

# CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES INDUCIDOS POR EL CADMIO EN PRONEFROS DE ALEVINES DE *Colossoma macropomum*

## *Ultrastructural Changes Induced by Cadmium in Pronephros of Colossoma macropomum*

Yanet Antón-Marín<sup>1,3\*</sup>, Luz Marina Rojas<sup>2</sup> y Raquel Salazar-Lugo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioanálisis. Escuela de Ciencias. Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente. <sup>2</sup>Laboratorio de Histología, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Doctora Susan Tai" (IIBCA-UDO), Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. <sup>3</sup>Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Postgrado en Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente. \*yantonn@udo.edu.ve

### RESUMEN

Con el propósito de evaluar el efecto de la exposición crónica al cadmio sobre la ultraestructura del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum*, 60 individuos de esta especie fueron expuestos durante 31 días a una dosis subletal de cadmio de 0,1 mg/L usando acuarios en un sistema semi-estático. Los parámetros físico-químicos se mantuvieron constantes durante todo el ensayo (pH:  $7,0 \pm 0,3$ ; temperatura:  $24 \pm 1$  °C; dureza total: 106 mg/L; nivel de O<sub>2</sub>:  $3,9 \pm 0,1$  mg/L), al final del lapso de exposición los pronefros fueron extraídos y procesados con técnicas convencionales para microscopía electrónica de transmisión. El análisis ultraestructural demostró cambios significativos en el órgano, observándose necrosis en el tejido, así como la formación de gemaciones en la membrana citoplasmática de las células granulopoyéticas. Estos hallazgos permiten concluir que a nivel ultraestructural, tanto el pronefros como las células granulopoyéticas que en él se originan, muestran sensibilidad a la exposición al cadmio, pudiendo ser utilizados como útiles biomarcadores de exposición a este metal.

**Palabras clave:** Pronefros; cadmio; *Colossoma macropomum*; histopatología; ultraestructura.

### ABSTRACT

The effect of chronic exposure to cadmium on the ultrastructure of pronephros of *Colossoma macropomum* was evaluated, by studying 60 individuals of this species exposed through 31 days to sublethal doses of cadmium (0.1 mg/L), while inside aquariums in a semistatic system. The physical-chemical parameters were maintained constant during all test (pH  $7.0 \pm 0.3$ ; temperature:  $24 \pm 1$  °C; total hardness: 106 mg/L; oxygen levels:  $3.9 \pm 0.1$  mg/L), at the end of the exposure cycle the specimens were extracted and treated with conventional transmission electron microscopy techniques. The ultrastructural analysis demonstrated appreciable changes in the organs, tissue necrosis as well as blebbing in the cytoplasmic membrane of the granulopoietic cells. These findings show how at the ultrastructure level, the granulopoietic cells generated by the pronephros display sensitivity to cadmium exposure, allowing for them to be used as bioindicators to exposure to this metal.

**Key words:** Pronephros; cadmium; *Colossoma macropomum*; histopathology; ultrastructure.

## INTRODUCCIÓN

En los peces, el órgano encargado de realizar la hematopoyesis es el pronefros o riñón cefálico. El pronefros en teleósteos es un órgano fusionado que está compuesto fisiológicamente por dos distintas porciones y anatómicamente por dos partes. Este órgano tiene una intervención importante en el mecanismo de 1a defensa inmunológica y en el proceso de hematopoyesis, por lo que es comparado con la médula ósea de los mamíferos [4, 7, 17].

Debido a la significación del pronefros en el sistema inmunitario de los peces se reconoce la importancia de su estudio ya que estos organismos al vivir en un ambiente cargado de microorganismos deben contar con células capaces de protegerlos de los mismos, células estas que son producidas mayoritariamente en este órgano; al mismo tiempo, se sabe que los tóxicos producen cambios histológicos en el pronefros [3, 13]. Se han documentado cambios significativos en la citoarquitectura del pronefros así como alteraciones en la ultraestructura de las células del mismo cuando el órgano se halla expuesto a sustancias tóxicas, un ejemplo de ello se puede hallar en *Cyprinus carpio*, donde se han demostrado daños evidentes en el pronefros expuesto a 0,1 mg/L de cadmio (cd) [33]; así mismo, en un trabajo previamente realizado en juveniles de *Colossoma macropomum* expuestos a dosis de 0,1 mg/L de Cd, se observó mediante microscopia de luz, alteraciones de la estructura del pronefros, tales como engrosamiento de la membrana basal y pérdida del compactamiento del tejido, igualmente se advirtió la disminución de los precursores celulares hematopoyéticos, en especial los pertenecientes a la serie granulocítica [32].

La exposición de los peces a diversos contaminantes químicos induce una serie de modificaciones estructurales en diferentes órganos, particularmente el riñón, por lo cual la evaluación histopatológica representa una herramienta valiosa y fundamental para apreciar los efectos de los xenobióticos [2, 37, 42]. Las alteraciones estructurales y ultraestructurales a nivel celular e histológico son de gran utilidad, ya que ocurren antes de que haya cambios reproductivos, de crecimiento y de comportamiento. Estas modificaciones pueden ser exitosamente relacionadas con la salud y desempeño de los individuos, además de colaborar, en conjunción con otros parámetros bioquímicos y moleculares, en el diagnóstico del estado de salud de los organismos; al respecto, existen en peces modificaciones histopatológicas como hiperplasias, hipertrofias, alteraciones nucleares y plasmáticas, edemas intercelulares, necrosis, entre otras, que ya han sido usadas y recomendadas para monitorear y evaluar los efectos de los xenobióticos lo cual brinda información valiosa sobre los potenciales biomarcadores histológicos en el pronefros de peces y especialmente en *C. macropomum* [5, 35, 36, 41, 42].

