

Respuestas histológicas y genéticas inducidas por el cadmio en la tilapia roja (pisces: Cichlidae, *Oreochromis sp*)

*Isabel Rengel-Zambrano**, *Rodolfo Salas-Auvert*, *Magaly Chávez*, *Angel González*,
Belkis Borges y Eleuteria Bonalde

*Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,
Maracaibo, Venezuela, Apartado Postal 526.*

Recibido: 02-07-96 Aceptado: 20-10-97

Resumen

El cadmio proveniente de las actividades antropogénicas, ha sido involucrado en forma directa con el desarrollo de alteraciones fisiológicas, por lo cual se determinaron los cambios provocados en tilapias (Pisces: Cichlidae, *Oreochromis sp*) expuestas a concentraciones agudas subletales de cadmio (5 y 10 µg/L). Se evidenció una mayor bioacumulación de cadmio en las gónadas que en el cerebro de los peces; resultados de estudios de las secciones transversales de cerebro exhibieron una marcada neovascularización. En las secciones correspondientes a gónadas ováricas pudo observarse material amorfo indiferenciado de coloración rosada, células pequeñas de aspecto linfocitoide en estroma laxo y en las secciones a las gónadas testiculares se observaron estructuras en rosetas de apariencia ductal, con células de gran tamaño, hipercrómicas, con vacuolas intracitoplasmáticas; dos tipos de anomalías fueron observadas en los complejos sinaptonémicos (Css) de machos progenitores, desinapsis y asociaciones terminales entre un mismo Css y entre diferentes Css. Unido a estas anomalías se reporta la presencia de aberraciones numéricas del tipo de las poliploidías. Los mecanismos mediante los cuales el cadmio es capaz de originar esta aberración son desconocidos.

Palabras clave: Cadmio; cerebro; complejo sinaptonémico; gónadas; peces.

Cadmium induced, histological and genetic damage in red tilapia (pisces: Cichlidae, *Oreochromis sp*)

Abstract

Cadmium from antropogenic activities has been directly involved in the development of physiological alterations in fish. Tissue changes were determined in tilapias (Pisces: Cichlidae, *Oreochromis sp*) exposed to sublethal and acute concentrations of cadmium (5 and 10 µg/L). Bioaccumulation of cadmium was evidenced to be higher in gonad tissue than brain, of treated fish; analysis of histological changes obtained from studied transversal sections of brain tissue sections was accompanied by neovascularization. Gonadal tissue cellular arrangement was undifferentiated, accompanied by the presence of a rose colored amorphous undifferentiated material. Additionally, small cells with a lymphocitoid infiltrate were also observed, in a loosely arranged stroma. Analysis of transverse testis tissue section revealed the presence of a rosette

* Autor para la correspondencia.

of ductal nature, including giant cells, hyperchromic cells with intracytoplasmic vacuoles; regarding the nervous tissue; two types of abnormalities were observed when studying the synaptonemal complex (CSs) of male progenitor chromosomes; desynapsis and terminal union abnormalities were observed between identical and different CSs. Additionally, chromosomal numeric aberrations, polyploids were also observed. The mechanisms by which Cadmium provokes this type of tissue damaged is yet to be documented in the literature.

Key words: Brain; cadmium; fish; gonads; synaptonemal complex.

Introducción

El cadmio ha sido reconocido como un contaminante de alto riesgo (1-4). Este metal está involucrado en forma directa con el desarrollo de ciertas alteraciones fisiológicas y es capaz de producir una alteración tisular (5) severa, como la teratogénesis, mutagénesis y carcinogénesis. Los cambios fisiopatológicos podrá incluir; trastornos en la función renal, incluyendo necrosis, proteinuria, stress osmorregulatorio (6); trastornos en el metabolismo de calcio óseo, malformaciones óseas, displasia craneofacial, bifurcamiento del apéndice caudal, desviación de la columna vertebral, deformación de la cabeza, boca, cola muy evidentes en apariencia, distensión ventral, crecimiento retardado (7-12), aparición de la metalotionina plasmática, agrandamiento de las venas lobulares centrales, nucleación eritocitaria, reducción en el número de gránulos citoplasmáticos (13-20), degeneración espumosa de hepatocitos, proliferación de quistes, degeneración espumosa de algunos hepatocitos (21), núcleos de hepatocitos muy pronunciados (20), fibrosis perivascular hepática (20, 22), disminución de los depósitos de glucógeno (21, 22), hiperplasia hepática (21), picnosis nuclear (19), necrosis del tejido adiposo y muscular, pudiendo conducir a la formación de tumores y sincitio celular, indicativo de carcinogénesis (4, 12, 20, 23, 24), anormal rotación del tubo digestivo (12), anomalías oculares (microftalmia, exoftalmia), deformaciones cardíacas, ampollas dérmicas, edemas, hipopigmentación (22), entre otros.

En relación al efecto del cadmio sobre las gónadas y cerebro en peces, la literatura disponible es escasa. Existen algunos informes histopatológicos sobre el efecto producidos por metales pesados (20-22), sin embargo, debido a la importancia de los peces desde el punto de vista ecológico y alimentario, la bioconcentración del cadmio es un factor de importancia por las alteraciones provocadas a varios tejidos. En un estudio con peces expuestos a este metal, se determinó en muestras de cerebro, una concentración importante de 0,91 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. Este hallazgo es de particular interés pues la presencia del metal en las distintas regiones cerebrales, podría interferir competitivamente con la incorporación del cobre y zinc a través de la metaloenzima y otros componentes metabólicos; adicionalmente, se plantea el impacto del cadmio sobre la cuproenzima en neuronas no adrenérgicas, ampliamente distribuidas en los teleósteos (25). En gónadas de peces expuestos al cadmio los niveles detectados por lo general han sido más bajos que los reportados para cerebro (23). Las deformaciones a nivel de cabeza, boca y cola pueden ser originadas por cadmio, involucrándolo como elemento tóxicos en el proceso de reproducción de los peces (26).

Desde el punto de vista reproductivo, el cadmio es capaz de producir necrosis testicular (27), destrucción de los túbulos seminíferos (28), tumoraciones (29), disminución del índice mitótico (30) al igual que la frecuencia de células metafásicas por daños cromosómicos y aberraciones cromosómicas numéricas, como aneuploidía y poliploidía (27, 31).

