

Inv. Pesq.	42 (1)	Págs. 141-154	marzo, 1978
------------	--------	---------------	-------------

## Acumulación y efectos histopatológicos del cadmio y el mercurio en el sapo (*Halobatrachus didactylus*).\*

por

M. GUTIÉRREZ, R. ESTABLIER y A. ARIAS \*\*

### INTRODUCCIÓN

Como otros metales, el mercurio y el cadmio son estables y no se degradan en el medio ambiente, estando considerados como los más tóxicos para un gran número de organismos marinos, siendo acumulados por éstos en proporciones que, en algunos casos, pueden constituir un serio peligro si son destinados a la alimentación humana. Así son muy conocidas las intoxicaciones producidas por ingestión de peces y moluscos contaminados por mercurio en Minamata (Japón) y los producidos por el uso de alimentos y aguas contaminadas por cadmio en determinadas zonas del Japón que dieron lugar a la enfermedad conocida por el nombre de Itai-Itai, habiéndose estudiado detenidamente tanto los efectos letales como los subletales que producen los envenenamientos ocurridos por la ingestión de alimentos contaminados por diversos compuestos de mercurio y cadmio (FRIEBERG, 1974 y ESTABLIER, 1977).

\* Recibido el 11 de febrero de 1977. Este trabajo se ha realizado dentro del Proyecto Común Coordinado FAO (CGPM)/PNUE sobre la contaminación del Mediterráneo (MED IV) a título de los Programas coordinados PNUE de vigilancia continua e investigación relativa a la contaminación del Mediterráneo y con una subvención de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, 1977.

\*\* Laboratorio del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Puerto Pesquero. Cádiz.

Generalmente en los moluscos y crustáceos se encuentran concentraciones de cadmio más elevadas que en los tejidos musculares de los peces, habiéndose detectado fuertes concentraciones de este metal en los moluscos bivalvos procedentes de determinadas áreas (EISLER y col., 1972 y ESTABLIER, 1975, 1977). En los peces el mercurio se acumula en los tejidos (principalmente en forma de metilmercurio) en mayor proporción que el cadmio, siendo en el hígado, bazo, riñón e intestino donde generalmente se encuentran las concentraciones más elevadas de estos metales (EATON, 1974 y GREIG, 1974).

La bibliografía existente sobre los efectos del mercurio y el cadmio en los organismos acuáticos es relativamente reducida refiriéndose la mayoría de los estudios realizados a organismos de agua dulce (McKIM y col., 1975). Con respecto a los efectos de los metales pesados sobre los organismos marinos la mayoría de los estudios se refieren a la determinación de la toxicidad letal, habiéndose iniciado recientemente estudios encaminados a determinar las alteraciones fisiológicas y acumulaciones producidas en distintos órganos al someter los peces marinos a concentraciones subletales de determinados metales pesados (GARDNER y YEVICH, 1970; HAMLIN y SONIS, 1970; CALABRESE y col., 1975). Son de destacar los estudios realizados por GARDNER y YEVICH (1970) sobre la respuesta histológica y hematológica del *Fundulus heteroclitus* al cadmio, observando las alteraciones histopatológicas a nivel de intestino, riñón, branquias así como las alteraciones citológicas de los elementos formes de la sangre y los estudios sobre las alteraciones histopatológicas producidas por el cadmio en el *Tautoglabrus adspersus* a nivel de epitelio intestinal, tubos renales, epidermis y las alteraciones citomorfológicas de la sangre (NEWMAN y MAC LEAN, 1974).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las experiencias se realizaron colocando en dos tanques que contenían 200 litros de agua de mar filtrada tres ejemplares de sapos, pez marino (*H. didactylus*) en cada uno. A uno de los tanques se le añadió, disuelta en agua de mar, la cantidad apropiada de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  o de  $\text{HgCl}_2$  para obtener una concentración de cadmio de 50 ppm o de 0,1 ppm de Hg y el otro tanque se dejó con el agua de mar natural. A las 48 horas se vaciaron de cada tanque 150 litros reponiéndose este volumen, en el de tratamiento con cadmio, con 150 litros de agua de mar con 50 ppm de cadmio y en el otro, con este mismo volumen de agua de mar natural, retirando los peces de los tanques a las 96 horas en el caso del cadmio y a los 50 días en el de Hg. Se mantuvieron los ejemplares que habían permanecido en la solución de Cd y Hg de 30 a 60 segundos en un tanque

con agua de mar limpia, y a continuación se pasó a efectuar la disección de los ejemplares para tomar las muestras correspondientes a los análisis de cadmio e histopatología.

