

EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA CELULAR EN POLIMORFONUCLEARES PROVENIENTES DEL PRONEFROS DE ALEVINES DE *COLOSSOMA MACROPOMUM* EXPUESTOS A UNA DOSIS SUBLETAL DE CADMIO

(EVALUATION OF CELLULAR INNATE IMMUNITY IN POLYMORPHONUCLEARS FROM THE PRONEPHROS OF *COLOSSOMA MACROPOMUM* FRY EXPOSED TO A SUBLETHAL DOSE OF CADMIUM)

YANET DEL VALLE ANTÓN-MARÍN¹

¹Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Postgrado de Biología Aplicada, Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad

E-mail: yanetanton2019@gmail.com

RESUMEN

En los peces, el estrés causado por químicos en el medio ambiente puede afectar el sistema inmune. Se evaluó el efecto de 0,10 mg.L⁻¹ de Cd sobre la viabilidad, la actividad fagocítica, índice fagocítico, la adherencia, la quimiotaxis y el estallido respiratorio de polimorfonucleares (PMN) procedentes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum* a diferentes lapsos, con lo cual se pretendió determinar cómo varían dichos parámetros ante la exposición al tóxico. Los organismos fueron divididos en 5 grupos experimentales, 4 grupos expuestos, representando cada uno, un tiempo de exposición (3, 21, 31 y 45 días), y un control. Según el tiempo de exposición, se sacrificaron los peces mediante decapitación, para así obtener el pronefros, y de él, los PMN. La actividad fagocítica (AF), el índice fagocitario (IF), la adherencia y el estallido respiratorio se evaluaron mediante la técnica histoquímica del nitroazul de tetrazolio, mientras que la quimiotaxis, se evaluó por medio de la prueba de siembra en agarosa al 0,50%. Se usó un análisis de Kruskal-Wallis para comparar entre los grupos de peces, tanto control como expuestos, y determinar si existían diferencias entre los parámetros evaluados. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados; la AF, el IF y la adherencia mostraron los valores más bajos a los 45 días de exposición, mientras que el estallido respiratorio y la quimiotaxis a los 31 y 21 días, respectivamente. Los resultados indican que el efecto del Cd, a esta dosis, sobre las respuestas evaluadas, es nocivo para los PMN, así mismo, su inmunotóxicidad se evidenció por la disminución de la quimiotaxis y de las respuestas fagocíticas, causando el deterioro de la eficacia de la resistencia inmune, aumentando a su vez la susceptibilidad a las infecciones, evidenciando el efecto inmunotóxico del Cd.

Palabras clave: cadmio, pronefros, fagocitosis, *Colossoma*, inmunidad innata, estallido respiratorio.

ABSTRACT

The effect of 0.10 mg.L⁻¹ of Cd on viability, phagocytic activity, phagocytic index, adherence, chemotaxis and the respiratory burst of polymorphonuclear (PMN) from the pronephros of

Colossoma macropomum fry to different lapses are evaluated. With which it was intended to determine how such parameters vary before exposure to toxic. The fishes were divided into 5 experimental groups, 4 groups exposed, each representing an exposure time (3, 21, 31 and 45 days), and one control. According to the exposure time, the fish were sacrificed by decapitation, to get the pronephros, and from it, the PMN. Fagocytic activity (AF), the phagocytic index (IF), adhesion and respiratory burst were evaluated by the histochemical technique of nitroblue tetrazolium, while chemotaxis was evaluated by means of the test in agarose at 0.50 %. A Kruskal-Wallis analysis was used to compare between groups of fish, both control and exposed, and determine if there were differences between the parameters evaluated. Significant differences were observed in all evaluated parameters; The AF, the IF and the adherence showed the lowest values at 45 days of exposure, while the respiratory burst and chemotaxis at 31 and 21 days, respectively. The results indicate that the effect of the Cd, at this dose, on the responses evaluated, is harmful to the PMN, as well, its immunotoxicability was evidenced by the reduction of chemotaxis and phagocytic responses, causing the deterioration of the effectiveness of immune resistance, in turn increasing susceptibility to infections, evidencing the immunotoxic effect of the Cd.

Key words: cadmium, pronephros, phagocytosis, *Colossoma*, innate immunity, respiratory burst.

INTRODUCCIÓN

En los peces, como en todos los animales poiquilotermos, la inmunidad innata es particularmente importante (FERNÁNDEZ *ET AL.* 2002; SIWICKI *ET AL.* 2010; PALUDAN *ET AL.* 2021). En ellos, el pronephros es el principal órgano implicado en la respuesta inmune, el mismo es el encargado de producir las células que van a modular y ejecutar una respuesta inmune satisfactoria, tanto de la respuesta adaptativa como de la innata. La respuesta inmune innata comprende una serie de mecanismos de defensa (fagocitosis, quimiotaxis y muerte bacteriana, entre otros) que en estos organismos constituyen su línea de defensa primaria y primordial (RAUTA 2012; GEVEN & KLAREN 2017), siendo la fagocitosis un proceso esencial en la defensa de estos organismos, (TORT *ET AL.* 2005; ESTEBAN *ET AL.* 2013) radican allí su importancia como principal mecanismo de protección de los peces.

Debido a las características del sistema inmune, es posible predecir, dependiendo de la vía de exposición al tóxico, la sensibilidad de los mecanismos inmunológicos expresados por un organismo ante un contaminante en particular, ya que

este sistema incluye respuestas celulares y bioquímicas que pueden ser medidas en el laboratorio; como ejemplo de estas respuestas ante xenobióticos se pueden mencionar el recuento diferencial de leucocitos y el monitoreo de la actividad fagocítica de los glóbulos blancos (KREUTZ *ET AL.* 2011).