Tabla 1
Características físico-químicas del agua utilizada para la exposición subletal de tilapia roja (*Oreochromis* sp)

Parámetro	Valor medio
Temperatura (°C)	27,91
pH	7,90
Oxígeno (mg/L)	6,47
Alcalinidad (mg/L de CaCO ₃)	99,73
Dureza (mg/L de CaCO ₃)	121,08

Con el propósito de investigar el efecto del cadmio sobre el proceso reproductivo de la tilapia roja, se utilizó la técnica del complejo sinaptonémico (CS) cromosómico. Este consiste en la observación de estructuras tripartitas formadas por los elementos laterales y el central, que interviene en el proceso de sinapsis de cromosomas homólogos. Esta observación permite establecer las anomalías en los procesos sinápticos producidas por el tóxico, ya que en el complejo sinaptonémico descansan los procesos de apareamiento cromosómico. Cualquier falla en su mecanismo puede influir en la fertilidad de los organismos con reproducción sexual.

La presente investigación tiene como objetivo establecer los cambios provocados por la exposición aguda a concentraciones subletales de cadmio, sobre peces expuestos a éste, en relación al nivel de bioacumulación en varios tejidos. Adicionalmente, se caracterizaron las alteraciones morfológicas externas, esqueléticas, histopatológicas (en tejido cerebral y gonadal), cuantificación de los cambios provocados al complejo sinaptonémico de muestras de gónadas testiculares. Así mismo, se estudió el efecto tóxico potencial del cadmio en forma aguda sobre las células germinales de peces expuestos. Se estudiaron las subpoblaciones de peces progenitores expuestos al metal.

Materiales y Métodos

Definición de la población

Los especímenes (n =32), tilapia roja (*Oreochromis* sp) presentaron una talla media de 17,77 cm y un peso medio de 90,13 gr. Se utilizó la mitad de la población de peces (n=16), como control. Fueron adquiridos localmente en una granja piscícola, la Concepción (Estado Zulia), Venezuela.

Aclimatación y mantenimiento

Los peces fueron mantenidos durante un mes en tanques con agua corriente de clorinada (Tabla 1), bajo un período de recambio de cinco días. Se mantuvo un régimen de fotoperíodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad, durante el período de aclimatación y estudio. Se alimentaron diariamente con alimento peletizado comercial "Trucharina" (Protinal). Los peces control fueron mantenidos bajo similares condiciones físicas y de alimentación, sin ser expuestos al metal.

Exposición

Los estudios de exposición al metal se realizaron en acuarios de vidrio cuadrados de aproximadamente 95 litros de capacidad. Se prepararon soluciones con cloruro de cadmio (Merck), en concentraciones de 5 y 10 µg/L para un volumen total de 95 litros, por acuario de exposición. Se utilizó agua corriente de clorada. Luego de preparada

cada solución y transcurrida una hora, se distribuyeron ocho especímenes por acuario discriminados según el sexo (32).

Se realizó el cambio de agua cada tres días, renovando la solución de cloruro de cadmio, lo cual permitió mantener la concentración nominal estipulada en un sistema de flujo semi-estático (32). Los especímenes fueron expuestos a la concentración de cadmio antes citada durante 9 días consecutivos.

Obtención de la muestra tisular

Los especímenes de estudio expuestos a 5 y 10 $\mu\text{g/L}$ de cadmio durante 9 y 5 días y controles, una vez sacrificados, fueron disectados inmediatamente, luego del abordaje a través de zona ventral. El material biológico incluye cerebro y gónadas.

Análisis fisicoquímico

El oxígeno disuelto (mg/L) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) fueron registrados diariamente durante la fase de aclimatación y exposición al metal, se empleó un oxigenómetro (YSI 5700). El pH fue determinado cada tres días (pHmetro HANNA mod. 8417). El nivel de alcalinidad y dureza del agua de los acuarios, fue determinada al inicio y final del bioensayo (33) (Tabla 1).

Reproducción

Se estudió el efecto del cadmio sobre el aparato reproductor de peces machos reproductores y los daños potenciales causados a la progenie obtenida de peces expuestos al metal.

Transcurrido el lapso de exposición al metal, se aparearon parejas de peces, por duplicado, por cada tratamiento, incluyendo; controles, control (M) con espécimen (H) expuesta a 5 $\mu\text{g/L}$ de Cd, espécimen (M) expuesto a 5 $\mu\text{g/L}$ con espécimen (H) control y espécimen (M) expuesto a 5 $\mu\text{g/L}$ con espécimen (H) expuesta a 5 $\mu\text{g/L}$. Es mismo esquema se aplicó para especímenes expuestos a 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cd. Se emplearon

tanques de cemento y incluyó un tubo de PVC de 20 cm x 12 cm diámetro para facilitar el apareamiento. Este se llevó a cabo por un lapso mínimo de 41 días o hasta obtener la progenie esperada.

Procesamiento de la muestra de gónada testicular

Las gónadas testiculares fueron colocadas en una solución hipotónica de citrato de sodio 1% (p/v) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se transfirieron a un vidrio de reloj con la misma solución y se separaron los túbulos de albúginea, se cortaron finamente con una tijera hasta obtener un macerado homogéneo. Esta suspensión se transfirió a un tubo de ensayo limpio y se pipeteó para la liberación de las células atrapadas en el interior de los túbulos. Se calentó en una estufa a 37°C por 30 minutos, seguido por centrifugación del sobrenadante (Dynac Centrifuge N 0101) a 800 r.p.m. durante 10 minutos. El centrifugado fue lavado en 5 mL de solución isotónica y nuevamente centrifugado durante 5 minutos a la misma velocidad. Finalmente el centrifugado y fue resuspendido en 1,0 mL de solución isotónica (34).

Complejo sinaptonémico

Se colocaron 1-3 gotas de sacarosa 0,2 M sobre la superficie de un papel encerado (parafilm), a continuación se agregaron cuidadosamente 1-2 gotas de suspensión celular. Luego de 5 minutos, se colocó una lámina portaobjetos en posición horizontal sobre la suspensión de sacarosa, inmediatamente se giró (en un ángulo de 90°) la lámina portaobjetos y se añadió fijador (formaldehído 9% v/v) abundantemente. La fijación se mantuvo por 12 horas. El pH (Hanna 8417) fue ajustado con una solución de NaOH 1 N hasta 9,6 - 10,30. Seguidamente, el exceso de fijador fue eliminado con agua destilada y se dejó secar al aire.