Las tallas de los peces y las condiciones físico-químicas de las experiencias han sido las siguientes:

*Experiencia n.º 1.* — La longitud total de los seis ejemplares utilizados osciló entre los 28,0 y 33,5 cm, la temperatura entre 17,0 y 20,0° C, la salinidad entre 36,02 y 36,32 ‰ y el pH entre 7,92 y 8,01. Tratamiento: 50 ppm de Cd durante 96 horas.

*Experiencia n.º 2.* — La longitud total de los seis ejemplares utilizados estaba comprendida entre 20,0 y 28,0 cm, la temperatura entre 17,5 y 20,8° C, la salinidad entre 36,40 y 36,52 ‰ y el pH entre 7,89 y 8,00. Tratamiento: 50 ppm de Cd durante 96 horas.

*Experiencia n.º 3.* — La longitud total de los seis ejemplares utilizados estaba comprendida entre 20,0 y 21,0 cm, la temperatura entre 18,0 y 21,2° C, la salinidad entre 36,45 y 36,49 ‰ y el pH entre 7,82 y 7,91. Tratamiento: 50 ppm de Cd durante 96 horas.

*Experiencia n.º 4.* — La longitud total de los seis ejemplares utilizados osciló entre los 24,0 y 28,0 cm, la temperatura entre 19,0 y 23,2° C, la salinidad entre 36,35 y 36,46 ‰, y el pH entre 7,81 y 7,95. Tratamiento: 0,10 ppm de Hg durante 49 días.

Para los análisis de cadmio las muestras se secaron a 110° C hasta peso constante y se calcinaron en horno eléctrico a 470° C. Después se humedecieron las cenizas con HNO<sub>3</sub> y se volvieron a calcinar a 400° C. Las cenizas se disolvieron en caliente en solución 1N de ácido clorhídrico completando el volumen con agua bidestilada. Los análisis se efectuaron por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 303, equipado con corrector de deuterio. Para aquellas muestras con alto contenido en cadmio se utilizaron las técnicas usuales y para aquellas con bajo contenido en este metal se usó la técnica de la navicilla de muestreo de tántalo (Sampling Boat) de la forma descrita en un trabajo anterior (ESTABLIER, 1975). Los análisis de mercurio se han realizado por espectrofotometría de absorción atómica sin llama (Técnica del vapor frío), efectuando previamente la digestión de las muestras por vía húmeda y temperatura controlada, de la forma descrita en un trabajo anterior (ESTABLIER, 1972).

Para los estudios citohematológicos e histopatológicos hemos seguido los métodos siguientes:

*Citohematología:* Las extensiones finas de sangre tomadas directamente del corazón, después de secadas, se fijaron con metanol absoluto

y posteriormente se tiñeron con May-Grünwald-Giemsa o con el Citopancromo de GUTIÉRREZ (1962 y 1967).

*Histopatología:* Se tomaron piezas de hígado y riñón con un espesor de 4-6 mm que se fijaron en Bouin alcohólico y las muestras de intestino en formol al 20 % en etanol del 90 % añadiéndole un 5 % de ácido acético glacial. Se dejaron en frigorífico a 4-5° C durante 24-48 horas, se lavaron con etanol del 70 % v/v con dos cambios de 24 horas, luego se deshidrataron, se aclararon en benzol y se incluyeron en parafina de P.F. 56-57° C. Los cortes se hicieron de 5 a 7 micras y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina. Para control se realizaron cortes histológicos de animales de igual talla y con el mismo régimen alimentario, así como con el mismo tiempo en el tanque.