Uno de los parámetros usados, es la evaluación de la fagocitosis, ésta señala que los leucocitos tienen un alto potencial de participación en la respuesta inmune o de fagocitar un antígeno determinado (ABREU *ET AL.* 2009). Estudios realizados en peces capturados en cuerpos de agua contaminados comparados con peces de la misma especie que habitaban aguas libres de contaminantes, han evidenciado un comportamiento de los macrófagos diferente (ROMANO 1999). La fagocitosis es un mecanismo primordial en la inmunidad innata. El proceso fagocítico es un procedimiento complejo que incluye varias etapas secuenciales y que comprenden varios pasos: la quimiotaxis, la adhesión, la endocitosis y los cambios físicos y bioquímicos intracelulares que capacitan a los fagocitos para endocitar, matar y digerir a los microorganismos (ROJAS-ESPINOSA Y ARCE-PAREDES 2004).

Estudios realizados en peces, muestran que la fagocitosis es sensible a los tóxicos, al respecto ZELIKOFF *ET AL.* (2002) observaron una reducción significativa de la fagocitosis y de la producción de oxi-radicales en ejemplares de *Micropterus dolomieu* colectados en una zona contaminada por policlorados bifenilos en comparación con organismos muestreados en sitios de referencia. Por otro lado, los ftalatos o ésteres de ácido ftálico, han demostrado impactar de forma negativa sobre las células fagocíticas de *Cyprinus carpio* (WATANUKI *ET AL.* 2003). De igual modo, la quimiotaxis, otro parámetro del proceso de fagocitosis, al parecer aumenta durante la exposición a metales. ROBOHOM (1986), en *Morone saxatilis*, halló que la migración de macrófagos peritoneales aumenta durante la exposición al cadmio (Cd). De igual forma RYMUSZKA & SIEROS³AWSKA (2013), hallaron, en leucocitos de *Cyprinus carpio*, tanto de pronefros como de sangre periférica expuestos a una cianotoxina, que la actividad fagocítica era inhibida, mientras que las especies reactivas de oxígeno aumentaban con relación a los controles.

El Cd es un importante xenobiótico, tóxico, no degradable que puede incorporarse en los peces a través de dos rutas principales: por ingestión e introducción en órganos como hígado, riñón y tracto gastrointestinal. Este metal causa una diversidad de efectos tóxicos en peces teleósteos, tales como fracturas y deformidad de los huesos, lesiones en la piel, disminución del consumo de oxígeno por los tejidos branquiales, alteraciones patológicas en el tejido renal, trastornos hematológicos y metabólicos, además de supresión del sistema inmune, entre otros. Su toxicidad se incrementa debido a la propiedad de bioacumularse ocasionando el efecto de biomagnificación en los niveles tróficos siguientes (KAMUNDE & MACPHAIL 2011; MOHARRAN *ET AL.* 2011; KONDERA & WITESKA 2013); al respecto se han demostrado los efectos tóxicos de este metal en el órgano hematopoyético del pez *Colossoma macropomum*, tanto en la estructura, morfología y funcionabilidad del órgano,

como en las propias células que lo conforman, advirtiéndose, sobre todo a nivel ultraestructural, el daño producido por el metal a concentraciones subletales (ANTÓN-MARÍN *ET AL.* 2015).

El estrés causado por agentes fisicoquímicos en el medio ambiente puede afectar el sistema inmune en los peces, dependiendo del tipo de tóxico, dosis, tiempo de exposición, y condiciones fisicoquímicas del agua, entre otros factores (TORT *ET AL.* 2005). En estos organismos un factor estresante puede provocar alteraciones en los parámetros hemáticos, metabólicos, inmunitarios, equilibrio endocrino, disfunción en la síntesis de diversas enzimas y deficiencias reproductivas (MILLA *ET AL.* 2011; RUDNEVA *ET AL.* 2012). Esta serie de alteraciones disminuyen la resistencia inmune de los peces aumentando la susceptibilidad a las infecciones (RADHAKRISHNAN 2010).

En este trabajo se evaluó el efecto de una dosis subletal ($0,10 \text{ mg.L}^{-1}$) de Cd sobre algunos parámetros inmunológicos: viabilidad, fagocitosis (actividad fagocítica, índice fagocítico), así como sobre la adherencia, la quimiotaxis y el estallido respiratorio de células polimorfonucleares (PMN) procedentes del pronefros de alevines de *C. macropomum* a diferentes lapsos, esto, como una medida del funcionamiento del sistema inmune innato celular, con lo cual se pretendió determinar cómo varían dichos parámetros ante la exposición al tóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alevines de *C. macropomum*, donados por la empresa Piscicultura ALMA, C.A (ALMACA) con las siguientes medidas iniciales: longitudes de $3,02 \pm 1,20 \text{ cm}$ y masa $3,10 \pm 1,38 \text{ g}$, fueron trasladados desde la piscicultura antes señalada, en bolsas plásticas selladas conteniendo agua y oxígeno, hasta el Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente (núcleo de Sucre). Una vez en el laboratorio, fueron co-