*C. macropomum* es uno de los peces más importantes en el ambiente dulceacuícola de Sudamérica, constituyendo además un recurso económico cada vez más valioso para la región y para Venezuela [1, 8]. Por otro lado, está documentado el papel

inmunotóxico del Cd [41], metal registrado como contaminante moderado de las cuencas venezolanas [26, 31]. El objetivo del presente estudio fue evaluar los daños ultraestructurales inducidos por la exposición crónica a Cd en el pronefros de *C. macropomum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos

Alevines de *C. macropomum* (donados por la Empresa piscicultura ALMA, C.A. ubicada en la carretera nacional Cantaura-Aguasay, Campo Mata, distrito Freites del estado Anzoátegui, Venezuela) con las siguientes medidas biométricas iniciales: longitud total  $3,02 \pm 1,20$  cm y masa  $3,11 \pm 1,80$  gr, fueron trasladados, desde la piscicultura, en bolsas plásticas selladas conteniendo agua y oxígeno, hasta el laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, ubicado en el Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre, los alevines fueron introducidos (estando aún en las bolsas donde fueron transportados) en acuarios de vidrio (medidas 60 x 30 x 40 cm y con capacidad útil de 60 L de agua) que contenían agua previamente aireada y sin cloro. Al cabo de 30 minutos, los peces fueron sacados uno por uno de las bolsas plásticas con una malla para peces (marca Fish Net, Hagen, EUA), de 20 cm (8") e introducidos directamente en el agua de los acuarios para así dar inicio al periodo de aclimatación.

Durante el periodo de aclimatación (21 días -d-), todas las mañanas y antes del recambio de agua y eliminación de desechos, los peces eran alimentados a saciedad con alimento comercial en hojuelas para peces tropicales (marca Kantal, Venezuela) (proteínas 45%; grasas 4,5%; fibra 7,0%), manteniéndolos en continua aireación, utilizando para ello bombas de aire (marca ELITE, modelo 802; Malasia). Así mismo, los acuarios fueron cubiertos con bolsas plásticas negras para disminuir la cantidad de luz artificial y de esta forma mantener las condiciones de iluminación lo más parecido a su ambiente natural. Los parámetros físico-químicos se mantuvieron constantes durante todo el ensayo (pH:  $7,0 \pm 0,3$ ; temperatura:  $24 \pm 1$  °C; O<sub>2</sub>:  $3,9 \pm 0,1$  mg/L; dureza total: 106 mg/L), siendo estos parámetros monitoreados diariamente y registrados con un pH-metro (Hanna modelo HI9025, España), un termómetro (YSI modelo 30, EUA), un oxigenómetro (YSI modelo 55, EUA) y un equipo (kit) de pruebas para determinar dureza del agua (LaMotte modelo 4482-LI-02, EUA), respectivamente. Al final de este periodo, se procedió al montaje del bioensayo y a la posterior obtención de las muestras.

### Bioensayo subletal

#### Este se realizó de la siguiente manera:

Tomando como base la concentración letal media (LC50) para el Cd determinado en esta especie [6], el cual fue de 38,47 mg/L, se empleó una dosis subletal de 0,1 mg/L de Cd tomada a partir de una concentración madre de 1000 mg/L.

Luego de cumplido el periodo de aclimatación, se procedió a colocar (48 horas (h) antes) 60 peces de tallas similares (longitud total:  $4,50 \pm 1,80$  cm; masa:  $4,11 \pm 0,20$  gr) en cada uno de los acuarios (exactamente iguales a los usados en el periodo de aclimatación) preparados para tal fin. Los peces, a razón de 10 individuos por acuario, fueron divididos en dos grupos experimentales: un grupo expuesto y un grupo control, cada uno con dos réplicas, lo que equivalió a tres acuarios por cada grupo (6 acuarios en total).

El tóxico fue colocado durante 31 d en el agua de los acuarios del grupo expuesto, siendo utilizado un sistema de ensayo semi-estático con recambio diario del 80% de agua, manteniendo constantes las concentraciones de Cd en cada acuario por medio de la agregación de la dosis correspondiente [19]. Previamente, al agua utilizada para el ensayo (proveniente del sistema de tuberías de la ciudad de Cumaná), se le determinó la concentración inicial de Cd, la cual fue indetectable, utilizándose para tal fin un espectrofotómetro de emisión de plasma inductivamente acoplado (ICP), (marca Perkin Elmer, modelo Optima 5300 DV, EUA). Igualmente antes de cada renovación del agua, se tomaron muestras de la misma para determinar, espectrofotométricamente, las concentraciones residuales de Cd ( $0,22 \pm 0,02$  mg/L). Así mismo, se llevó un registro diario de los parámetros físico-químicos, manteniéndose éstos iguales a los obtenidos durante todo el proceso de aclimatación.

Al final del periodo de exposición al metal (31 d), se procedió a tomar las muestras para la realización de los análisis histológicos.

Para la obtención de las muestras los organismos fueron colocados en una cubeta con agua a 5°C para que se adormecieran y así pesarlos y medirles la longitud estándar.

