

Efectos subletales del cadmio sobre los estadios meióticos de las gónadas testiculares de la tilapia

Angel González*, Belkis Borges¹, Isabel Rengel-Zambrano² y Julia Molina¹

¹Laboratorio de Citogenética. ²Laboratorio de Contaminación de Aguas
Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia
Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 22-04-96 Aceptado: 30-04-96

Resumen

Las gónadas testiculares de la tilapia roja (*Oreochromis* sp, Pisces: Cichlidae) se trataron con concentraciones de 10, 30, 50 y 100 µg/l de cloruro de cadmio durante un período máximo de 182 días. Con el incremento de las concentraciones y tiempo de exposición al cadmio, se observó una disminución significativa en el número de células correspondiente a los diferentes estadios meióticos. En la concentración de 100 µg/l no se observaron divisiones celulares.

Palabras clave: Cadmio; gónada; meiosis; tilapia.

Sublethal effects of cadmium on stay testicular meiosis of gonada of tilapia

Abstract

Testicular gonads the red tilapia (*Oreochromis* sp, Pisces: Cichlidae) were exposed to concentrations of 10, 30, 50, 100 µg/l of cadmium chloride along maximum term of 182 days. Moreover along to increase the concentrations and exposure time to cadmium there are significant decrease on number of cells corresponding to different meiotic phases were observed. In concentration of 100 µg/l no divisions cells were observed.

Key words: Cadmium; gonad; meiosis; tilapia.

Introducción

El cadmio es un metal pesado utilizado en la industria como componente de fertilizantes, baterías de Cd-Ni, estabilizantes para pinturas, plásticos y plaguicidas, y está catalogado como uno de los elementos más tóxicos para el ambiente.

El hombre puede contaminarse con cadmio a partir del consumo de organismos acuáticos (peces, crustáceos y moluscos) y también por su inhalación directa o por su presencia en la atmósfera, siendo absorbido

por los pulmones (1), motivo por el cual constituye un riesgo para la salud de los mineros y trabajadores industriales. Hoy en día, este metal es considerado como un serio contaminante ambiental que se está tornando sumamente peligroso para todas las formas de vida. Actualmente el cadmio es considerado como un contaminante de los ecosistemas acuáticos, siendo ésta situación sumamente preocupante (2, 3).

Los efectos de la presencia del tóxico en los ecosistemas acuáticos van desde una desaparición completa de la biota, cuando es

* Autor para la correspondencia.

vertido en forma continua y en grandes concentraciones, hasta efectos subletales, que se predicen cuando el cadmio presenta letalidad por sus concentraciones bajas o de seguridad, los cuales se manifiestan como alteraciones de las tasas de reproducción, crecimiento y de otros efectos tanto fisiológicos como bioquímicos.

Por lo tanto, estos efectos dependerán de la concentración del tóxico, de la duración de la exposición y de la forma química en la que se presenta (4).

De todos los metales tóxicos encontrados en el ambiente y usados en la industria, el cadmio ocupa un lugar especial debido a su gran capacidad de acumulación en los tejidos blandos (gónadas e hígado) (5).

Así por ejemplo, en peces expuestos al cadmio las alteraciones más frecuentes son: hemorragia, necrosis testicular, lesiones branquiales, disfunción renal, huesos deformados, daños al hígado, crecimiento retardado, disminución en el número de glóbulos rojos y blancos, alteraciones en los niveles de hemoglobina sanguínea, alteraciones a nivel de los electrolitos plasmáticos, daños histológicos en músculo y cerebro (6-21).

Se han reportado estudios detallados (22-24) que describen efectos carcinogénicos agudos y crónicos del cadmio como también sobre la morfología y funcionamiento testicular de ratas, tales efectos son: hemorragia severa, edema, destrucción de túbulos seminíferos, desarrollo eventual de tumores, daño y necrosis testicular (24,25).

El mecanismo exacto de la toxicidad producida por el cadmio no está claro. Se ha reportado que el cadmio induce a la producción de metalotioninas, que son proteínas donde el metal es enlazado. La presencia de esta proteína sugiere una resistencia o tolerancia del testículo a ser afectado por el cadmio (24).