## RESULTADOS Y COMENTARIOS

### 3) ACUMULACIÓN DE CADMIO Y MERCURIO

En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en los análisis de cadmio, referidos a peso húmedo y seco, del músculo dorsal, sangre, hígado, riñón e intestino de los ejemplares de sapos mantenidos 96 horas en agua de mar con 50 ppm de Cd y agua de mar. Los resultados dados en el cuadro 1 se refieren a un «Pool» de los tejidos y órganos de los tres ejemplares que se utilizaron en cada parte de las experiencias. En este cuadro se aprecia que las concentraciones de cadmio en las distintas partes anatómicas de los ejemplares no tratados con soluciones de este metal son relativamente bajas, siendo la mayoría de los valores obtenidos inferiores a los 0,30 ppm sobre peso húmedo y habiéndose encontrado las concentraciones más elevadas en el intestino y riñón con valores medios de 0,24 y 0,21 ppm referidos a peso húmedo respectivamente. En los ejemplares mantenidos 96 horas en agua de mar natural con 50 ppm de Cd, se ve que la máxima acumulación de cadmio se produce en el intestino con un contenido medio de este metal de 39,05 ppm sobre peso húmedo y siendo después de éste los órganos de máxima acumulación el riñón e hígado con concentraciones medias de 12,79 y 5,21 ppm. Es de hacer notar las diferencias encontradas en la acumulación de cadmio en hígado e intestino entre las experiencias 1 y 3 y la 2, ya que en esta última la concentración de este metal es muy superior a las encontradas en las 1 y 3, sin embargo, la concentración hallada en el intestino es muy inferior a las de las otras experiencias.

En la experiencia n.º 4, que se hizo manteniendo a los ejemplares de

CUADRO 1

Acumulación de cadmio en órganos y tejidos de ejemplares de sapos (*Hyalobatrachus didactylus*) mantenidos durante 96 horas en agua de mar con 50 ppm de Cd y en agua de mar natural

Órgano o tejido	CONCENTRACION DE CADMIO ppm							
	EXP. 1		EXP. 2		EXP. 3		VALOR MEDIO	
	Peso húmedo	Peso seco	Peso húmedo	Peso seco	Peso húmedo	Peso seco	Peso húmedo	Peso seco
<i>Tratamiento 96 horas en agua de mar con 50 ppm Cd</i>								
Músculo dorsal	0,12	0,48	0,16	0,67	0,17	0,74	0,15	0,63
Sangre	1,13	8,88	1,26	10,86	—	—	1,20	9,87
Hígado	3,68	10,03	8,02	21,94	3,92	11,40	5,21	14,48
Riñón	15,94	83,24	10,09	65,01	12,35	72,64	12,70	73,63
Intestino	54,05	289,87	20,94	101,65	42,16	216,75	39,05	202,76
<i>Tratamiento 96 horas en agua de mar natural</i>								
Músculo dorsal	0,03	0,15	0,02	0,09	0,04	0,20	0,03	0,15
Sangre	0,12	1,06	0,10	0,86	—	—	0,11	0,96
Hígado	0,05	0,15	0,06	0,17	0,06	0,17	0,06	0,16
Riñón	0,12	0,70	0,32	1,81	0,20	1,18	0,21	1,23
Intestino	0,19	1,00	0,31	1,50	0,23	1,15	0,24	1,22

sapos durante 49 días en agua de mar con 0,10 ppm de Hg ( $\text{HgCl}_2$ ), sólo se analizó el contenido en mercurio total en músculo dorsal e hígado. Siendo los valores encontrados de este metal en músculo e hígado para los ejemplares mantenidos en agua de mar natural 0,90 y 1,98 ppm sobre peso húmedo respectivamente, mientras que las concentraciones halladas en estas mismas partes del cuerpo de los ejemplares mantenidos en agua de mar con 0,10 ppm de Hg alcanzaban valores de 9,62 y 50,30 ppm.

#### b) ESTUDIO HEMATOLÓGICO E HISTOPATOLÓGICO

De los estudios citomorfológicos de la sangre e histopatológicos a nivel del hígado, riñón e intestino en las condiciones citadas anteriormente llegamos a los resultados que se comentan seguidamente. Las fotomicrografías recogen los caracteres de normalidad y las alteraciones histológicas medias más frecuentes halladas en los ejemplares que forman los lotes motivo de este trabajo.

**SANGRE.** — El estudio se ha concentrado al efecto del cadmio y las alteraciones morfológicas, de tamaño, color de los eritrocitos y a la aparición de sombras nucleares, según se puede observar en las fotomicrografías (1) a (11) de las figuras 1, 2 y 3 comparándose con ejemplares control.

**HISTOPATOLOGÍA.** — El efecto del mercurio sobre el intestino y especialmente del cadmio sobre el hígado, riñón e intestino comparando con el aspecto morfológico de los ejemplares control quedan recogidos y comentados en las fotomicrografías (12) a (26) de las figuras 4, 5, 6 y 7. Como resumen podemos concluir diciendo que la concentración de 50 ppm de Cd y 0,10 ppm de Hg durante 96 horas y 49 días respectivamente producen alteraciones sobre la morfología eritrocitaria, así como signos de necrosis y modificaciones histopatológicas manifiestas en la morfo-estructura del hígado, riñón e intestino según las condiciones de contaminación experimental de este trabajo.