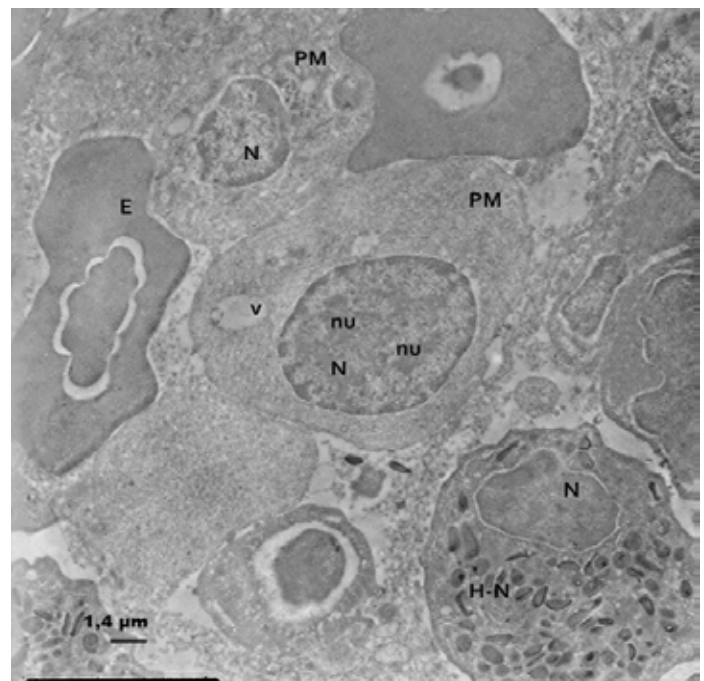
Cada uno de los peces (con medidas biométricas promedio:  $5,2 \pm 1,30$  cm y masa  $6,01 \pm 1,15$  gr) según su condición (expuestos y controles) fueron rápidamente decapitados mediante un corte en la zona inmediatamente posterior a la región opercular, luego se procedió a realizar una incisión desde la región dorsal hasta la zona del pedúnculo caudal, para abrir el animal y exponer la cavidad abdominal para extraer el pronefros, el cual fue procesado con técnicas convencionales para microscopía electrónica de transmisión.

Una vez extirpado el órgano se colocó en solución de Hank y luego, con un bisturí se le realizaron cortes de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ , los cuales se colocaron bajo refrigeración en viales con glutaraldehído al 3%. Luego fueron lavados con buffer fosfato 0,1 mol/L pH 7,4; para posteriormente colocarlos en tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% por 2 h. Se lavaron con agua destilada, se pasaron por patrones de etanol de concentraciones crecientes (50; 70; 90 y 100%) por 5 min cada uno. Luego de la deshidratación total se pasó a la infiltración mediante la sustitución del etanol por óxido de propileno colocando la muestra en el óxido por 15 min, posteriormente fueron colocados en una mezcla 1:1 de Epón: óxido de propileno por 6 h y luego a Epón puro por 2 h. Las muestras fueron incluidas en Epón, en moldes de silicona y polimerizadas en una estufa, (marca Thermo Fisher Scientific, modelo Precision, EUA) a 60°C por 48 h.

Seguidamente se efectuaron los tallados de los bloques de resina. Luego de tallados los bloques, se realizaron los cortes ultrafinos, los cuales tenían un grosor de 80 nm, con un ultramicrotomo motorizado (marca LEICA, modelo RM 2155, Alemania) con cuchilla de diamante. Los cortes se contrastaron por 24 h con acetato de uranilo al 5%, fueron lavados con agua destilada y se colocaron en una solución de citrato de plomo al 0,2% por 1 h para posteriormente ser lavados con agua destilada. Se procedió a realizar el análisis de los cortes mediante micrografías tomadas en un microscopio electrónico de transmisión (marca HITACHI, modelo H-600, Japón) ubicado en el Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente "Doctora Susan Tai"

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

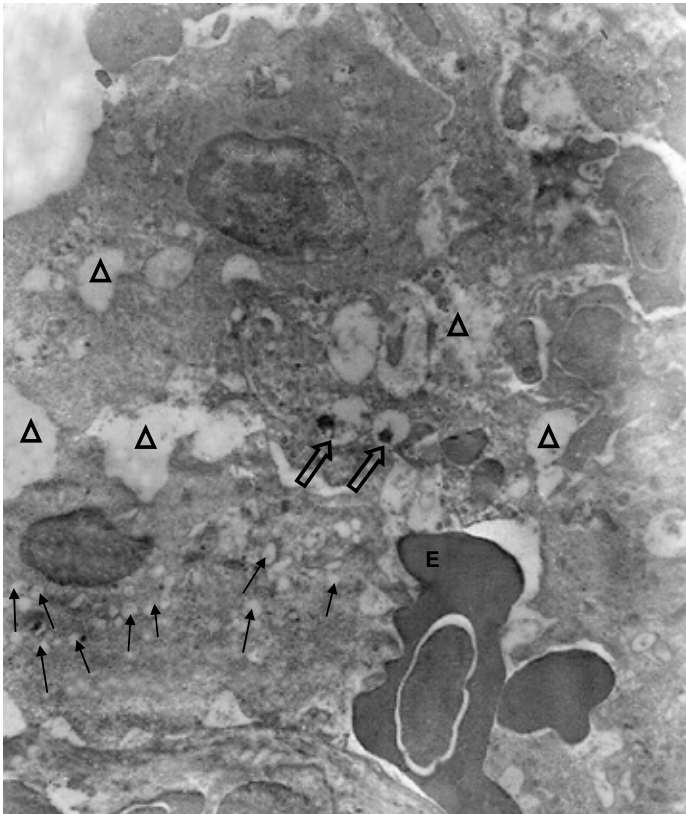
El análisis ultraestructural del pronefros de alevines de *C. macropomum* controles mostró que era un órgano eminentemente hematopoyético formado por células con características normales, con el citoplasma bien definido. El tejido se observó altamente heterogéneo, compacto, y en él se evidenciaron los elementos de las diferentes series o linajes hematopoyéticos en sus variadas etapas de maduración, encontrándose distribuidas de forma regular en la matriz del tejido (FIG. 1).