Se ha demostrado en línea celular de hámster que el índice mitótico disminuye con respecto al tiempo de exposición con cadmio,

al igual que la frecuencia de células metafásicas con daños cromosómicos. Sus resultados también muestran que el daño no estuvo distribuido uniformemente entre todas las células, ya que algunas células metafásicas normales pudieron encontrarse en cada observación (26). Existen datos que confirman que el cadmio no es clastogénico en sí (tiene potencial mutagénico) sino que tiene un efecto co-clastogénico (aumento del potencial clastogénico en presencia de otros químicos). Este efecto se ha pensado se debe a que el cadmio inhibe los procesos de reparación pre-replicacionales del ADN (27).

Hasta el momento no se han reportado estudios sobre el efecto producido por el cadmio en la meiosis de peces y del hombre, por lo cual resulta de importancia analizar mediante técnicas como meiosis convencional, el efecto que el cadmio produce en la meiosis testicular de un pez, efecto éste que sin duda se transmitirá a la descendencia, afectando factores tan importantes como las tasas de reproducción.

El principal objetivo de esta investigación es determinar el efecto del cadmio sobre los diferentes estadios meióticos en las gónadas testiculares de la tilapia roja (*Oreochromis* sp).

Materiales y Métodos

Los peces utilizados fueron tomados de una granja piscícola experimental, ubicada en la vía la Concepción (Estado Zulia). Son peces pertenecientes a la Familia Cichlidae, Género *Oreochromis*, conocido comúnmente como tilapia roja. Los mismos son peces híbridos de agua dulce, de cinco meses de edad, con longitud promedio de 17,77 cm y con un peso fresco promedio de 90,13 gr.

Los ejemplares fueron aclimatados durante un mes en agua de clorinizada y luego expuestos a las siguientes concentraciones de Cloruro de cadmio: 10 µg/l, 30 µg/l, 50 µg/l y 100 µg/l, durante un período máximo de 182 días. De igual manera, se controló el

aspecto físico-químico del agua (parámetro diario de oxígeno disuelto, temperatura, parámetro de pH cada tres días y parámetro intermensual dureza y alcalinidad) (28).

Se tomó el material testicular de los peces del bioensayo a los 30, 70, 106, y 182 días de exposición al Cloruro de cadmio. Se diseccionaron tres peces por cada uno de los períodos y concentración de exposición.

Las gónadas testiculares se extrajeron mediante una disección en la zona ventral. Las mismas se colocaron directamente en una solución hipotónica de Citrato de sodio al 1% (29).

Una vez transcurridos treinta minutos en solución hipotónica a 7 °C se transfirió el fragmento testicular a una cápsula de Petri que contenía solución hipotónica y se separaba los túbulos de la albúginea con la ayuda de una aguja de disección. Una vez separados, se cortaron finamente con tijeras hasta obtener un macerado homogéneo con el fin de que quedaran libres las células en su interior.

La suspensión se transfirió a un tubo de centrifuga y se pipeteó de forma que se liberaran el resto de células que hubieran podido quedar en el interior de los túbulos. Se dejó en estufa por espacio de una hora.

Posteriormente se procedía a centrifugar durante diez minutos a 800 r.p.m., se decantaba el sobrenadante, se resuspendían las células añadiendo 6 ml de fijador recién elaborado (metanol-ácido acético, 3:1) y luego se dejaba en la nevera a 4°C durante treinta minutos en un tubo de ensayo con tapa.

Al cabo de este tiempo, si se observaba en el fondo del tubo restos de túbulos, se transfería el sobrenadante a un tubo limpio y seco. Luego se volvía a centrifugar a la misma velocidad durante cinco minutos, se decantaba el sobrenadante y se resuspendía el pellet celular añadiendo 4 ml de fijador (recién elaborado). Se repetía esta operación hasta que la suspensión quedaba limpia.

Para obtener unas buenas extensiones los portaobjetos fueron colocados en metanol a 20°C durante veinte minutos.

Transcurrido este tiempo se eliminaba el exceso de metanol y se dejaba caer una gota de la suspensión celular sobre los portaobjetos aún húmedos. El goteo se efectuaba a una distancia aproximada de 30 cm. Las preparaciones se dejaron secar al aire. De esta forma se obtuvieron diez preparaciones por ejemplo que se tiñeron directamente o bien al cabo de cuatro días.

Las extensiones obtenidas se cubrieron con solución de Giemsa al 5% en tampón Sorensen pH 6,8, por espacio de cinco minutos. Posteriormente se lavaron las preparaciones con agua destilada y se dejaron secar al aire.

Para el análisis estadístico se utilizó el test de Tukey, incluido en el programa SAS para computadoras, (30).