locados inmediatamente en acuarios de vidrio (medidas: 60,00 x 30,00 x 40,00 cm y con capacidad útil de 60,00 L de agua) que contenían agua previamente aireada y sin cloro. Al cabo de 30 min. los peces fueron sacados uno por uno de las bolsas plásticas con una malla para peces, e introducidos directamente en el agua de los acuarios para así iniciar el periodo de aclimatación, por 15 días, los organismos fueron alimentados *ad libitum* todas las mañanas, antes del recambio de agua, con alimento comercial en hojuelas para peces tropicales (marca Kantal), así mismo se les realizó recambio del 80,00% del agua diariamente, manteniéndolos con continua aireación, los acuarios fueron cubiertos con bolsas plásticas negras para disminuir la cantidad de luz artificial y minimizar el estrés. Los parámetros físico-químicos se mantuvieron constantes durante todo el ensayo (pH: $7,00 \pm 0,30$; temperatura: $24,00 \pm 1,00$ °C; O_2 : $3,90 \pm 0,10$ mg.L⁻¹; dureza total: 106,00 mg.L⁻¹), siendo estos monitoreados diariamente. Al final de este periodo, se procedió al montaje del bioensayo y a la posterior obtención de las muestras. Tomando como base la concentración letal media (LC₅₀) de Cd determinado para esta especie (BLANCO 2004) la cual fue de 38,47 mg.L⁻¹, se empleó una dosis subletal de Cd de 0,10 mg.L tomada a partir de una concentración madre de 1000,00 mg.L⁻¹.

Luego de culminado el periodo de aclimatación, se procedió a realizar el bioensayo, para esto se colocaron, 48 horas antes del inicio de este, 150 peces de tamaños similares (longitud total: $4,48 \pm 1,80$ cm; masa: $4,10 \pm 0,20$ g) en cada uno de los acuarios exactamente iguales a los usados en el periodo de aclimatación, preparados para tal fin. Los organismos, a razón de 10 individuos por acuario, fueron divididos en 5 grupos experimentales: un grupo control y 4 grupos expuestos y, cada uno con 2 réplicas, lo que equivalió a tres acuarios por cada grupo (15 acuarios en total). A cada grupo de ejemplares expuestos se les colocó el tóxico (0,10 mg.L⁻¹ de Cd) en el agua de los acuarios. Cada uno de estos grupos experimentales representaba un tiempo de ex-

posición los cuales fueron: 3, 21, 31 y 45 días, más el grupo control (sin exposición al tóxico), durante todo el bioensayo se mantuvieron las mismas condiciones físicas y químicas del agua para todos los acuarios, siendo utilizado un sistema de ensayo semi estático con recambio diario del 80,00% del agua, manteniendo la concentración del metal en el agua constante, de acuerdo con la concentración de interés (USEPA 1996). Luego de la culminación del periodo de exposición al metal, de acuerdo con cada lapso, se procedió a tomar las muestras a los 3, 21, 31 y 45 días, para la determinación de los parámetros a estudiar.

Para la obtención de las muestras (células PMN), los peces fueron colocados en una cubeta con agua fría (5,00 °C) hasta que se adormecieron, para de esta forma pesarlos, medirles la longitud estándar y proceder a extraer el pronefros. Cada uno de los peces (con medidas biométricas promedio: $5,20 \pm 1,30$ cm y masa: $6,01 \pm 1,10$ g) según su condición (expuestos y controles), fueron rápidamente decapitados mediante un corte en la zona posterior a la región opercular, luego se procedió a realizar una incisión desde la región dorsal hasta la zona del pedúnculo caudal para abrir al animal y exponer la cavidad abdominal para extirpar el pronefros, el cual se extrajo y fue colocado en solución de Hank (HBSS) y mantenido en frío (4,00 °C) hasta su procesamiento (no mayor a 2 horas) (EGGLETON ET AL. 1989; HART ET AL. 1998).

Los PMN del pronefros se obtuvieron por modificación de la técnica de HART ET AL. (1998) y EGGLETON ET AL. (1989). Luego de removidos, pesados y lavados con solución salina fisiológica estéril y HBSS, los pronefros fueron pasados a través de una malla de nylon de abertura 100 μ m, sobre una placa de Petri estéril mantenida en hielo, para homogeneizar luego en 1,00 mL de HBSS, suplementado con 1,00% de L-glutamina 4,00 mM (1,00%), penicilina (1000000,00 UI.L⁻¹), estreptomycin 0,10 mg/mL y heparina 0,10%. La suspensión celular se centrifugó a 5000 rpm

por 10 min., el precipitado se resuspendió en 0,75 mL de HBSS suplementado y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, el precipitado se colocó nuevamente en 0,75 mL de HBSS y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, el sedimento se resuspendió en 2000,00 μ L de HBSS con suero fetal y se conservó en tubos Eppendorf a 4,00 °C hasta la realización de las pruebas inmunológicas.

Viabilidad celular de los leucocitos polimorfonucleares del pronefros

La viabilidad celular se realizó mediante la técnica de exclusión del azul de tripano al 0,40% (FAIRHURST *ET AL.* 2007). Este método se basa en que las células viables no captan ciertos colorantes, no permiten el paso del colorante a su interior, mientras que las células no viables, si lo permiten, lo cual es una característica que ayuda a diferenciar unas células de otras. Aquí los PMN se colorearon con una solución de azul de tripano (Sigma-Aldrich, INC. St. Louis, USA) al 0,40% en HBSS. La solución preparada se conservó en frasco ámbar y bajo refrigeración por un período no mayor a 15 días. En el procedimiento, se mezclaron partes iguales de azul de tripano (0,40%) y de la suspensión de PMN preparada; se agitó en un vortex durante 20 segundos, procediendo a realizar el conteo de las células en una cámara de Neubauer, contando en los cuatro cuadrantes secundarios periféricos en un microscopio marca Olympus, modelo CX41RF.