**FIGURA. 1. MICROGRAFÍA DE PRONEFROS CONTROL DE *Colossoma macropomum*. PROMIELOCITO (PM). ERITROCITO (E). HETERÓFILO NEUTRÓFILO (H-N). NÚCLEOS (N). NUCLÉOLOS (NU). VESÍCULA (V). A: 4000X.**

El pronefros de alevines de *C. macropomum* expuestos al Cd, mostró cambios ultraestructurales significativos comparados

con el de los controles (FIG. 2). Se percibieron procesos de alteración de la ultraestructura del tejido, evidenciado por la existencia de extensas zonas de necrosis y abundantes *detritus* celulares, así mismo se pudieron advertir células muy vacuolizadas con presencia de vacuolas autofágicas; igualmente, algunas células no mostraron continuidad citoplasmática.



**FIGURA 2. MICROGRAFÍA DE PRONEFROS DE *C. macropomum* EXPUESTO A CADMIO. ZONAS DE NECROSIS (TRIÁNGULOS), DETRITUS CELULARES; MÚLTIPLES VACUOLAS CITOPASMÁTICAS (FLECHAS DELGADAS) Y AUTOFÁGICAS (FLECHAS VACÍAS). E: ERITROCITO. A: 4000X.**

Las células granulocíticas del tipo heterófilas y las del tipo eosinofílicas se mostraron deformes, exhibiendo muchas de ellas extensiones de la membrana a modo de gemaciones o ampollas y con material celular en su interior. En algunas áreas solo se pudieron visualizar núcleos aislados y células con muy poco material citoplasmático, dando así evidencia del daño sufrido por el órgano y sus células (FIGS. 3, 4, 5 y 6).

Existen numerosas evidencias del efecto tóxico del Cd sobre diferentes órganos, en los cuales se acumula, ocasionando daños diversos sobre todo a nivel histopatológico [15, 18, 24, 25, 38]. Las alteraciones provocadas por la exposición al Cd en el pronefros de *C. macropomum* fueron notorias, tanto en la estructura del tejido como en la ultraestructura de las células que lo conforman, así lo muestra la presencia de procesos de necrosis (FIG. 2). La falta de integridad del tejido pudiera ser una consecuencia de la acción deletérea directa o indirecta del Cd

sobre el metabolismo del colágeno, el cual actúa como sostén de todas las estructuras tisulares [14, 21], sumado al hecho de que el Cd inhibe una serie de enzimas fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis del tejido, como por ejemplo las del grupo del glutatión y la catalasa, entre otras, por lo cual los radicales libres actúan intracelularmente dañando y deformando las diferentes estructuras celulares mediante estrés oxidativo, con el consiguiente daño a la integridad del órgano [25].

En ejemplares de *Channa punctatus* expuestos a Cd se halló que este metal produjo necrosis severa del riñón, así como la aparición de abundantes vacuolas alrededor de los túbulos del órgano [16]. Así mismo, en un estudio realizado con *Siganus rivulatus* expuestos a aguas contaminadas con Cd (con niveles semejantes al usado en la presente investigación) se determinaron daños estructurales a nivel del riñón [27], igualmente se observaron en tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a metales pesados, tales como cobre, mercurio y Cd, que los cambios del órgano fueron principalmente de necrosis y vacuolización, lo que al parecer señala que uno de principales efectos que tienen los metales pesados sobre el riñón es la producción de necrosis y la vacuolización del tejido [22].

El Cd es conocido por agotar el glutatión y los grupos sulfhidrido de las proteínas, lo que resulta en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como iones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. También ejerce sus efectos tóxicos a través de daño oxidativo a los organelos celulares mediante la inducción de la generación de ROS. Si estos eventos de estrés mediados por ROS no son equilibrados por los procesos de reparación, las reacciones de éstos con las biomoléculas celulares pueden provocar peroxidación lipídica, daño de las proteínas de membrana, alteración del sistema anti-oxidante, daño en el ADN, expresión de genes alterados, apoptosis, y finalmente necrosis, lo cual concuerda con los resultados de esta investigación [36, 38, 40].