Resultados y Discusión

En esta investigación se pudo observar que a medida que aumentan las concentraciones y el tiempo de exposición de las células al cadmio hay una disminución significativa en el número de células correspondientes a los diferentes estadios meióticos (Tabla 1)

El análisis de las medias en esta experiencia reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de 10, 30 y 50 $\mu\text{g/l}$ CdCl_2 a lo largo del periodo completo de exposición (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6) en la especie de Tilapia roja.

En nuestro caso, la concentración más alta de Cloruro de cadmio utilizada fue de 100 $\mu\text{g/l}$ y en ella no se observaron divisiones celulares .

En nuestro trabajo determinamos que el efecto del cadmio y el tiempo de exposición sobre el número total de células en los diferentes estadios meióticos son altamente significativos ($p < 0,05$) según el análisis de varianza.

Tabla 1
Número total de células contadas en individuos pertenecientes a los grupos control y expuestos a los diferentes tratamientos durante un período máximo de 182 días

Días	Nº Ind	0 µg/l	10 µg/l	30 µg/l	50 µg/l	100 µg/l
35	1	24	22	0	0	0
	2	23	20	0	0	0
	3	24	21	0	0	0
70	1	23	25	8	13	0
	2	22	11	21	7	0
	3	20	17	15	10	0
106	1	24	32	11	5	0
	2	23	16	13	1	0
	3	21	14	12	3	0
182	1	23	0	2	4	0
	2	21	0	8	5	0
	3	22	0	18	4	0

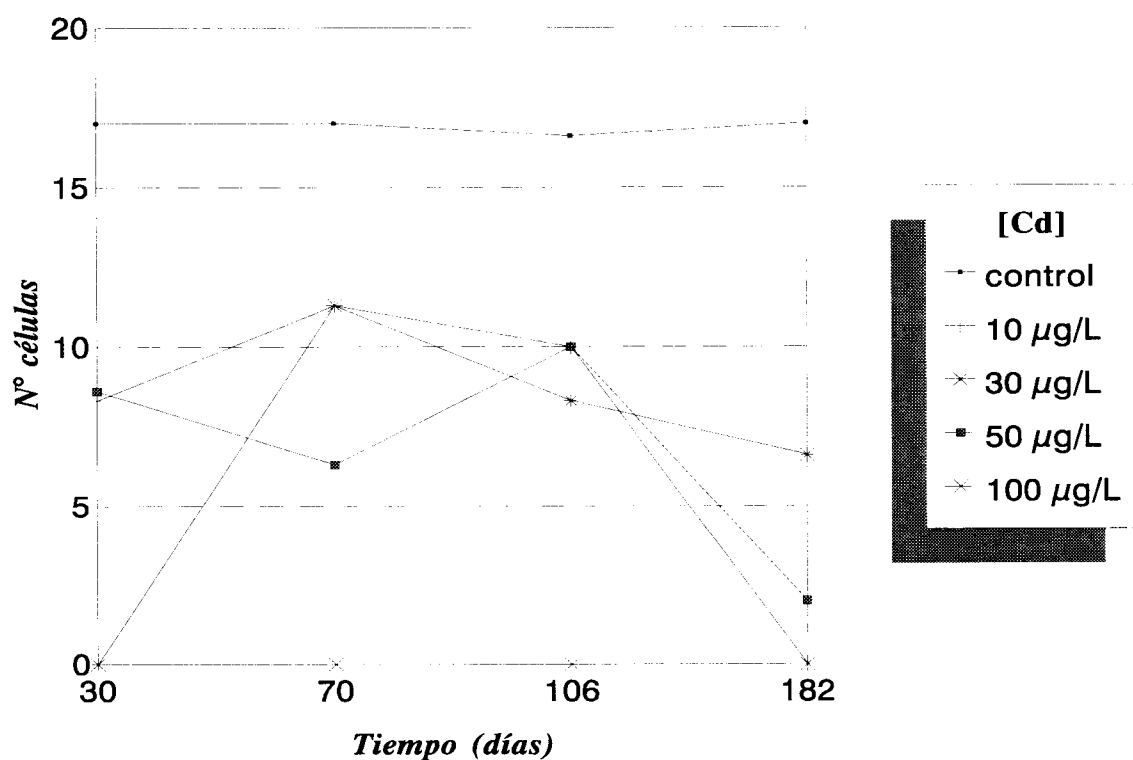


Figura 1. Número de células en interfase expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