Se obtuvo el porcentaje de viabilidad mediante la cuantificación de 100 células; de esas 100 células se determinaron cuántas estaban vivas. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de células vivas. Luego de este ensayo se ajustó la suspensión de PMN a $10,00 \times 10^6$ cels.mL⁻¹ en HBSS, para luego poder utilizarla en posteriores determinaciones.

Evaluación de la actividad fagocítica

Para la evaluación de la actividad fagocítica (AF)

de los PMN del pronefros se llevó a cabo la técnica histoquímica de nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés) de ROJAS-ESPINOSA Y ARCE-PAREDES (2004) modificada para células del pronefros. Esta tiene la ventaja que a la vez que mide la actividad fagocítica mide la adherencia y el estallido respiratorio. En la prueba del NBT, los neutrófilos se incuban con el colorante oxidado, se estimulan con partículas ingeribles y se examinan al microscopio para buscar la presencia o ausencia de formazan azul dentro de las células.

Reducción del nitroazul de tetrazolio (Prueba histoquímica)

Por cada organismo se prepararon 2 portaobjetos (de vidrio) lavados y desengrasados. Se marcaron 3 círculos equidistantes, de aproximadamente 1,00 cm de diámetro, con lápiz graso en cada portaobjetos. Se depositó una gota de suspensión de células (PMN) en el centro de cada círculo dibujado en el portaobjetos. Se colocó cada portaobjetos dentro de una cámara húmeda (paso crítico). Se incubaron a 37,00°C por 30 min. Se recuperaron los portaobjetos y se lavaron con PBS pH 7,20, se secó el líquido alrededor de los círculos con papel absorbente, evitando que las preparaciones celulares se secaran. Se adicionó, al primer círculo, aproximadamente 30,00-50,00 μ L de solución de NBT (Sigma, St Louis, USA) al 0,10%; al segundo círculo 30,00-50,00 μ L de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) opsonizadas suspendidas en NBT al 0,10% en NaCl 0,15 M y al tercer círculo, 30,00-50,00 μ L de levaduras no opsonizadas suspendidas en NBT al 0,10%. Se incubaron las preparaciones a 37,00°C durante 30 min., se recuperaron los portaobjetos y luego fueron lavados con PBS. Se secó el exceso de líquido alrededor de los círculos y se cubrieron las preparaciones con safranina al 0,50% en agua. Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Al cumplirse el tiempo de incubación los portaobjetos fueron lavados con agua para eliminar el exceso de colorante, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron

secar al aire y se montaron para ser observados al microscopio con 100X, visualizándose los fenómenos de ingestión y reducción del NBT.

Para la determinación del índice fagocitario o de fagocitosis (IF), y la actividad fagocítica (AF), se cuantificó el grado de endocitosis en las preparaciones: se contó un mínimo de 100 células y se estableció el porcentaje de células fagocitantes (aquellas que tenían por lo menos una levadura en su interior), de estas células se estableció el porcentaje de las células que habían ingerido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 ó más de 10 levaduras, además, se estableció el porcentaje de las células que habían reducido el colorante (la reducción en una sola vacuola fue suficiente para calificar la reducción como positiva= NBT positivo).

La AF se obtuvo mediante la fórmula siguiente:

$$AF = \frac{N^{\circ} \text{ células fagocitantes}}{N^{\circ} \text{ total de fagocitos contados}} \times 100$$

De igual manera se obtuvo el IF, para lo cual se utilizó la fórmula:

$$IF = \frac{N^{\circ} \text{ células de levaduras ingeridas}}{N^{\circ} \text{ total de células con levaduras ingeridas}}$$

Al mismo tiempo esta prueba permitió evaluar el estallido respiratorio de los PMN basado en la producción intracelular del anión superóxido (O_2^-) mediante la reducción del NBT.

Activación de la adherencia de las células a superficies

La capacidad de adherencia de las células a las superficies se contó en las mismas láminas utilizadas para la determinación de la fagocitosis. Observándose a 40X los neutrófilos activados. Se contaron 100 células y se obtuvo el porcentaje de células adherentes.

Determinación indirecta del estallido respiratorio

El estallido respiratorio basado en la producción de anión superóxido (O_2^-) fue determinado por la misma técnica anterior. Cuando la solución de NBT es incubada con las células a evaluar, este es reducido por el anión superóxido a formazan, una sustancia de color azul-negro que se deposita como partículas insolubles dentro de las células, este ensayo es una prueba indirecta la cual es claramente visible al microscopio (YILDIRIM *ET AL.* 2003).

Quimiotaxis

Se empleó la prueba de quimiotaxis descrita por VARGAS (2008), modificada para células del páncreas. Para evaluar la quimiotaxis se siguió el siguiente protocolo: en láminas portaobjetos se añadieron 2,00 mL de agarosa al 0,50% y se dejaron reposar por 5 min. hasta solidificar; se hicieron tres orificios en la agarosa con la punta de una pipeta calibrada a 0,30 cm de diámetro, colocándose en cada uno de los orificios las muestras de la siguiente forma: a.- En el orificio central se colocaron 20,00 μ L de la suspensión de células fagocíticas coloreadas con safranina al 0,50%. b.- En el orificio derecho se colocaron 20,00 μ L de levaduras opsonizadas. c.- En el orificio izquierdo se colocaron 20,00 μ L del antibiótico estreptomicina (sustancia control no quimiotáctica). Una vez colocadas las muestras en las láminas portaobjetos, se llevaron a cámara húmeda por 12 horas, al término del cual se midió el recorrido de los fagocitos desde el pozo central hasta el borde de ataque de las células. Los resultados fueron expresados en cm recorridos por los fagocitos.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de Kruskal-Wallis para realizar una comparación de los parámetros entre los grupos de peces (control y expuestos), y determinar si existían diferencias significativas

entre los parámetros evaluados. La toma de decisiones se realizó a un nivel de significancia del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Statgraphic versión 5.1 en ambiente Windows (SOKAL Y ROHLF 2009).