La observación de células con gemaciones o ampollas en los heterófilos muestra un hallazgo importante de la acción del metal sobre las células del pronefros (FIGS. 3, 4 y 6). Las ampollas son excrescencias esféricas de la membrana plasmática (MP) que ocurren al haber desprendimiento de la membrana subyacente al citoesqueleto, o lo que es lo mismo, estas ampollas son el resultado de la falta de adhesión del citoesqueleto a la MP debido a un aumento de la contractilidad del mismo [29]. Aunque han sido tradicionalmente vistas como un signo de apoptosis [12], las ampollas están siendo consideradas cada vez más como factores dinámicos de reorganización celular con un papel importante en la motilidad celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, así mismo, se les considera una estrategia de migración de las células tumorales [10]; no obstante, en este estudio se estima que estos hallazgos pudieran tener relación con ambos eventos tanto con el proceso de apoptosis celular promovido por el Cd, como con el de migración celular, sugiriéndose además que esta fase de apoptosis es debida, principalmente, a la acción del metal sobre la actina la cual es un componente fundamental del citoesqueleto [20].

Se ha postulado que el Cd altera la actina del citoesqueleto de las células mesangiales del riñón de ratones (*Mus musculus*)

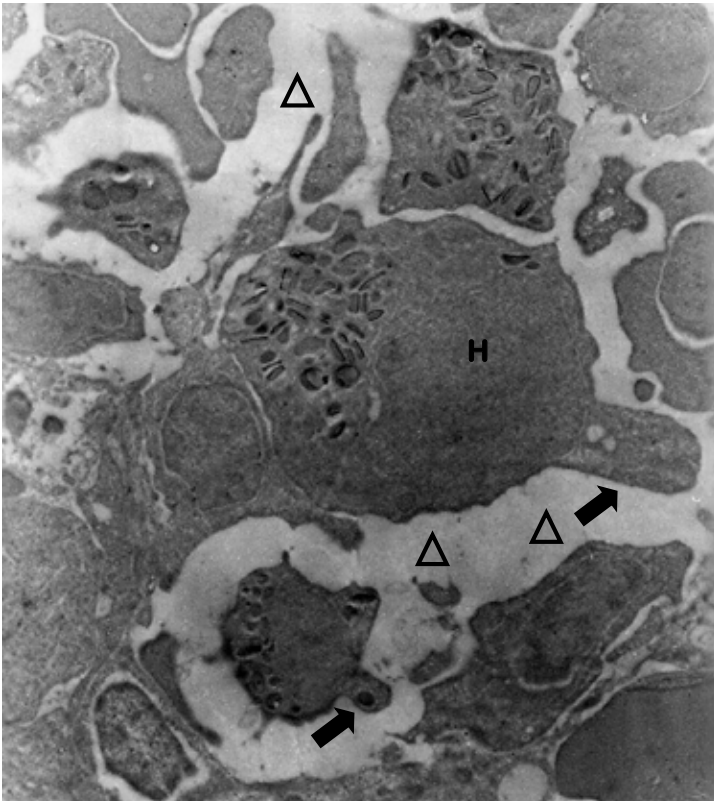


FIGURA 3. PRONEFROS DE *Colossoma macropomum* EXPUESTO A CADMIO. ZONAS DE NECROSIS (TRIANGULO), HETERÓFILOS DEL TIPO NEÚTRÓFILO (H) PRESENTANDO AMPOLLAS CON MATERIAL CELULAR EN SU INTERIOR (FLECHAS LLENAS). A: 4000X

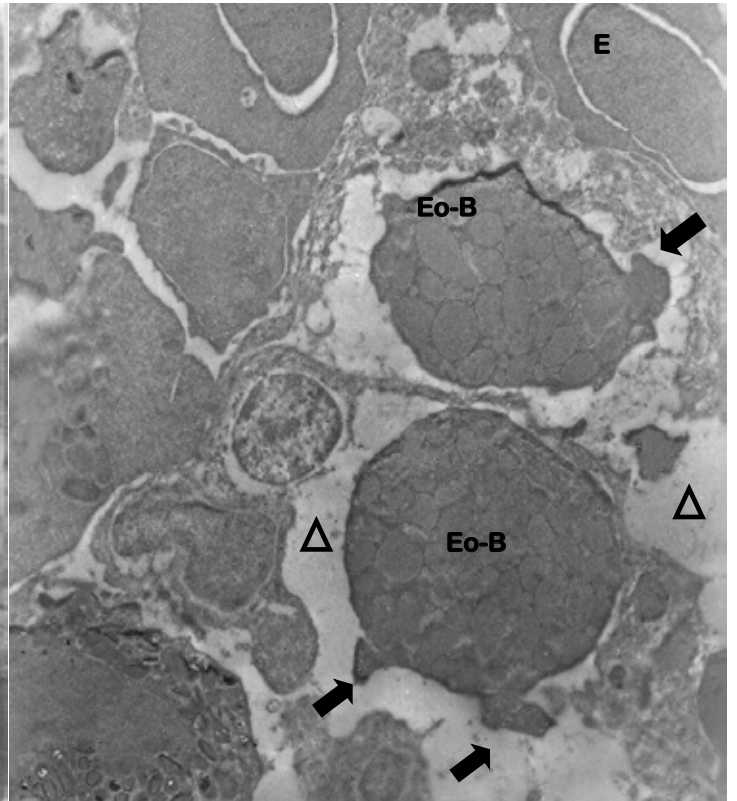


FIGURA 4. PRONEFROS DE *Colossoma macropomum* EXPUESTO A CADMIO. NECROSIS (TRIANGULOS), HETERÓFILOS DEL TIPO EOSINÓFILOS/BASÓFILOS (EO-B) CON IRREGULARIDADES EN LA MEMBRANA CELULAR (FLECHAS GRUESAS). ERITROCITO (E). A: 4000X.