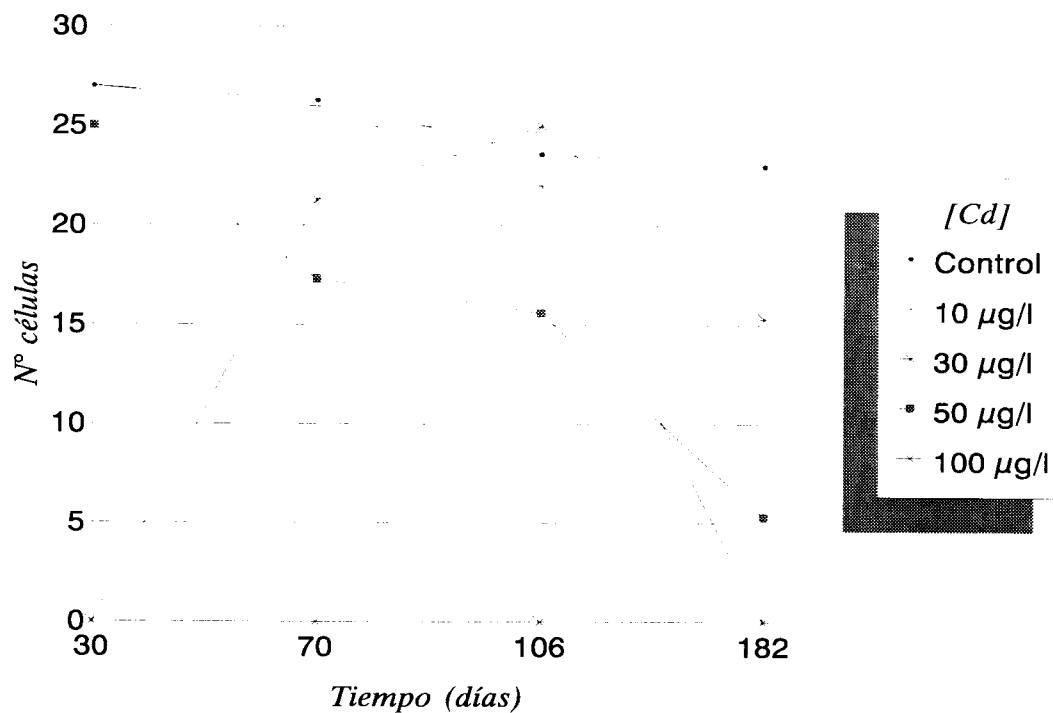


Figura 2. Número de células en leptoteno expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

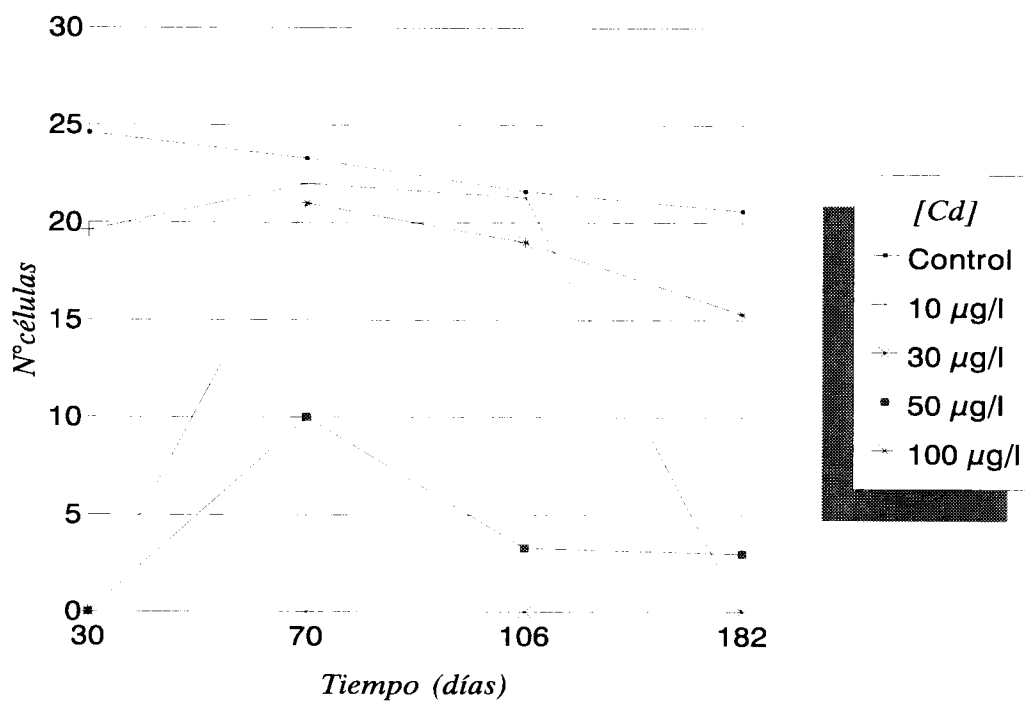


Figura 3. Número de células en cigoteno expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