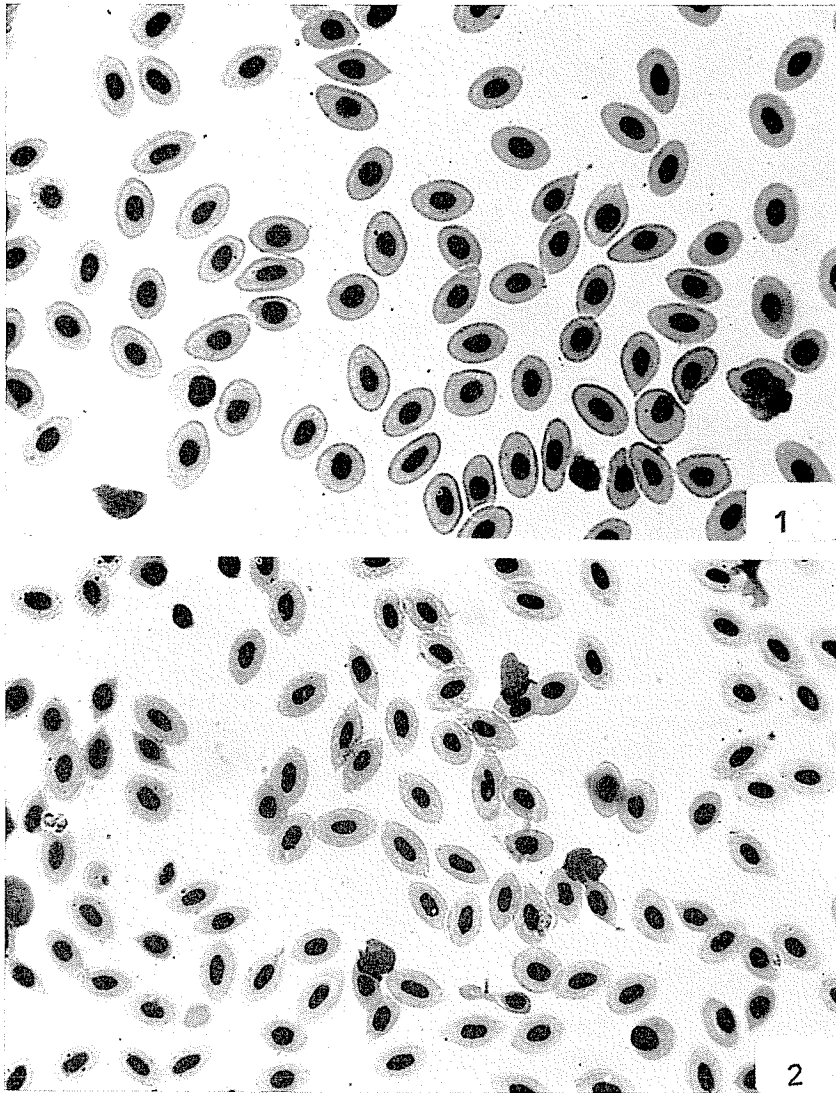


FIG. 1. — (1) Extensión de sangre de ejemplares no tratados con Cd. Eritrocitos con aspecto normal. 500x.