Para la tinción de los complejos sinaptonémicos (CSs) se utilizó una solución filtrada de AgNO_3 al 50% (p/v), complementa-

Tabla 2
Concentraciones de cadmio (mg/g de cenizas) en órganos internos de tilapias expuestas al cadmio y controles

Organo	C	Acumulación (mg/g)	
		5 µg/L	10 µg/L
Cerebro	ND	0,035	0,1818
Testículos	ND	0,045	0,001
Cerebro	ND	0,01	0,4859
Ovarios	ND	0,03	0,002

ND: no determinado. µg/L: microgramos por litro

da con 6 gotas de formalina 0,9% (v/v), por cada mL de solución de argéntica. Sobre la preparación de sacarosa se colocaron 2 a 3 gotas de solución de tinción y se cubrió con una lámina cubreobjetos. Se colocó en una estufa a 65°C (Fisher Isoterm Oven 200 Series) por 5 horas aproximadamente (35). Las preparaciones se examinaron bajo microscopio de campo claro y el material de interés se fotografió utilizando una película Kodak color o blanco y negro, 100 a 400 ASA.

Histología

Muestras de cerebro y gónadas de los especímenes expuestos y control fueron fijados en una solución de formalina 10% v/v, fueron procesados, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina, siguiendo una metodología convencional (36). Las preparaciones histológicas fueron analizadas y fotografiadas usando película Kodak color 135 de 400 ASA.

Análisis químico

Se determinó el nivel de cadmio acumulado en muestras de tejido de cerebro y gónadas de los especímenes de estudio y controles, mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS Perkin Elmer 3100). El material fue llevado a ceniza a 450°C (Thermolyne 1400 Furnace) y luego, procesados mediante digestión ácida con ácido

perclórico y ácido nítrico (2:1), hasta un volumen de 100 mL con ácido clorhídrico 1 N, Todos los reactivos fueron de grado analítico o HPLC (37).

Resultados y Discusión

Exposición y acumulación del cadmio

La concentración de cadmio utilizada en esta investigación no provocó la muerte de los peces destinados a las combinaciones de reproducción, así mismo, no se observaron signos aparentes de envenenamiento o deformaciones externas evidentes. Análisis de los resultados obtenidos sobre el nivel de metal bioacumulado evidenció una mayor acumulación en las muestras de gónadas que en cerebro, de las tilapias expuestas al cadmio (Tabla 2). El mecanismo de acumulación de elementos metálicos no bioesenciales, está relacionado con la afinidad del metal por los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína presentes en biomoléculas. Organos con mayor contenido de proteínas son más susceptibles a acumular grandes cantidades del metal, en este caso el cadmio, por lo cual el hígado ha sido señalado como el órgano más sensible a la acción del cadmio (4, 38). Sin embargo, en relación a la acumulación metálica en cerebro y gónada ha sido poco documentada en la literatura. En peces, el hígado presenta niveles de acu-

mulación significativamente más elevados que las gónadas y cerebros (4, 38, 39) (Tabla 2).

Reproducción

Se logró progenie en peces sometidos a dos de los esquemas ensayados; control + control y control (M) + espécimen (H) expuestas a 5 y 10 $\mu\text{g/L}$. El número de individuos nacidos ($n=21$ y $n=33$) de progenitores expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$, y 5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, fue menor que en los peces control ($n=80$). Se ha reportado que los metales son capaces de disminuir la tasa de sobrevivencia larval, lo cual pudo observarse en la descendencia obtenida de especímenes expuestos a 10 $\mu\text{g/L}$. De este grupo cinco, lograron sobrevivir. Adicionalmente, se observó un crecimiento lento en relación con la combinación control. Woock *et al* (24) reportó un crecimiento retardado en peces expuestos al selenio, en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Morfología externa

El aspecto externo de la progenie obtenida de la combinación control + 5 $\mu\text{g/L}$, y 10 $\mu\text{g/L}$, presentó alteraciones morfológicas, incluyendo: exoftalmia, pérdida de la curvatura normal y desviación de la columna vertebral, deformación de la cabeza, boca y cola, hipopigmentación, en comparación con los controles. Estos cambios también han sido reportados por otros autores en relación a la acción del metal (4, 9-11, 13, 23, 24, 26, 40-46).

Histología

Tejido cerebral:

Análisis de preparaciones de cortes transversales de material cerebral de los peces (hembras y machos) expuestos al cadmio exhibieron una marcada neovascularización, sin presencia de células inflamatorias (Figuras 1 y 2). En las secciones correspondientes a peces machos, se apreciaron

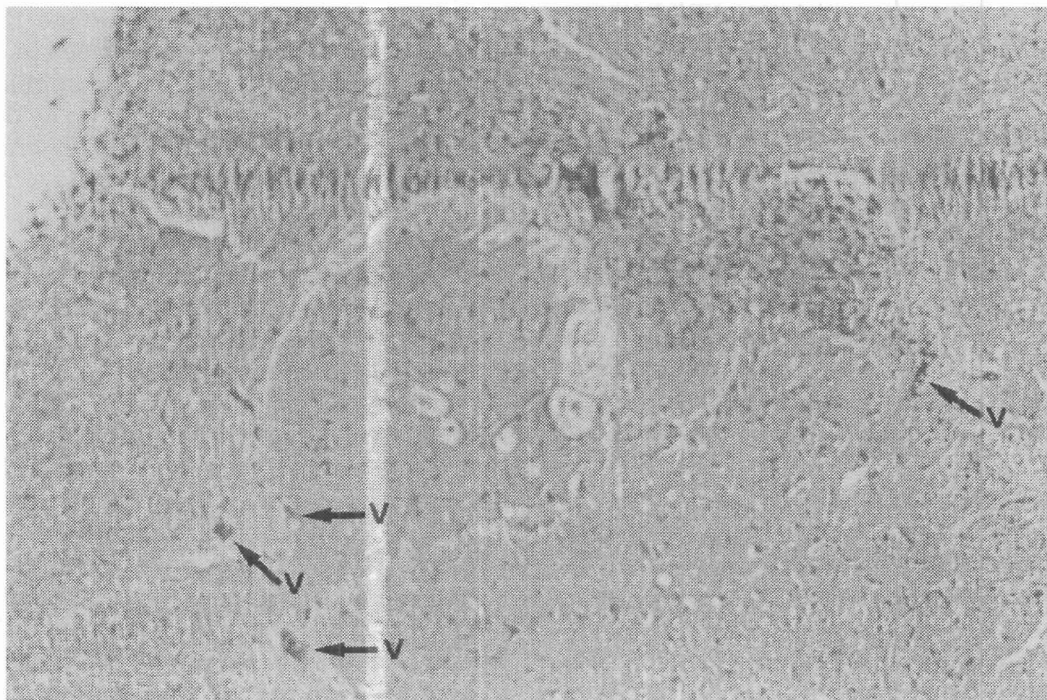


Figura 1. Sección de cerebro de hembra expuesta a una dosis de 5 $\mu\text{g/L}$ (400x). V = neovascularización.