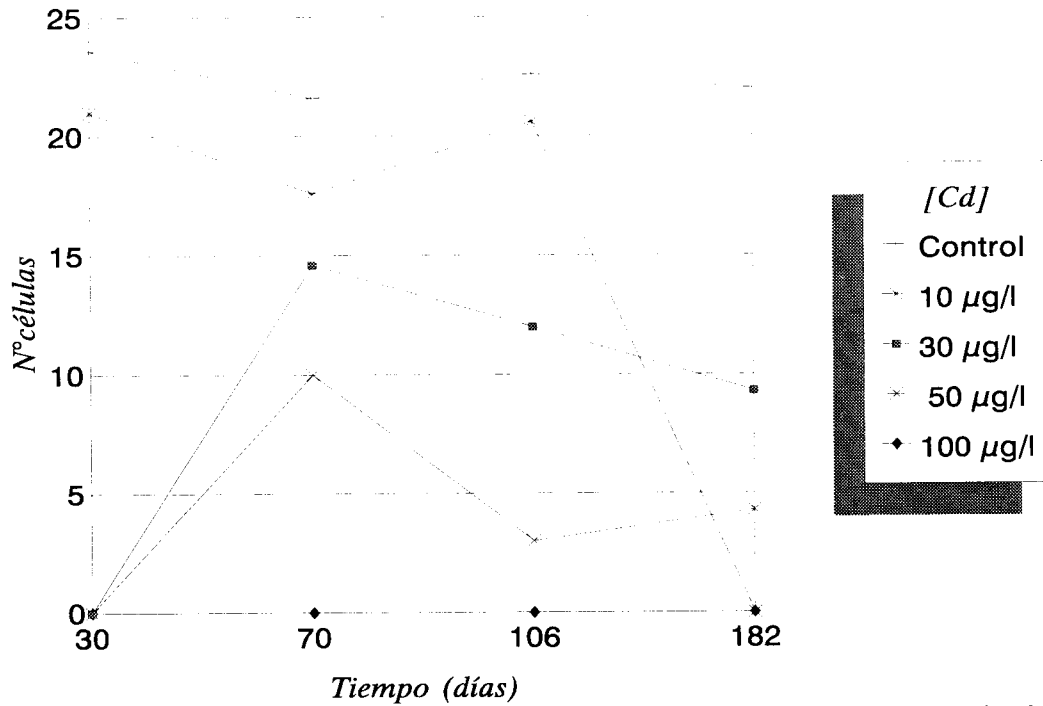


Figura 4. Número de células en paquiteno expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