RESULTADOS

Se observaron diferencias significativas en las respuestas de quimiotaxis y de adherencia de los leucocitos PMN provenientes de los diferentes grupos evaluados (K-W= 27,53; $P<0,05$; K-W= 46,41; $P<0,05$ respectivamente), los valores promedio máximos lo presentaron los grupos controles ($3,20 \pm 0,50$ cm para la quimiotaxis y $31,08 \pm 1,29\%$ para la adherencia); mientras que los valores mínimos de quimiotaxis se obtuvieron en el grupo expuesto durante 21D ($2,10 \pm 0,14$ cm) y para la adherencia ($15,41 \pm 0,93\%$) para el grupo de 45D (**Fig.1, Fig. 2**).

El análisis estadístico determinó que hubo diferencias significativas en la actividad fagocítica de los PMN de los diferentes grupos de peces expuestos a Cd (K-W=40,15; $P<0,05$); los mayores valores se observaron en el grupo control ($73,07 \pm 4,51\%$) y el menor valor promedio se observó en el grupo expuesto durante 45D ($21,30 \pm 3,40\%$) (**Fig. 3**); igualmente, se evidenciaron diferencias significativas para el índice fagocitario (K-W= 32,75; $P<0,05$) (**Fig. 4**), los mayores valores se observaron para el grupo control ($2,83 \pm 0,29$) y el menor valor para el grupo expuesto durante 45D ($1,85 \pm 0,22$). Para el estallido respiratorio (**Fig. 5**) se observaron diferencias significativas entre los grupos (K-W= 31,50; $P<0,05$), el valor más alto se observó para el grupo control ($95,00 \pm 2,40\%$) mientras que el menor se registró para el grupo de 31D ($61,00 \pm 1,80\%$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el efecto del Cd sobre las respuestas celulares evaluadas relacionadas con la capacidad inmunológica de las células del pronefros responde al tiempo de

exposición al metal más que por la dosis empleada.

La disminución en la respuesta quimiotáctica de las células del pronefros (**Fig. 1**) sugiere que el Cd afecta la funcionalidad de estas células actuando sobre el citoesqueleto. Se ha reportado que metales como el Cd afectan la respuesta fagocítica de PMN sanguíneos en peces expuestos a este metal (RADHAKRISHNAN 2010). Sin embargo, en esta investigación se demuestra que el Cd afecta a los PMN mucho antes de que sean liberados a la sangre periférica, es decir, son perjudicados directamente en el órgano productor de los mismos (pronefros), y que, adicionalmente el efecto inmunosupresor del metal va a depender del tiempo de exposición al mismo, todo esto quizás relacionado con la capacidad que tiene este órgano de bioconcentrar el Cd, previamente. MARCANO (2011), también en *C. macropomum*, halló que los niveles de Cd en pronefros aumentaron significativamente, así mismo determinó que el metal tiende a acumularse en mayor concentración en el riñón en proporción con el tiempo de exposición.). Por su parte, KONDERA ET AL. (2014), hallaron en *Cyprinus carpio* que el Cd tiene muy alta afinidad por el pronefros.

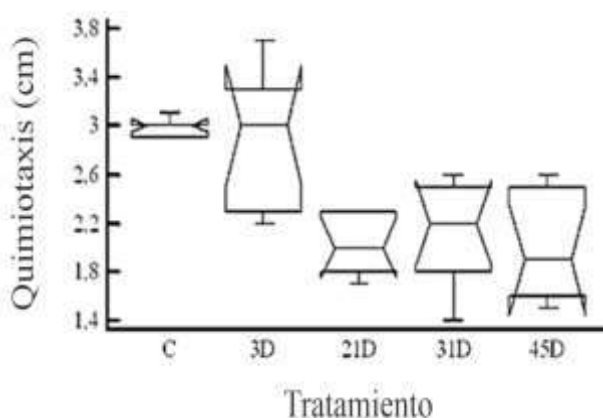


Fig. 1. Quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum* expuesto durante diferentes lapsos a 0,1 mg/L de Cd. C= control, 3D= 3 días, 21D= 21 días, 31D= 31 días y 45D= 45 días.

Todo lo anterior permite señalar que el pronefros es un órgano diana del Cd, por lo tanto, es lógico pensar que sus efectos nocivos se vean reflejados tanto en la citoarquitectura del órgano, como en la de las células que en él se producen (ANTÓN-MARÍN *ET AL.* 2015), así como en la función de las células PMN originadas en este órgano, tal como se observa en esta investigación, de igual manera, una disminución de la quimiotaxis también fue observada por VARGAS (2008) en granulocitos provenientes del riñón de *C. macropomum* expuesto a Cd y cobre, separadamente, mostrando el efecto que tienen estos dos metales pesados y en especial el Cd sobre la capacidad inmunológica de las células estudiadas.

