para comparar los valores de los diferentes parámetros estudiados entre el grupo de organismos expuesto *versus* el grupo control, se utilizó un *t*-Student. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas con respecto a la concentración de Hb, porcentaje de Hto, contaje de leucocitos y eritrocitos, en el porcentaje de células granulocíticas del tipo neutrófilas y linfocíticas, así como en el HCM; de igual manera, se hallaron diferencias con relación a la adherencia y viabilidad celular. Todos estos hallazgos permiten concluir que, posiblemente el Cd causó algún tipo de efecto dañino 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 salud del organismo; es decir, el Cd es un elemento capaz de causar anemia así como alteraciones en el sistema hematopoyético e inmune innato del pez, y por consiguiente, comprometer la integridad biológica y por lo tanto, derivar en disminución o pérdida de la viabilidad del organismo.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Antón Marín, Yanet</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>8.439.227</b>
	e-mail	<b>yanetanton2019@gmail.com</b>
<b>Velásquez Vottelerd, Patricia</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>17.446.999</b>
	e-mail	<b>patriciavelasquezv@gmail.com</b>
<b>Herrera Mata, Hernando</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>5.872.352</b>
	e-mail	<b>hherrera.mata@gmail.com</b>

Fecha de discusión y aprobación:

**Año Mes Día**

<b>2020</b>	<b>10</b>	<b>22</b>
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SP

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

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis de Grado-NuñezMyMaestreJ.doc	Word 2016

### Alcance:

Espacial: \_\_\_\_\_ Nacional (Opcional)

Temporal: \_\_\_\_\_ Temporal (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

\_\_\_\_\_ Licenciado(a) en Bioanálisis

Nivel asociado con el Trabajo: Licenciado(a)

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

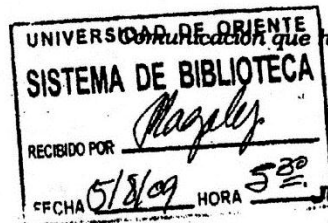
Cumaná, 04 AGO 2009

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.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNPELE**  
Secretario



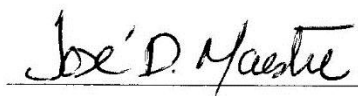
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/maruja

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

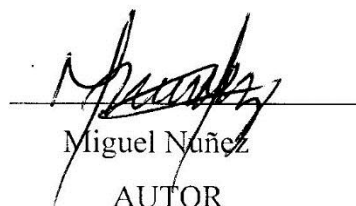
**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6**

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



José D. Maestre

AUTOR



Miguel Nuñez  
AUTOR



Yanet Antón

ASESOR ACADÉMICO