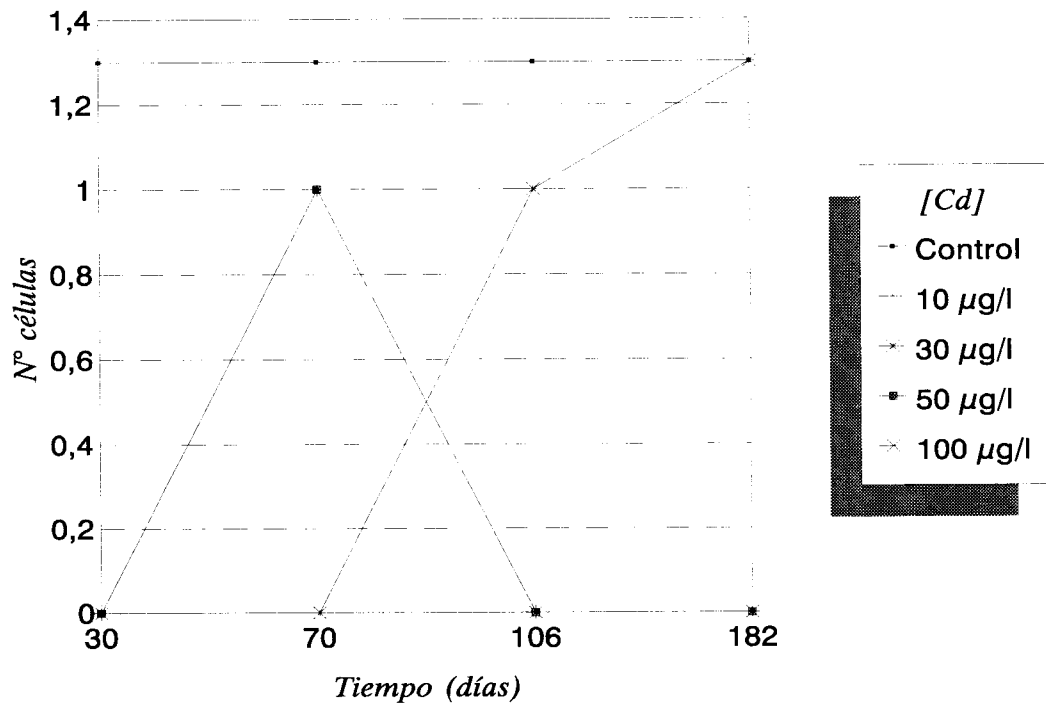


Figura 5. Número de células en metafase I expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

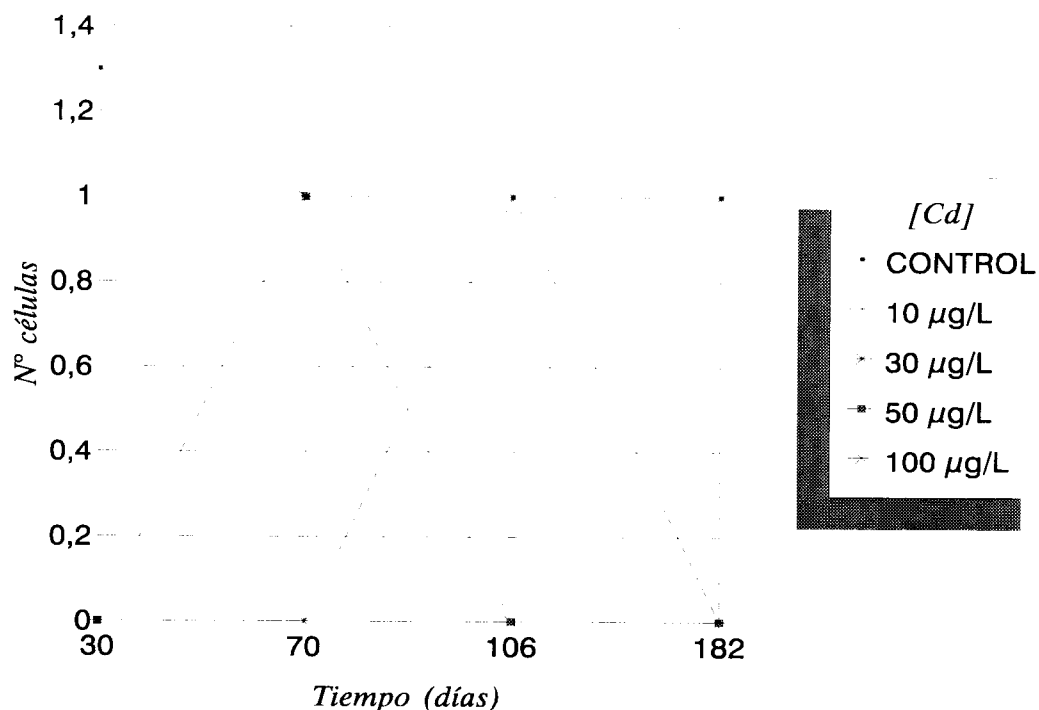


Figura 6. Número de células en metafase II expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio y grupos controles durante un período máximo de 182 días.

Los resultados obtenidos nos sugieren que el cadmio es capaz de producir esterilidad. Parizek *et al* (22) demostraron que a dosis moderadas de Cloruro de cadmio, la función espermática se recuperó luego del primer mes de exposición, mientras que con dosis elevadas la esterilidad resultante fue irreversible.

En espermatoцитos de ratones expuestos al Cloruro de cadmio durante 22 horas, se reveló que el cadmio induce un retardo meiótico en los espermatoцитos primarios y secundarios (31).