Estudios realizados por XU *ET AL.* (2009), mostraron los efectos del Cd en las células del ápice radicular de *Allium sativum*, demostrando que el Cd afectó los mecanismos de control de la organización de los microtúbulos del citoesqueleto, así como a los procesos de ensamblaje/desensamblaje de la tubulina, concluyendo que los microtúbulos del citoesqueleto son sitios diana de la toxicidad de Cd en células de la punta de ápice radicular. Este mecanismo propuesto por XU *ET AL.* (2009) pudiese explicar los resultados encontrados en este estudio, ya que tanto la quimiotaxis, la adherencia (Fig. 2), el IF (Fig. 3), así como la AF (Fig. 4), están alteradas, debido a que estos parámetros son mecanismos que dependen de la exacta conformación del citoesqueleto, la cual a su vez depende, en gran medida, de iones Ca^{++} , cuyo metabolismo se ve afectado por el Cd (TVERMOES *ET AL.* 2011). En base a lo antes expuesto se debe señalar que, probablemente, el Cd, a través de su acción sobre el Ca^{++} , actúe sobre las células del pronefros afectando los parámetros examinados.

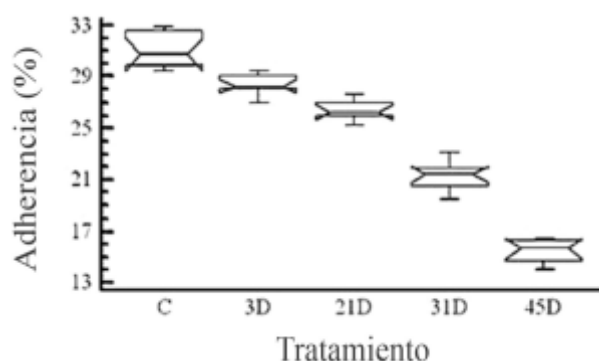


Fig. 2. Adherencia de leucocitos polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *C. macropomum* expuesto durante diferentes lapsos a 0,1 mg/L de Cd. C= control, 3D= 3 días, 21D= 21 días, 31D= 31 días y 45D= 45 días.

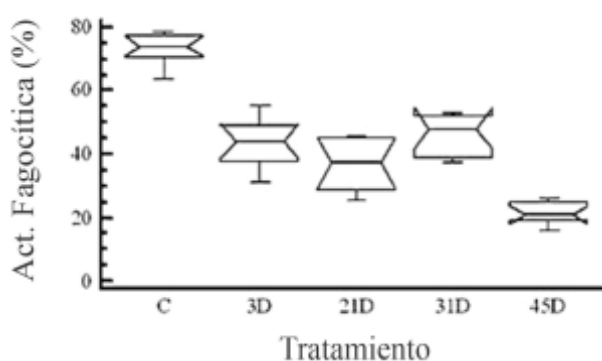


Fig. 3. Actividad fagocítica de leucocitos polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum* expuesto durante diferentes lapsos a 0, 1 mg/L de Cd. C= control, 3D= 3 días, 21D= 21 días, 31D= 31 días y 45D= 45 días.

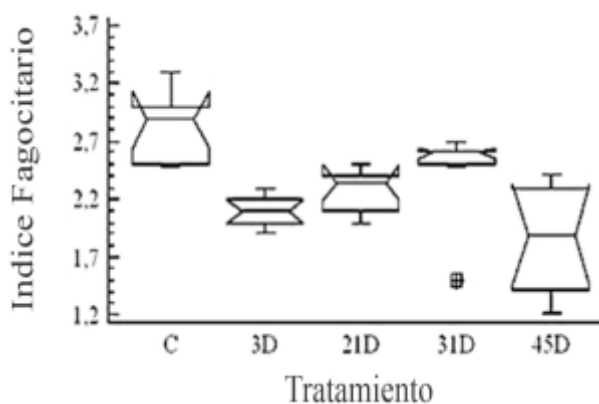


Fig. 4. Índice fagocitario de leucocitos polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum* expuesto durante diferentes lapsos a 0, 1 mg/L de Cd. C= control, 3D= 3 días, 21D= 21 días, 31D= 31 días y 45D= 45 días

Así mismo, la disminución de la respuesta fagocítica en la modalidad evaluada [(estallido respiratorio (**Fig. 5**))], pudiera también sugerir una respuesta tóxica no específica ante el Cd relacionada con sus propiedades fisicoquímicas, entre estas la afinidad que tiene el Cd por los grupos -SH, -OH, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil, los cuales son parte fundamental de las biomoléculas y por su acción competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales, tales como el zinc, el hierro y el Ca^{++} , provocando así la inhibición de las enzimas y proteínas que participan en esta respuesta (LIU *ET AL.* 2011).

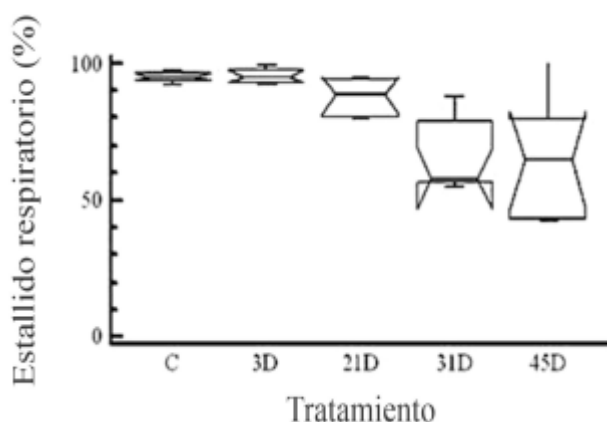


Fig. 5. Estallido respiratorio de leucocitos polimorfonucleares provenientes del pronefros de alevines de *Colossoma macropomum* expuesto durante diferentes lapsos a 0, 1 mg/L de Cd. C= control, 3D= 3 días, 21D= 21 días, 31D= 31 días y 45D= 45 días