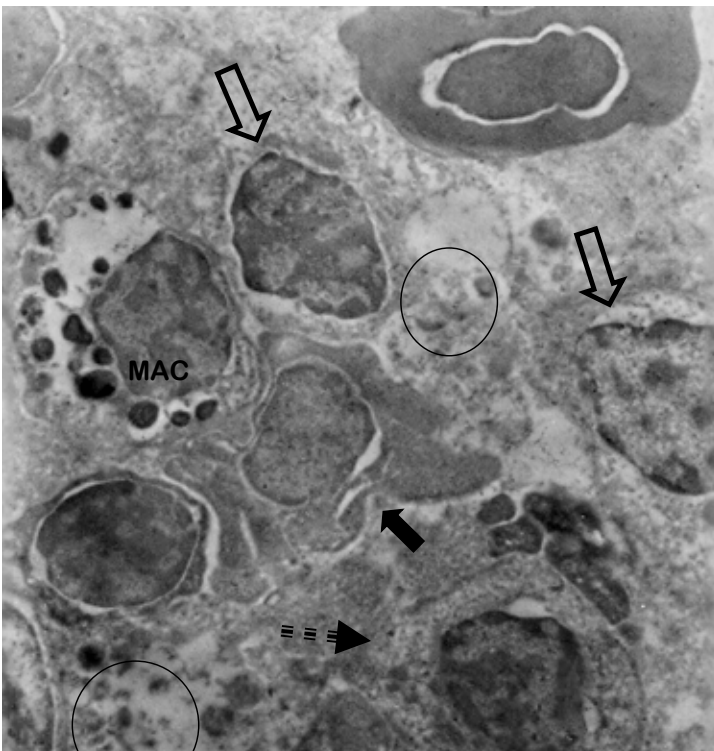


FIGURA 5. PRONEFROS DE *C macropomum* EXPUESTO A CADMIO. ERITROCITO CON DEFORMIDAD CITOPASMÁTICA. (FLECHA LLENA). CÉLULA CON DISCONTINUIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR (FLECHA INTERMITENTE TRIPLE). CÉLULAS CON CITOPLASMA POCO O AUSENTE (FLECHAS VACÍAS). DETRITUS CELULARES (CÍRCULOS), MACRÓFAGO (MAC). A: 5000X

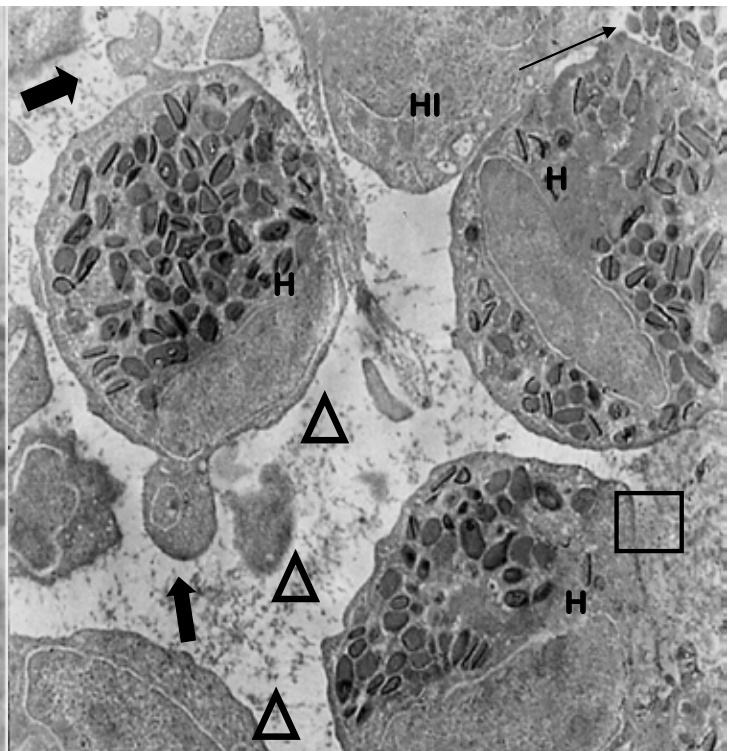


FIGURA 6. GRUPO DE HETERÓFILOS TIPO NEÚTRÓFILO (H), CON AMPOLLAS CITOPASMÁTICAS (FLECHAS CORTAS GRUESAS). GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS LIBRES (FLECHA NEGRA DELGADA), ÁREAS DE NECROSIS (TRIANGULOS) Y DETRITUS (RECTÁNGULO). A: 5000X

transgénicos modelo 129/Sv [39], esto implica una interacción compleja que involucra la activación de la señalización de quinasas, la translocación de proteínas, y la alteración de las adherencias. Los efectos del Cd sobre la actina juegan un papel fundamental en la reorganización del citoesqueleto y los mismos tienen que ver más con el metabolismo del glutatión y no por los efectos directos de ROS en la química de los grupos tioles. Al parecer el metal impide que se forme un complejo glutatión-actina el cual es primordial en la reorganización del citoesqueleto [11, 15, 39], hecho éste que pudiera explicar la aparición de ampollas en la membrana citoplasmática de las células del pronefros.