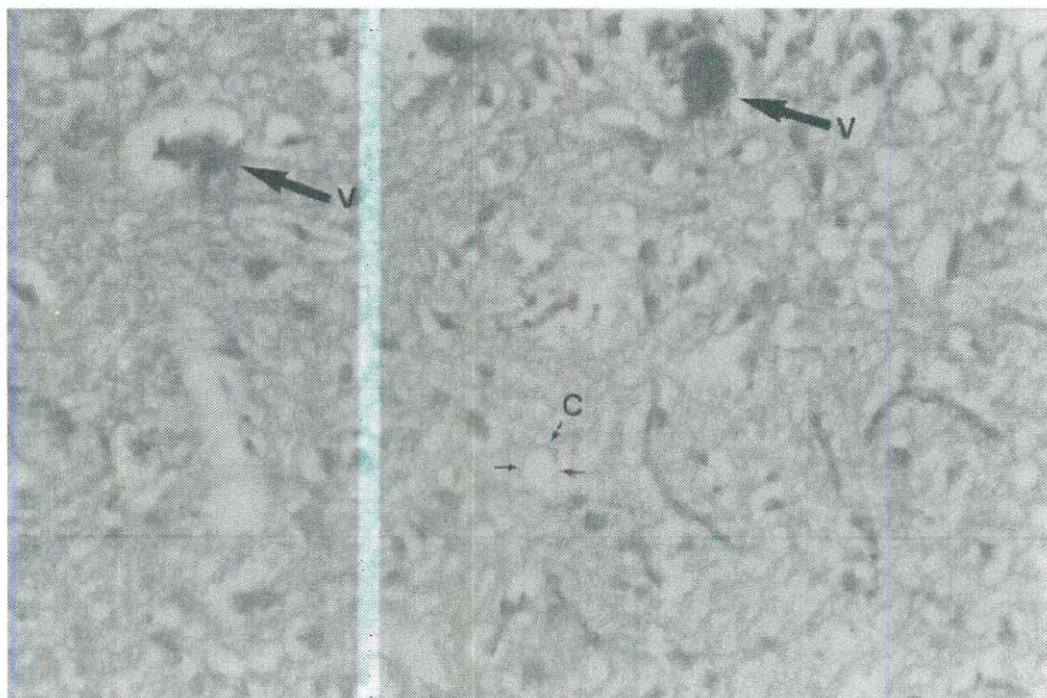


Figura 2. Sección de cerebro de macho expuesto a una dosis de 5 µg/L (600x). V = neoformación de vasos sanguíneos. C = núcleo hipercromático.

células pequeñas con núcleos hipercromáticos de escaso citoplasma (Figuras 1 y 2).

Tejido de gónadas testiculares:

Análisis de las secciones transversales de gónadas testiculares de las especies revelaron la presencia de arreglos celulares particulares, dispuestas en "rosetas" de apariencia ductal. Adicionalmente se apreciaron células de gran tamaño, hipercromáticas, con vacuolas intracitoplasmáticas.

Tejido de gónadas ováricas:

En las secciones ováricas, se estableció la presencia conspicua de material amorfo indiferenciado de coloración rosada. Así mismo, se apreciaron formas predominantes con arreglo globular de tamaño pequeño, aislados o en acúmulos; el resto del parénquima se encontraba acompañado por células pequeñas de aspecto linfocitoide, en un estroma laxo, con túbulos de variado grosor (Figuras 3 y 4).

La literatura disponible sobre los cambios histológicos del cerebro y gónadas en organismos expuestos a este metal es escasa o no existente. Sin embargo, resultados obtenidos en estudios del tejido hepático en tilapias expuestas al cadmio, refieren la presencia de áreas de neovascularización como fenómeno de reparación. El mismo se relaciona con la acción que este metal provoca sobre las enzimas que regulan el contenido mineral, entre estas la adenilato ciclasa y fosfodiesterasa cerebral, ambas son inhibidas ante pequeñas concentraciones de cadmio, puesto que el contenido de proteínas en el cerebro es alto, se puede deducir la afinidad que existe entre este metal y los residuos de cisteína de estas enzimas, provocando así la alteración observada en el balance mineral óseo (47).

La presencia de células de hipercromáticas, tanto en tejido cerebral como en las gónadas, de los peces expuestos al cadmio, podría corresponder a una granulación cito-