El descenso en el porcentaje de adherencia de las células del pronefros está en concordancia con la alteración de los otros parámetros evaluados (IF, AF y quimiotaxis) ya que la misma, además de tener una estrecha relación con ellos, también ejerce influencia en estos. Posiblemente, la disminución de este parámetro se encuentre vinculada con la estructura de ciertas proteínas claves en el proceso de adhesión celular tales como las integrinas (MOUSA 2004) y las caderinas (VAN ROY & BERX 2008). Las integrinas son proteínas transmembranas, que poseen un dominio amino terminal que se une estrechamente al colágeno y a otras células y pueden actuar como moléculas de adhesión célula-célula. El dominio amino-ter-

minal es el sitio de unión de los ligandos para que puedan unirse a las integrinas. En ambos casos, los dominios de las integrinas incluyen sitios de unión de tres cationes divalentes. Uno de ellos está permanentemente ocupado a concentraciones fisiológicas de los cationes divalentes, y une Ca^{++} o Mg^{++} , los principales cationes divalentes de la sangre (HYNES 2002).

Estudios realizados por DONG *ET AL.* (2009), muestran que el Cd causa disfunción endotelial con relación a la función de las integrinas, este hallazgo es importante ya que relaciona el efecto del Cd sobre la estructura y función de una proteína crucial en el proceso de adherencia y por tanto en el proceso de fagocitosis, lo que está en concordancia con resultados encontrados por MARCANO (2011) sobre la disminución de Ca^{++} y Mg^{++} en peces expuestos a Cd, ya que el Ca^{++} y el Mg^{++} son metales fundamentales para el buen funcionamiento de las integrinas. Es posible entonces concluir que este es otro de los posibles mecanismos por el cual el Cd afecta la fagocitosis.

Estos resultados corroboran los hallazgos de VARGAS (2008) quien demostró el efecto del Cd sobre las células del pronefros de juveniles de *C. macropomum* evidenciado en la disminución de la quimiotaxis de los PMN del pronefros, mientras que SALAZAR-LUGO *ET AL.* (2006) y SALAZAR-LUGO *ET AL.* (2009) determinaron el efecto del cobre y del Cd respectivamente, sobre la respuesta de este organismo estableciendo la sensibilidad del pez ante un tóxico metálico.

En resumen, todos estos resultados se vinculan, *in vivo*, con una disminución de la capacidad de los fagocitos para difundir a la zona del daño, formar pseudópodos y por consiguiente fagocitar las partículas extrañas, lo cual a su vez trae como consecuencia implícita e inequívoca que se vea seriamente afectada la respuesta inmune innata de los alevines de *C. macropomum*, como bien puede notarse en los resultados hallados en esta investigación.

CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos demuestran la acción nociva del Cd para con las células fagocíticas del pronefros de alevines de *C. macropomum* a una dosis subletal de 0,10 mg.L⁻¹. El efecto inmunotóxico del Cd se evidenció por la supresión observada en los procesos de quimiotaxis, respuesta fagocítica y en la efectividad para inducir acción microbicida, mecanismos de protección de primera línea en los procesos de inmunidad innata lo que conlleva a la disminución de la eficacia de los mecanismos microbicidas intracelulares y de la resistencia inmune, aumentando a su vez la susceptibilidad de los peces a las infecciones.

La alteración de las respuestas inmunológicas evaluadas en los PMN del pronefros de alevines de *C. macropomum* evidencian, no solo el efecto del Cd sobre el sistema inmune del organismo, sino que también la alteración del estado de salud de éste.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU J., MARZOCCHI-MACHADO C., URBACZEK A., FONSECA L. & URBINATI, E. 2009. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Biol.* 69(4): 1133-1139.
- Agencia De Protección Ambiental de los Estados Unidos. 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. *OPPTS*. 850.1075. EPA 712-C96-118.
- ANTÓN-MARÍN Y., ROJAS L Y SALAZAR-LUGO R. 2015. Cambios ultraestructurales inducidos por el cadmio en pronefros de alevines de *Colossoma macropomum*. *Revista Vet. FCV- LUZ*. XXV (4): 338-345.
- BLANCO I. 2004. Parámetros hematológicos e inmunológicos de la cachama *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) expuesta a cloruro de cadmio. [Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela], pp. 40.
- DONG Z., WANG L., XU J., LI Y., ZHANG Y., ZHANG Z. & 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.
- Eggelton P., Garzan R. & Fisher, D. 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polimer. *Immunol. Meth.* 121: 105-113.
- ESTEBAN M., CUESTA A., CHAVES-POZO E. & MESEGUER J. 2013. Influence of melatonin on the immune system of fish: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 7979-7999.
- FAIRHURST A., WALLACE P., JAWAD A. & GOULDING N. 2007. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species. *Arthr. Res. Therapy*. 9(2): <http://arthritis-research.com/content/9/2/R29>.
- FERNÁNDEZ, A., RUIZ, I. Y DE BLAS, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *AquaTIC*. 17. URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=154>.
- GEVEN E. & KLAREN P. 2017. The teleost head kidney: integrating thyroid and immune signalling. *Develop. Compar. Immunol.* 66: 73-83.
- HART L., SMITH S., SMITH B.,