Otro mecanismo por el cual pudiera ocurrir este daño viene dado por el hecho de que el Cd induce el rompimiento del complejo E-caderina/ $\beta$ -catenina de las uniones adherentes epiteliales, las caderinas son glicoproteínas transmembrana mediadoras de la adhesión célula-célula y las cateninas son proteínas de células animales involucradas en los procesos de adhesión celular mediados por caderinas, esta interrupción del proceso de unión causa que se cambien las vías de señalización para un mediador, el *Wnt*, que promueve la proliferación celular, haciendo que se propaguen las células indiscriminadamente por lo cual el Cd está involucrado en el daño al riñón por medio de la promoción de la carcinogénesis [9, 28, 30], siendo entonces estas ampollas, quizás, un medio de movilización de material celular alterado hacia otras células y/o tejidos (FIG: 3, 4, 6).

Trabajos previos demuestran la sensibilidad del órgano a los xenobióticos [16, 23], reportándose que a nivel estructural, el Cd causa alteración por engrosamiento de la membrana basal del pronefros en juveniles de *C. macropomum* expuestos a la misma concentración de Cd utilizada en esta investigación [32], igualmente en juveniles de *Cyprinus carpio* expuesto desde 48 a 168 h a 0,1 mg/L de Cd se hallaron cambios diferenciales específicos en el órgano, hallándose la presencia de espacios intracelulares, así como la vacuolización en los eosinófilos, la disociación de las membranas celulares, junto con la formación de figuras mielínicas [33]. Otro ejemplo de ello es el estudio realizado con un herbicida, donde se determinó la sensibilidad del riñón de *C. macropomum* a este contaminante, encontrándose signos de modificaciones ultraestructurales capaces de causar alteraciones en la funcionalidad del órgano [34].

## CONCLUSIONES

Basado en los resultados obtenidos en este trabajo, fue posible concluir que la exposición de alevines de *C. macropomum* a una dosis subletal (0,1 mg/L) de Cd por 31 d causó alteraciones ultraestructurales, tanto en el pronefros como las células que en él se producen, ocasionando modificaciones estructurales severas a las células. Tales resultados brindan evidencia clara del potencial tóxico de este metal ya que puede comprometer la integridad y salud del pez, dañando seriamente un órgano tan vital como lo es el pronefros.

Se demuestra la sensibilidad al Cd del pronefros y de las células que en él se originan, por lo cual ambos elementos (tanto

el pronefros como sus células) pudieran ser utilizados para el monitoreo del estado de salud de los peces, en asociación con otros biomarcadores, como parte de un sistema integrado de alarma

## AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) UDO PROYECTO G-2005000775. A la empresa piscicultora ALMA C.A., por haber donado los peces y por su colaboración prestada al proyecto G-2005000775. Al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Doctora Susan Tai" (IIBCA-UDO), Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, así como al Postgrado en Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ÁLVAREZ, A.; ARU, R.; BARRERO, M.; GONZÁLEZ, E.; GONZÁLEZ, Y.; SEPÚLVEDA, G. Estudio biogeoquímico del embalse Suata, Venezuela, de acuerdo al contenido metálico de sus sedimentos de fondo, aguas y peces. **ACI**. 3 (1): 103-114. 2012.
- [2] AU, D. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Mar. Pollut. Bull.** 48: 817-834. 2004.
- [3] BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic non-lethal level of Elsan, mercury, and ammonia. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 29 (3): 265-75. 1994.
- [4] BENNETT, C.; KANKI, J.; RHODES, J.; LIU, T.; PAW, B.; KIERAN, M.; LANGENAU, D.; DELAHAYE-BROWN, A.; ZON, L.; FLEMING, M.; THOMAS, A. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. **Blood**. 98: 643-651. 2001.
- [5] BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish. Dis.** 22: 25-34. 1999
- [6] BLANCO, Y.; SALAZAR, R.; LEMUS, M.; GARCÍA, N.; HERNÁNDEZ, M.; CENTENO, L.; MATUTE, C.; PÉREZ, J. Parámetros hematológicos del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818); expuesto a cadmio. **Acta Cientif. Venez.** 55: 27-29. 2004.
- [7] CATTON, W. Blood cell formation in certain teleost fishes. **Blood**. 6: 39-60. 1951.
- [8] CENTENO, L.; SILVA, R.; BARRIOS, R.; SALAZAR, R.; MATUTE, C.; PÉREZ, J. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. **Zoot. Trop.** 25 (4): 237-243. 2007.