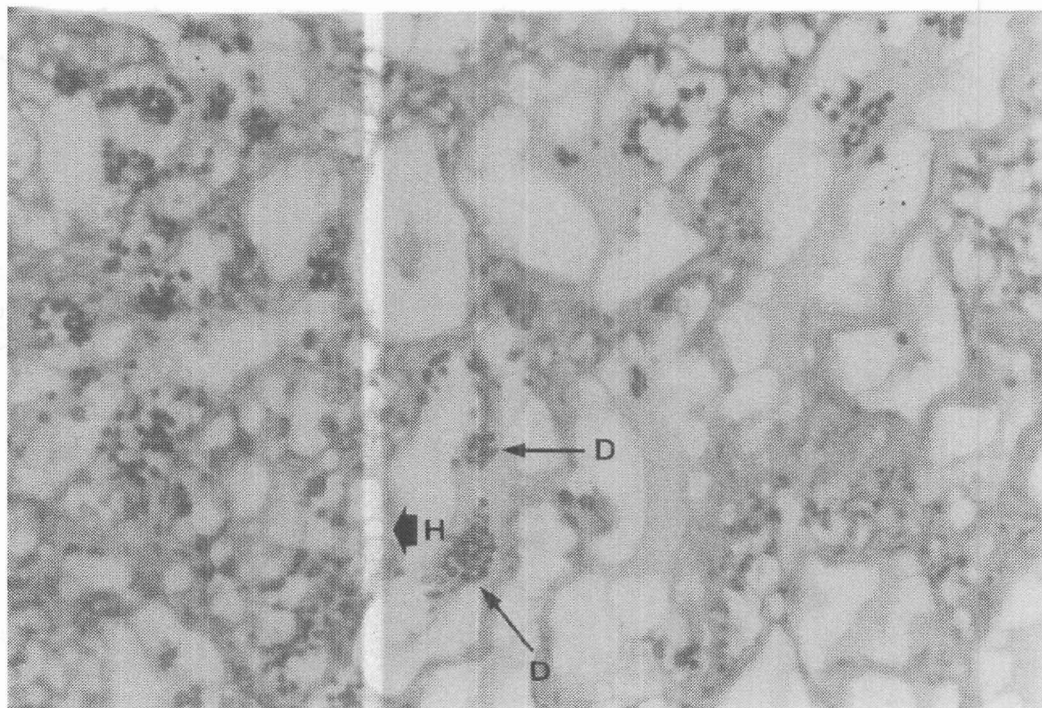


Figura 3. Sección de gónada de pez macho expuesto a 5 $\mu\text{g/L}$ (600x). D = rosetas. H = células hipercromáticas.

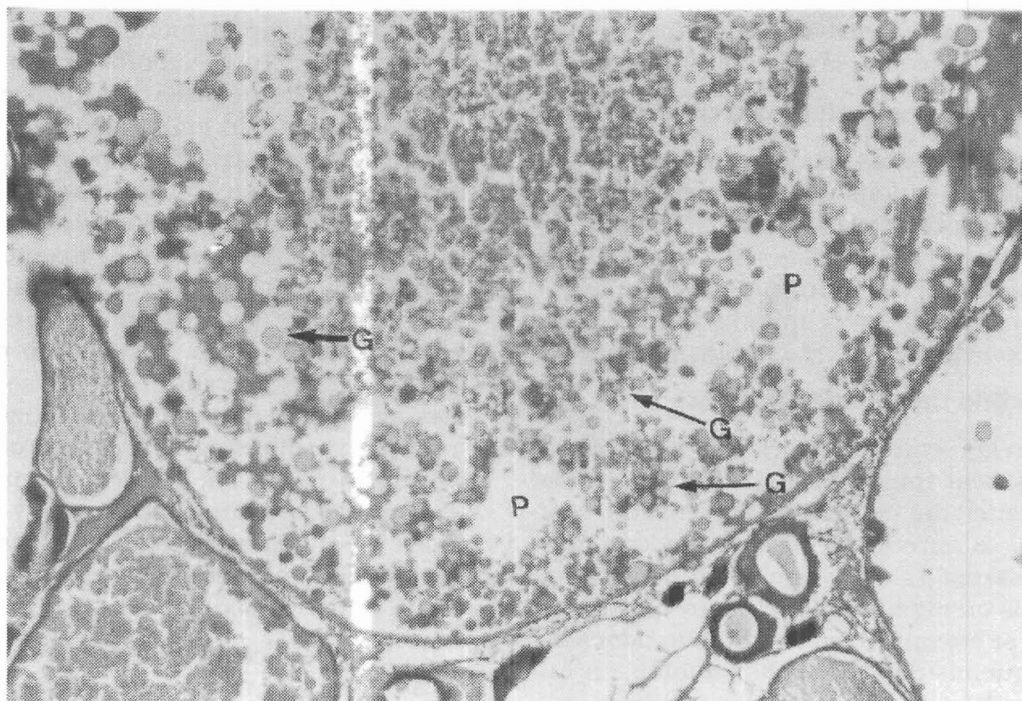


Figura 4. Sección de gónada de pez hembra expuesta a 5 $\mu\text{g/L}$ (600x). G = glóbulos indiferenciados. P = parénquima de aspecto linfocitoide en estroma laxo.

plasmática alta, en respuesta a la presencia del agente tóxico, también como distrofia granular, reportada por Munawar (48), indicativo de una granulación celular potencialmente conducente a provocar un daño tisular.

La vacuolización intracitoplasmática observada en las secciones de gónadas (testiculares y ováricas) podría ser producto de una degeneración vacuolar que conduce a la pérdida del contenido celular (12, 48). Esto pudiera estar relacionado con la presencia de tejido laxo, quizás provocado alteraciones histológicas debido a la exposición metálica. En un estudio reportado por Copius (21) se describe la aparición de inclusiones esféricas de naturaleza desconocida en tejido renal, lo cual podría estar relacionado con la proliferación de material amorfo indiferenciado, observado en las secciones ováricas de las tilapias expuestas al cadmio de esta investigación.

Anormalidades en el complejo sinaptonémico:

Dos tipos de anomalías fueron observadas en los complejos sinaptonémico de machos progenitores, tratados con cadmio: desinapsis y asociaciones terminales. Estas irregularidades también fueron encontradas en machos controles; no obstante, la frecuencia de núcleos anormales y el grado de anomalía dentro de un núcleo fue diferente entre ambos grupos.

Foresti (49) reportó la presencia de desinapsis en el cromosoma de mayor tamaño como un evento normal para esta especie. En el presente trabajo, las desinapsis fueron observadas en bivalentes de tamaño mediano. Por lo general, esta irregularidad afectó a más de un bivalente (Figura 5). Vidal y col (50) consideran que las desinapsis reflejan un comportamiento anormal en los procesos sinápticos y su frecuencia es alta en individuos con una severa detención de la