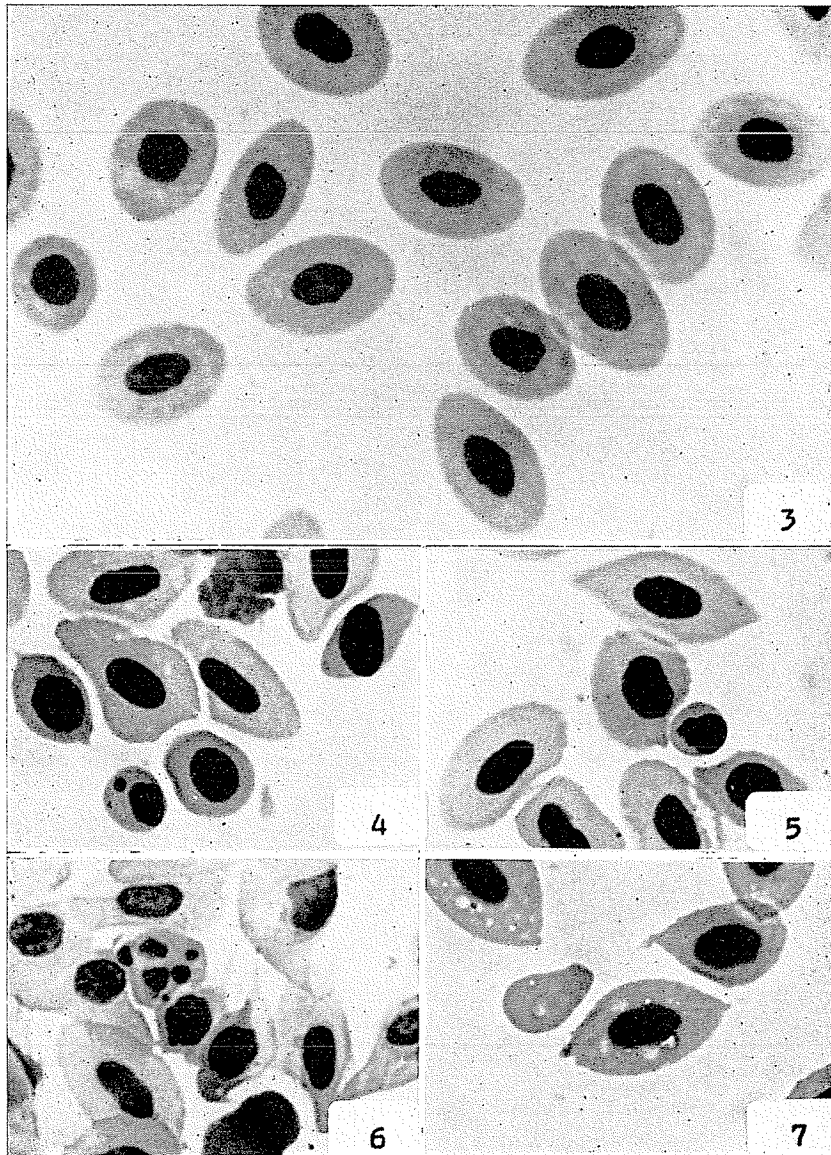


FIG. 2. — (3) Aspecto de los eritrocitos en ejemplares no tratados con Cd. Aspecto normal. 1.000 $\times$ . (4), (5), (6) y (7) Alteraciones producidas por el Cd en los eritrocitos. (4) Anisocitosis, anisocromemia, microcitosis y cariorrexis, (5). Microcitosis, (6). Gran cariorrexis y (7). Vacuolización y restos citoplasmáticos de eritrocitos. 1.000 $\times$ .