En tilapia no se han reportado trabajos sobre el efecto del cadmio en material testicular.

Otros estudios han sido llevados a cabo en línea celular de hámster y en tejido linfoide de ratón, en donde el índice mitótico disminuye en relación directa al tiempo de exposición con cadmio, al igual que la frecuencia de células metafásicas con daños cromosómicos (26, 32).

Sus resultados también mostraron que el daño no estuvo uniformemente distribuido entre todas las células, ya que algunas células metafásicas normales pudieron observarse. En nuestro trabajo las metafases analizadas presentaban un aspecto normal, mientras que a medida que aumenta las concentraciones, el número de células en meiosis disminuye, lo que puede conducir a la esterilidad, causando daños severos en la reproducción, lo cual desde el punto de vista comercial podría originar pérdidas económicas a nivel del cultivo intensivo de esta especie.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, porque a través de la subvención del proyecto 0165-93, fue posible la utilización de reactivos y materiales para la realización de esta investigación y así mismo al Laboratorio de Citogenética, perteneciente al Departamento de Biología.

A Magaly Chávez, por su colaboración y estímulo.

Referencias Bibliográficas

1. GARTY M., BRACKEN W., KLASSEN C. *Toxicol* 42:111-119, 1996.
2. LARSSON L. *Bd Br Wat Toxicol L Stusvik* 5:5-17, 1975.
3. TOTSCH W. *Environ Manag* 14:333-338, 1990.
4. HODSON P. *Aquat Toxicol* 11:3-18, 1988.
5. MARK M., CHERIAM M. *Toxicol* 62:1-25, 1990.
6. EISLER R. *Fish Res Bd Can* 28:1225-1234, 1971.
7. WONG K., KLAASSEN C. *Toxicol Appl Pharmacol* 55:456-466, 1980.
8. CALAMARI D., MARCHETTI R., VAILATI G. *Water Res* 14: 1421-1426, 1980.
9. SINGHAL R., VIJAYVARGUJA R., SHUKLA G. *Endocr Toxicol* 1:149-179, 1985.
10. OLSSON P., HAUX C. *Aquat Toxicol* 9:231-242, 1986.
11. WICKLUND A., RUNN P. *Aquat Toxicol* 13:109-122, 1988.
12. FU H., LOCK R. *Aquat toxicol* 42:107-117, 1990.
13. NOREY C., KAY J. *Comp Biochem Physiol* 95:217-221, 1990.
14. PRATAP H., WENDELAAR S. *Comp Biochem Physiol* 95:313-317, 1990.
15. HOSSTRAND C., LITHNER G., HAUX C. *Pharmacol Toxicol* 68:492-501, 1991.
16. TORT L., MADSEN L. *Comp Biochem Physiol* 99:353-356, 1991.
17. REID S., MCDONALD D. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1061-1068, 1991.
18. GHAZALY K. *Water Air Soil Pollut* 64:551-559, 1992.
19. GILL T., EPPLE E. *Aquat Toxicol* 23:107-117, 1992.
20. CHAVEZ M. Respuestas hematológicas y de iones plasmáticos inducidas por el cadmio en *Oreochromis* (Tilapia roja) (Trabajo Especial de grado). La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp. 71, 1995.
21. RENGEL I. *Ciencias* 3:175-192, 1995.
22. PARIZEK J., ZAHOR Z. *Nat* 5:342-347, 1977.
23. PARIZEK J.J. *Endocrinol* 15:56, 1976.
24. SHIRAIISHI N., UNO H., WAALKES M. *Toxicol* 85:85-100, 1993.
25. WAALKES M., OBERDOSTER G. CRC *Press Boca Raton*, pp. 129-158, 1990.
26. DEAVEN L., CAMPBELL E. *Cytogenet Cell Genet* 26:251-260, 1980.
27. YAMADA H., MIYAHARA T., SASAKI YUF. *Mutation Res* 302:137-145, 1993.
28. APHA-AWWA-WPCF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 14 edition, pp 1193, 1992.
29. EVANS E., BRECKON G., FORD C. *Cytogenetic* 3:284-494, 1964.
30. TSOKOS M. MC Graw-Hill. 1987. pag. 305-487.
31. MILLER B.M., ADLER I.D. *Mutagenesis* 4:208-215, 1992.
32. SBRANA I., DISIBIO A., LOMIA., SCARCELLI V. *Mutation Res* 287:57-70, 1993.