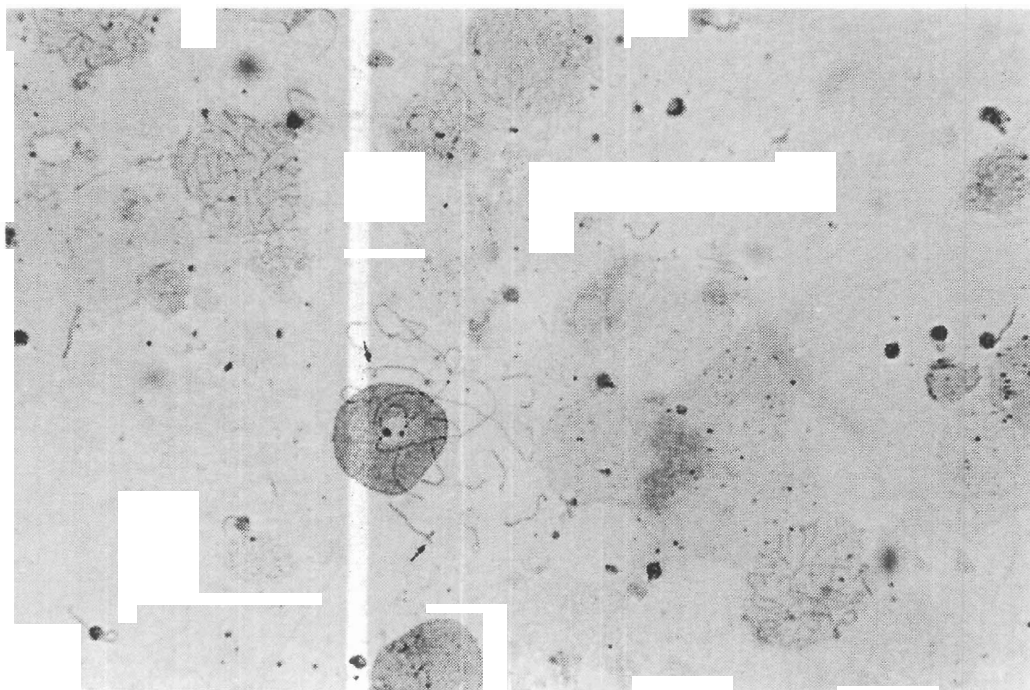


Figura 5. Núcleo paquiténico de espermatocito de *Oreochromis sp* expuesto a 5 µg/L de cadmio en donde se observa dos desinapsis en los extremos terminales (100x).

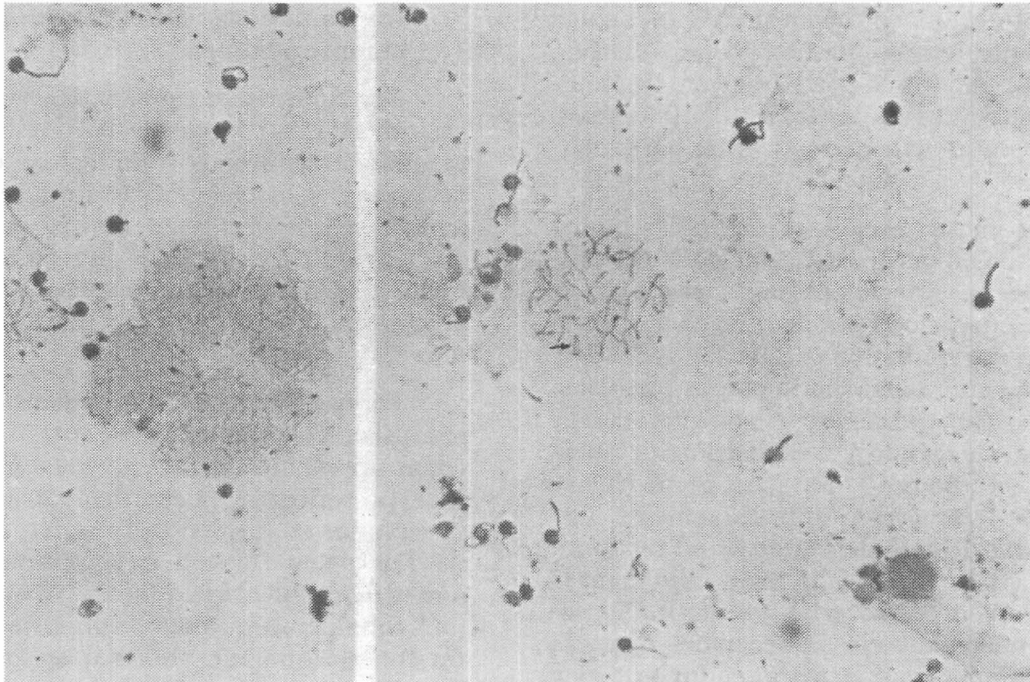


Figura 6. Núcleo paquiténico de espermatocito de *Oreochromis sp* expuesto a 5 $\mu\text{g/L}$ de cadmio en donde se observa una asociación terminal entre un mismo complejo sinaptonémico (100x).

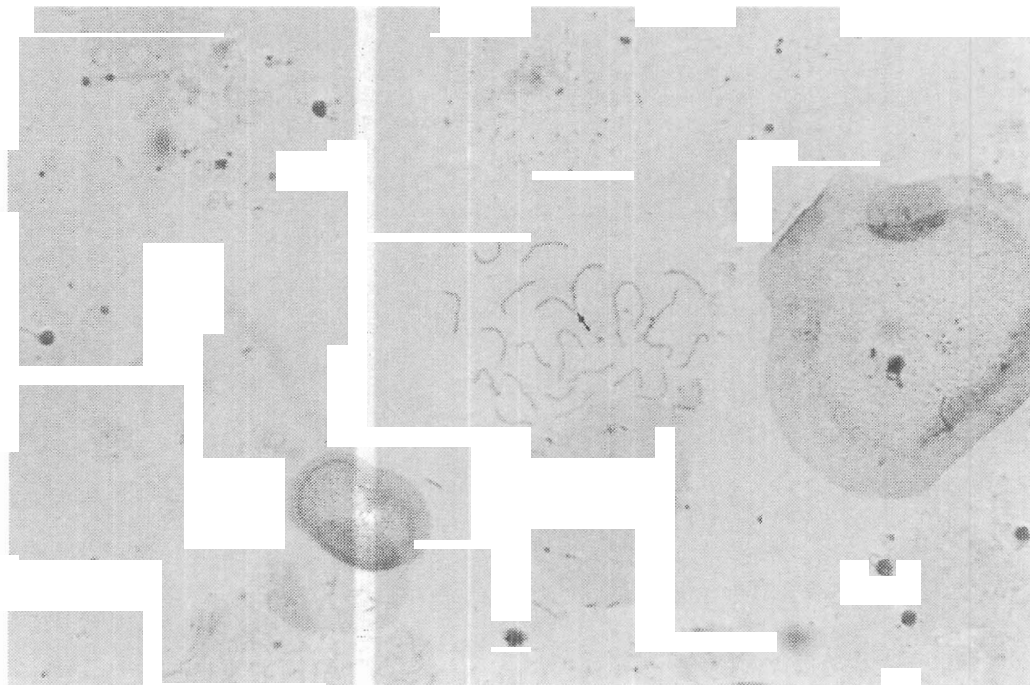


Figura 7. Núcleo paquiténico de espermatocito de *Oreochromis sp* expuestos a 5 $\mu\text{g/L}$ de cadmio en donde se observa una asociación entre diferentes complejos sinaptonémicos (100x).