- [9] CHAKRABORTY, P.; LEE, W.; MOLITOR, M.; WOLFF, N.; THÉVENOD, F. Cadmium induces *Wnt* signaling to up regulate proliferation and survival genes in sub-confluent kidney proximal tubule cells. **Mol. Cancer**. 9 (102): 1-16. 2010.
- [10] CHARRAS, G.; PALUCH, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9: 730-736. 2008.
- [11] CHOONG, G.; LIU, Y.; XIAO, W.; TEMPLETON, D. Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: Implications for cytoskeletal integrity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 272 (2): 423-430. 2013.
- [12] COLEMAN, M.; SAHAI, E.; YEO, M.; BOSCH, M.; DEWAR, A.; OLSON, M. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nat. Cell Biol.** 3 (4): 339-345. 2001.
- [13] DATTA, S.; GHOSHA, D.; RANI, D.; SAHAB, D.; BHATTACHARAYAC, S.; MAZUMDER, S. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. **Aquatic. Toxicol.** 92 (2): 6-94. 2009.
- [14] DÍAZ-FLORES, M.; BAIZA, L.; IBÁÑEZ, M.; PASCOE, D.; GUZMÁN, A.; KUMATE, J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. **Gac. Méd. Méx.** 140: 437-448. 2004.
- [15] DONG, Z.; WANG, L.; XU, J.; LI, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; MIAO, Z. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. **Toxicol. Vitro.** 23 (1): 105-110. 2009.
- [16] DUBALE, M.; PUNITA, S. Histopathology of the kidney of the fish *Channa punctatus* exposed to cadmium. **J. Anim. Morphol. Physiol.** 291 (1): 166-171. 1981.
- [17] ELLIS, A. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa*. **J. Fish. Dis.** 3: 413-26. 1980.
- [18] EL-REFAIY, A.; EISSA, F. Histopathology and cytotoxicity as biomarkers in treated rats with cadmium and some therapeutic agents. **Saudi J. Biol. Sci.** 20: 265-280. 2013.
- [19] EZEMONYE, L.; TONGO, I. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. **Jordan J. Biol. Sci.** 2 (1): 29-36. 2009.
- [20] FACKLER, O.; GROSSE, R. Cell motility through plasma membrane blebbing. **J. Cell Biol.** 181 (6): 879-884. 2008.
- [21] GALICKA, A.; BRZOSKA, M.; SREDZINSKA, K.; GINDZIENSKI, A. Effect of cadmium on collagen content and solubility in rat bone. **Acta Biochim. Pol.** 51 (3): 825-829. 2004.
- [22] KAOUD, H.; EL-DAHSHAN, A. Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. **Natur. Sci.** 8 (4): 147-156. 2010.
- [23] KONDERA, E.; WITESKA, M. Cadmium and copper reduce hematopoietic potential in common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney. **Fish. Physiol. Biochem.** 37: 755-784. 2013.
- [24] LAG, M.; RODIONOV, D.; OVREVIK, J.; BAKKE, O.; SCHWARZE, P.; REFSNES, M. Cadmium-induce inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. **Toxicol. Lett.** 193 (3): 252-60. 2010.
- [25] LIZARDO-DAUDT, H.; KENNEDY, C. Effects of cadmium chloride on the development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* early life stages. **J. Fish. Biol.** 73: 702-718. 2008.
- [26] MARTÍNEZ, G. Metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr.** 41 (1 & 2): 83-96. 2002.
- [27] MOHARRAM, O.; WABBI, O.; EL-GREISY, Z. Effect of polluted water from the Egyptian Eastern Mediterranean coast on reproductive, toxicological and hematological characteristics of *Siganus rivulatus*. **Pak. J. Biol. Sc.** 14 (12): 668-681. 2011.
- [28] NELSON, W.; NUSSE, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. **Sci.** 303: 1483-1487. 2004.
- [29] PALUCH, E.; VAN DER GUCHT, J.; SYKES, C. Cracking up: symmetry breaking in cellular systems. **J. Cell Biol.** 175: 687-692. 2006.
- [30] PROZIALECK, W.; LAMAR, P. Interaction of cadmium (Cd<sup>2+</sup>) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin. **Biochim. Biophys. Acta.** 1451: 93-100. 1999.
- [31] SALAZAR, R. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. **Rev. Electrónica Vet.** 10 (11): 1-15. 2009.
- [32] SALAZAR-LUGO, R.; VARGAS, A.; ROJAS, L.; LEMUS, M. Histopathological changes in the head kidney induced by cadmium in a neotropical fish *Colossoma macropomum*. **Open Vet. J.** 3 (2): 145-150. 2013.
- [33] SCHUWERACK, P.; LEWIS, J.; HOOLEA, D. Cadmium-induced cellular and immunological responses in *Cyprinus carpio* infected with the blood parasite, *Sanguinicola inermis*. **J. Helminthol.** 77: 341-350. 2003.
- [34] SEGNINI DE B., M.; MEDINA, J.; MARCANO, S.; BOADA-SUCRE, A.; FINOL, H. Efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-s-triazina, sobre algunos tejidos de *Colossoma macropomum*. Cuvier 1818 (Pisces: Characidae). **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente.** 44 (1): 51-57. 2005.
- [35] STENTIFORD, G.; LONGSHAW, M.; LYONS, B.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Mar. Environ. Res.** 55: 137-159. 2003.
- [36] STOHS, S.; BAGCHI, D.; HASSOUN, E.; BAGCHI, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 20 (2):77-88. 2000.

[37] SUDHA, S.; SHRIVASTAVA, N. Histopathological changes in the liver of the fish *Nandus nandus* exposed to endosulfan and carbaryl. **J. Ecotoxicol. Environ. Monit.** 8 (2): 139-144. 1998.

[38] TEMPLETON, D.; LIU, Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. **Chemico-Biol. Interact.** 188: 267-275. 2010.

[39] TEMPLETON, D.; LIU, Y. Effects of cadmium on the actin cytoskeleton in renal mesangial cells. **Canad. J. Physiol. Pharmacol.** 91 (1): 1-7. 2013.

[40] THÉVENOD, F.; WOLFF, N.; BORK, U.; LEE, W.; ABOUHAMED, M. Cadmium induces nuclear translocation of beta-catenin and increases expression of c-myc and Abcb1a in kidney proximal tubule cells. **Biometals.** 20: 807-820. 2007.

[41] THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcalifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environ. Pollut.** 121: 307-320. 2003.

[42] VAN DYK, J.; PIETERSE, G.; VAN VUREN, J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 66: 432-440. 2007.