- ROBERSTON J., BESTEMAN E. & HOLLADAY S. 1998. Subacute immunotoxic effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) on spleen and pronephros leukocytic cell counts and phagocytic cell activity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicol.* 41(1-2): 17-29,
- HYNES R. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110(6): 673–687.
- KAMUNDE C. & MACPHAIL, R. 2011. Subcellular interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 105(3-4): 518-27.
- KONDERA E., ŁUGOWSKA K. & SARNOWSKI P. 2014. High affinity of cadmium and cd kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 40: 9–22 DOI 10.1007/s10695-013-9819-1.
- KONDERA E. & WITESKA M. 2013. Cadmium and copper reduce hematopoietic potential in common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney. *Fish Physiol. Biochem.* 37: 755-784.
- KREUTZ L. C., GIL BARCELLOS L. J., DE FARIA VALLÉ S., DE OLIVEIRA SILVA T., ANZILIERO D., DAVI DOS SANTOS E. & 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.
- LIU T., HE W., YAN C., QI Y. & ZHANG Y. 2011. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol. Ind. Health.* 27(3): 249-56.
- MARCANO A. 2011. Parámetros bioquímicos y análisis estructural del riñón cefálico del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. [Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela], pp. 30.
- MILLA S., DEPIEREUX S. & KESTEMONT P. 2011. The effects of estrogenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicol.* 20: 305-319.
- MOHARRAN S., WAHBI O. & EL-GREISY Z. 2011. Effect of polluted water from Egyptian Eastern Mediterranean Coast on reproductive, toxicological, and hematological characteristics of *Siganus rivulatus*. *Pakist. J. Biol. Scien.* 14(12): 668-681.
- MOUSA S. 2004. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life Sc.* 75(1): 93-105.
- PALUDAN S., PRADEU T., MASTERS S. & MOGENSEN T. 2021. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Natur. Rev. Immunol.* 21: 137-150.
- RADHAKRISHNAN M. 2010. Immunological effect of cadmium in *Heteroneustes fossilis*. (Bloch, 1794). *Global Veter.* 4(6): 544-547.
- RAUTA P., NAYAK B. & DAS S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148(1): 23-33.
- ROBOHOM 1986. Paradoxical effects of cadmium exposure on antibacterial antibody responses in two fish species: inhibition in cunners (*Tautogolabrus adspersus*) and enhancement in striped bass (*Morone*

- saxatilis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12: 251-262.
- ROJAS-ESPINOSA O. Y ARCE-PAREDES P. 2004. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte. *Bioquímica.* 29(2): 55-67.
- ROMANO L. 1999. Bioindicadores de contaminación acuática en peces. *Revista AquaTIC.* 7. Disponible en <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp>.
- RUDNEVA I., SKURATOVSKAYA E., DOROHOVA I. & KOVYRSHINA T. 2012. Use of fish blood biomarkers for evaluating of marine environment health. *Worl. J. Sci. Technol.* 2(7): 19-25.
- RYMUSZKA A. & SIEROS³AWSKA A. 2013. Cytotoxic and immunotoxic effects of the mixture containing cyanotoxins on carp cells following in vitro exposure. *Centr. Eur. J. Immunol.* 38(2): 159-163.
- SALAZAR-LUGO R., GARCÍA N., VILLALOBOS DE B. L. & LEMUS, M. 2006. Immunological response of freshwater fish *Colossoma macropomum* as a biomarker of copper exposure. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 77(66): 925- 930.
- SALAZAR-LUGO R., LEÓN A. Y LEMUS M. 2009. Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. *Rev. Científ, FCV-LUZ.* XIX (1): 6-8.
- SIWICKI A., TERECH E., GRUDNIEWSKA J., MALACZEWSKA J., KAZUN K. & LEPA A. 2010. Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 29(3): 489-91.
- SOKAL R. & ROHLF F. 2009. Introduction to Biostatistics. 2th edition. Ed. Blume. Madrid, pp. 366.
- TORT L., BALASCH J. & MACKENSIE S. 2005. Fish health challenge after stress. Indicators of immune competence. *Contributions Sci.* (2-4): 443- 454.
- TVERMOES B., BIRD G. & FREEDMAN J. 2011. Cadmium induces transcription independently of intracellular calcium mobilization. *PLoS ONE* | www.plosone.org 1 (6): 6: e20542.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C96-118.
- VAN ROY F. & BERX G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cel. Mol. Life. Sci.* 65(23): 3756-3788.
- VARGAS A. 2008. Respuesta inmunológica celular inespecífica de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) expuesta a los metales cobre y cadmio. [Trabajo de Grado. Postgrado de Biología Aplicada. Universidad de Oriente, núcleo de Sucre. Cumaná], pp.53.
- WATANUKI H., GUSHIKEN Y. & SAKAI M. 2003. In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells by Di-n-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate. *Aquatic. Toxicol.* 63: 119-126.
- XU P. LIU, D. & JIANG W. 2009. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biol. Plantarum.* 53(2): 387-390.
- YILDIRIM M., LIMA C., WANB P. & KLESIS P. 2003.

Growth performance and immune response
of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets
containing graded levels of gossypol–acetic
acid. *Aquacul.* 219: 751-768.

ZELIKOFF J., CARLSON E., LI Y., RAYMOND A., DUFFY
J., BEAMAN J. & ANDERSON M. 2002.
Immunotoxicity biomarkers in fish:
development, validation and application for
field studies and risk assessment. *Human
Ecol. Risk Assessment.* 8(2): 253-263.