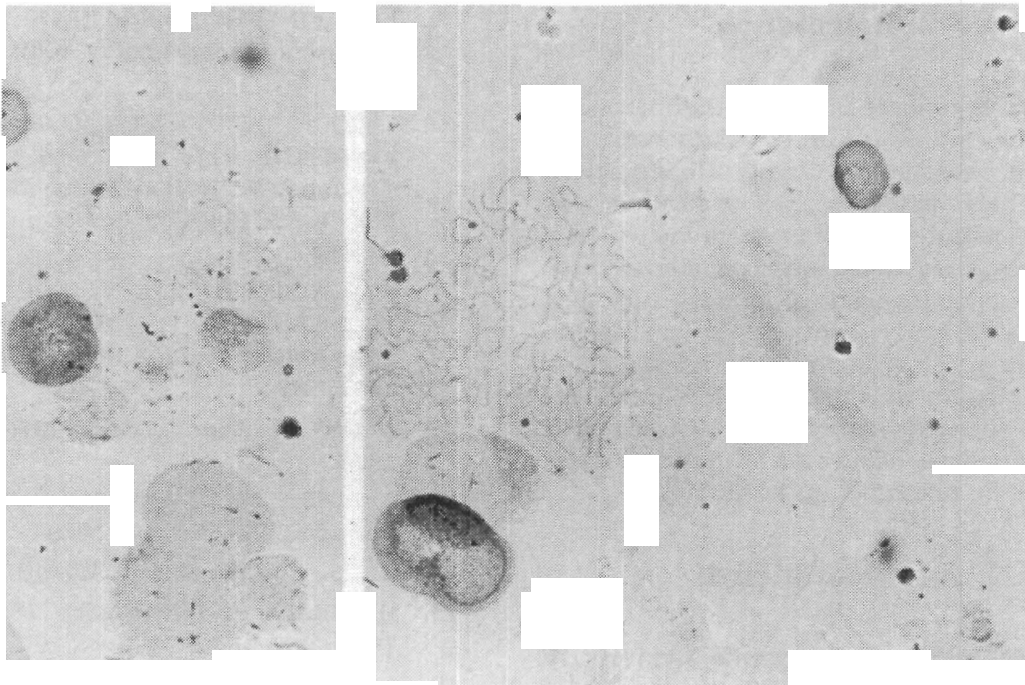


Figura 8. Núcleo paquiténico de espermatocito de *Oreochromis sp* expuestos a 5 µg/L de cadmio en donde se observa una poliploidía (100x).

meiosis, a nivel de espermatocitos primarios.

La desinapsis, según Templado (51) podría originar una distribución al azar de los cromosomas, provocando un bloqueo meiótico o disyunción incontrolada de los mismos, con formación de gametos inviables o desequilibrados. Este bloqueo meiótico podría ser parcialmente responsable por la infertilidad de los progenitores machos expuestos al cadmio. Consecuentemente se podrá inferir que el cadmio produce esterilidad por cambios tróficos de origen vascular en los testículos y afectar los procesos de apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase I (52, 53).

En cuanto a las asociaciones terminales se encontraron asociaciones en anillo (Figura 6) y en cadena (Figura 7). Las asociaciones terminales han sido reportadas en varios organismos, como en hamsters (54, 55), locusta (56) y plantas (57). Borges (58) ha reportado una mayor frecuencia de este

tipo de anomalía en peces de la especie *Oreochromis sp* expuestos al cadmio.

Análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que la mayor frecuencia de asociaciones observadas en los individuos tratados, fueron el resultado de la exposición al cadmio y estos fueron originados durante el estado de "bouquet". Su presencia posiblemente retrase los procesos sinápticos de los bivalentes implicados.

Además de las anomalías ya mencionadas, se encontró una alta frecuencia de núcleos paquiténicos que presentaban poliploidía (Figura 8). Sbrana y col (59) han reportado que el cadmio es capaz de inducir células hiperdiploides. Los mecanismos mediante los cuales el cadmio es capaz de originar esta aberración numérica son desconocidos.

Conclusiones

En el presente estudio se establece que el cadmio interfiere con el metabolismo del calcio, acompañado de cambios histológicos apreciables, por lo menos a nivel de los órganos estudiados. El metal, a las concentraciones ensayadas, provocó alteraciones celulares notables a nivel gonadal, incidiendo en la calidad y cantidad de la progenie obtenida, a partir de progenitores expuestos vs control. En machos, el efecto tóxico del cadmio sobre los testículos provocó esterilidad. Hembras expuestas al metal fueron capaces de mantener su fertilidad.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES-LUZ) por el soporte financiero para el proyecto N° 1808-95.

Referencias Bibliográficas

1. HODSON P. *Aquat Toxicol* 11:3-18, 1988.
2. ÖTSCH W. *Environ Manag* 14(3): 333 - 338, 1990.
3. SUNDA E., ACOUSTA P., NEALSON D. *Toxicol Lett* 25:319-326, 1985.
4. RENGEL-ZAMBRANO I., SALAS R., CHAVEZ M., GUERRA J., MARQUEZ R., URDANETA N. *Ciencia* 3(3):175-192, 1995.
5. EISLER R. *Biol Rep Fish Wildl Serv* 10:106, 1993.
6. REID S., McDONALD D. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1061 - 1068, 1991.
7. FU H., STEINEBACH O., HAMER V., BALM P., LOCK R. *Aquat Toxicol* 16:257-270, 1990.
8. PRATAP H., WENDELAAR S. *Comp Biochem Physiol* 95C(2):313-317, 1990.
9. BUEHRINGER H., SPERLING K., WUNDER W. *Arch Fischereiwiss* 40(3):205-228, 1990.
10. LANG T., DETHLEJSEN V. *Cadmium in skeletally deformed and normally developed Baltic cod (Gadus morhua L.)*. Edit. ICES. Copenhagen (Denmark), pp. 18, 1987.
11. PRAGATHEESWARAN V., LOGANATHAN B., NATARAJAN R., VENUGOPALAN V. *Proc Indian Acad Anim Sci* 96(4):389-393, 1987.
12. HANDY R. *Aquat Toxicol* 27(1-2):1-14, 1993.
13. GARDNER G., YEVICH P. *J Fish Res Bd Canada* 27:2185-2196, 1970.
14. ELLIS A. *J Fish Biol* 11:453-491, 1977.
15. BLAZHALL P. *J Biol Fish* 18:177-181, 1981.
16. HOUSTON A., KEEN J. *Can J Fish Aquat Sci* 41:1829-1834, 1984.
17. GARTY M., BRACKEN W., KLAASEN C. *Toxicology* 42:111-119, 1986.
18. MURAD A., HOUSTON A. *Aquat Toxicol* 13:141-154, 1988.
19. AINSWORTH A., DEXIANG C., WATERSTRAP T. *J Aquat Anim Health* 3:41-47, 1991.
20. NARAYAN R., SATHYANESAN A. *Environ Pollut* 47:135-145, 1987.
21. COPIUS J., MELET J., COPIUS J., HOOGHWINKEL G. *Toxicology* 14:67 - 80, 1979.
22. LEMAIRE S., LEMAIRE P. *Aquat Toxicol* 22:146-160, 1992.
23. PLOWMAN M., PERACHA H., HOPFER S., SUNDERMAN F. *Teratog Carcinog Mutag* 11(2):83 - 92, 1991.
24. WOOCK S., GARRET W., PARTIN W., BRYSON W. *Bull Environ Contam Toxicol* 39(6):998 - 1005, 1987.
25. GILL T., BIANCHI C., EPPLE A. *Comp Biochem Physiol* 102C(3): 361 - 371, 1992.
26. LEMLY A. *Ecotoxicol Environ Safety* 26(2):181 - 204, 1993.

27. WONG K., KLAASEN C. *Toxicol Appl Pharmacol* 55:456 - 466, 1980.
28. PARRY J., PARRY E. *Mutation Res* 181: 267 -287, 1987.
29. WAALKES M., OBERDOSTER G. *Mechanisms of metal carcinogenesis*. Edits. E P Foulkes, Boca Ratón (USA), pp.129, 1990.
30. GONZALEZ A. Efectos subletales del cadmio en meiosis testicular de *Oreochromis* sp (tilapia roja) (Tesis de Grado), La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp. 73, 1995.
31. DEAVEN L., CAMPBELL E. *Cytogenet Cell Genet* 26:251 - 260, 1980.
32. WARD G., PARRISH P. *Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 6. Ensayos de toxicidad. FAO Documentos Técnicos de Pesca*. Roma (Italia), pp. 25, 1982.
33. APHA-AWWA-WPCF Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 th Edition. Washington (USA), 1992.
34. EVANS E., BRECKON G., FORD C. *Cytogenetic* 3: 284 - 294, 1964.
35. FLETCHER J. *Chromosome* 72:241 - 248, 1979.
36. DI FIORE M. *Diagnóstico Histológico*. Ediciones El Ateneo. Buenos Aires (Argentina), pp. 612, 1971.
37. BENGTTSSON B. *Oikos* 35:134 - 139, 1974.
38. HELLOU J., WARREN W., PAYNE J., BELKHODE S., LOBEL P. *Mar Pollution Bull* 24(9):452 - 458, 1992.
39. EVTUSHENK Z., BELCHEVA N., LUKYANOVA O. *Comp Biochem Physiol* 83C(2): 371 - 376, 1986.
40. GENTHNER F., MIDDAGH D. *Appl Environ Microbiol* 58(9):2840-2845, 1992.
41. ALVENDIA A., CARINO V. *Gonadal sex differentiation in Oreochromis niloticus*. Edit. Pullin R., Bhukaswan T., Tonguthai K., Maclean J., Bangkok (Thailand), pp. 121, 1988.
42. NAKAMURA M., NAGAHAMA Y. *Differentiation and development of leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia Oreochromis niloticus*. Edits. Peter R., Schreiberman M., Pang P., Leatherland J., pp. 211, 1989.
43. SUNDERMAN F. *Sci Tech Lett Supp* 467 -474, 1992.
44. LEWLY A. *Ecotoxicol Environ Safety* 26 (2):181 - 204, 1993.
45. SANCHEZ D., GOMEZ M., LLOBET J., DOMINGO J. *Ecotoxicol Environ Safety* 26(1):33 - 39, 1993. 46.
46. CHAVEZ M. Respuestas hematológicas y de iones plasmáticos inducidas por el cadmio en *Oreochromis* sp (tilapia roja) (Tesis de Grado), La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), pp 71, 1995.
47. EWERS U., ERBE R. *Toxicology* 16:227 - 237, 1980.
48. MUNAWAR A. *Bull Environ Contam Physiol* 19:524 - 527, 1978.
49. FORESTI F., OLIVEIRA C., FORESTI L. *Genome* 36:1124 - 1128, 1993.
50. VIDAL F., TEMPLADO C., NAVARRO J., MARINA S., EGOZCUE J. *Int J Androlog* 5:21 - 26, 1982.
51. TEMPLADO C., VIDAL F., EGOZCUE J. *Human Genetics* 72:275 - 277, 1986.
52. WAITES G., SETCHELL B. *J Endocrinol* 34:329 -342, 1966.
53. AOKI A., HOFFER A. *Biol Reprod* 18:579 - 591, 1978.
54. MOSES M J. *Chromosoma* 60:99-125, 1977.
55. GUITART M., PONS A M., COLL M D., EGOZCUE J. *Genetica* 74:105 - 112, 1987.
56. MOLINA J. Estudios meióticos en *Locusta migratoria* (Tesis Doctoral), Universidad Autónoma de Barcelona, 1989.
57. LOIDE J. *Can J Genet Cytol* 28:754 - 761, 1986.
58. BORGES B. Efectos subletales del cadmio en el complejo sinaptonémico de *Oreochromis*

mis sp (Tilapia) (Tesis de Grado), La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), 1996.

59. SBRANA I., DI SIBIO A., LOMI A., SCARCELLI V. **Mut Res** 287:57 - 70, 1993.