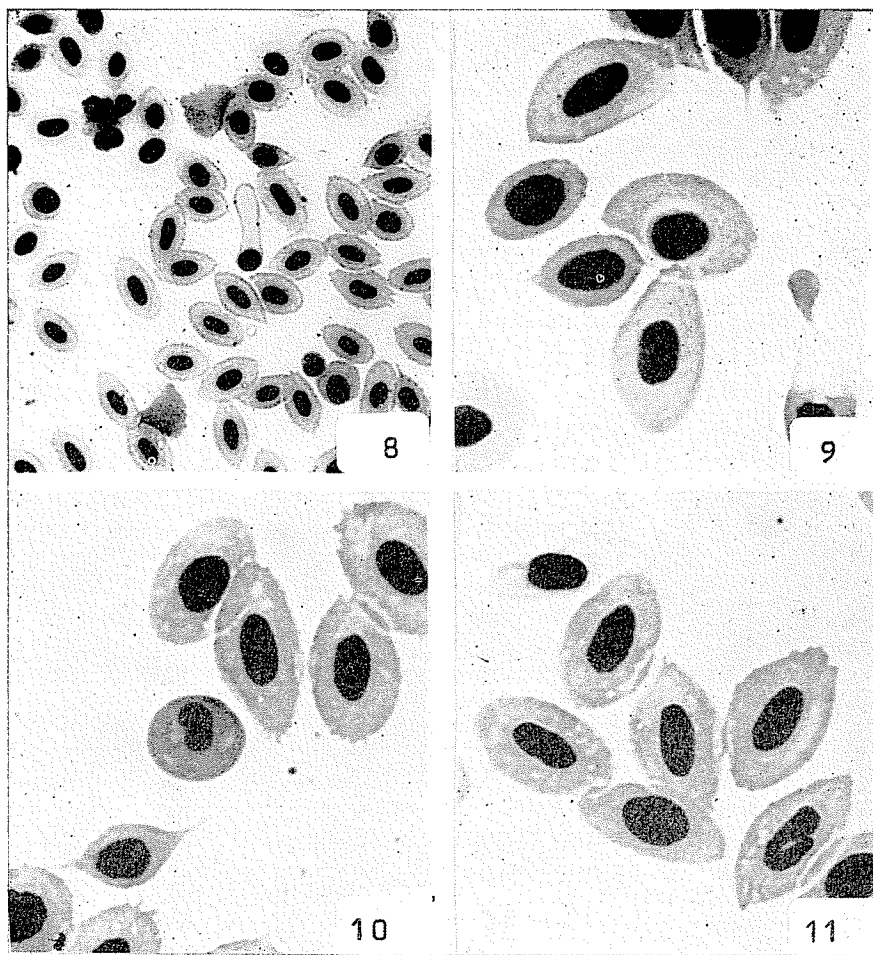


FIG. 3. — (8) Alteraciones producidas por el Cd en los eritrocitos en diferentes ejemplares. Anisocitosis, microcitosis y anisocromemia. 500 $\times$ . (9), (10) y (11). Alteraciones morfológicas y del contenido en Hb. (9), microcitosis, vacuolización, poikilocitosis y anisocitosis. (10). Hiper Cromatismo citoplásmico, microcitosis y formas fusiformes y (11). Alteraciones en la morfología de los núcleos. 1.000 $\times$ .

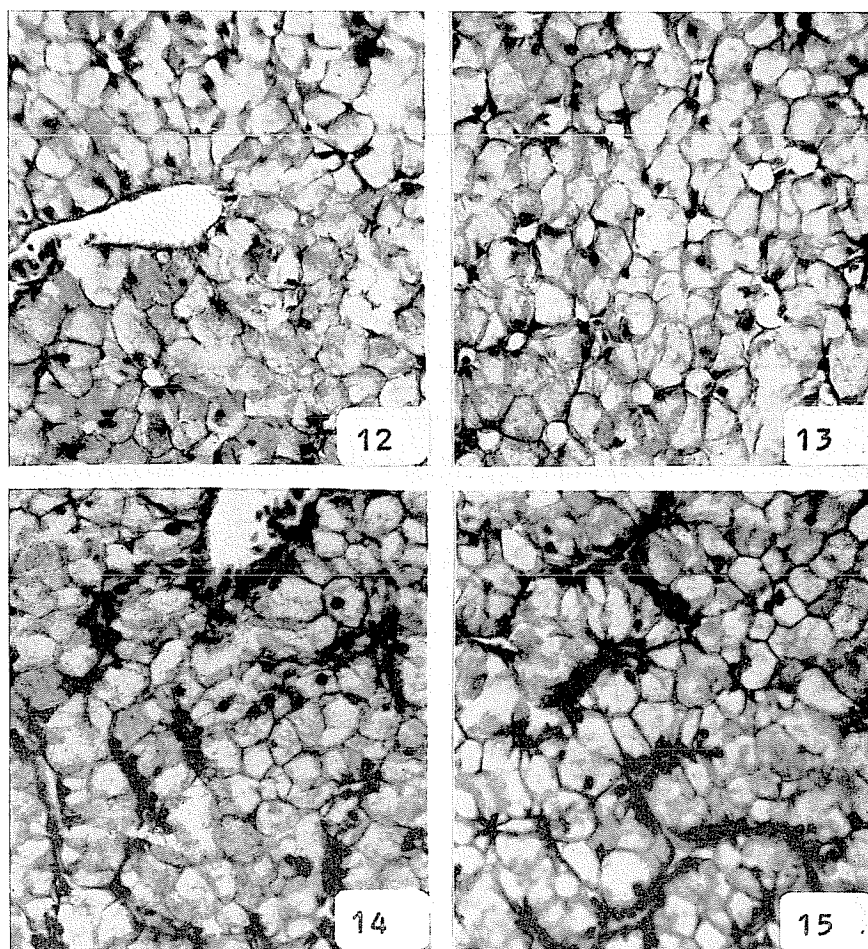


FIG. 4. (12) y (13). Hígado de ejemplares no tratados con Cd. Discreto aspecto reticulado 125 $\times$ . (14) y (15). Alteraciones producidas por el Cd. Aspecto reticulado con refuerzo trabecular y aumento del número de núcleos. 125 $\times$ .

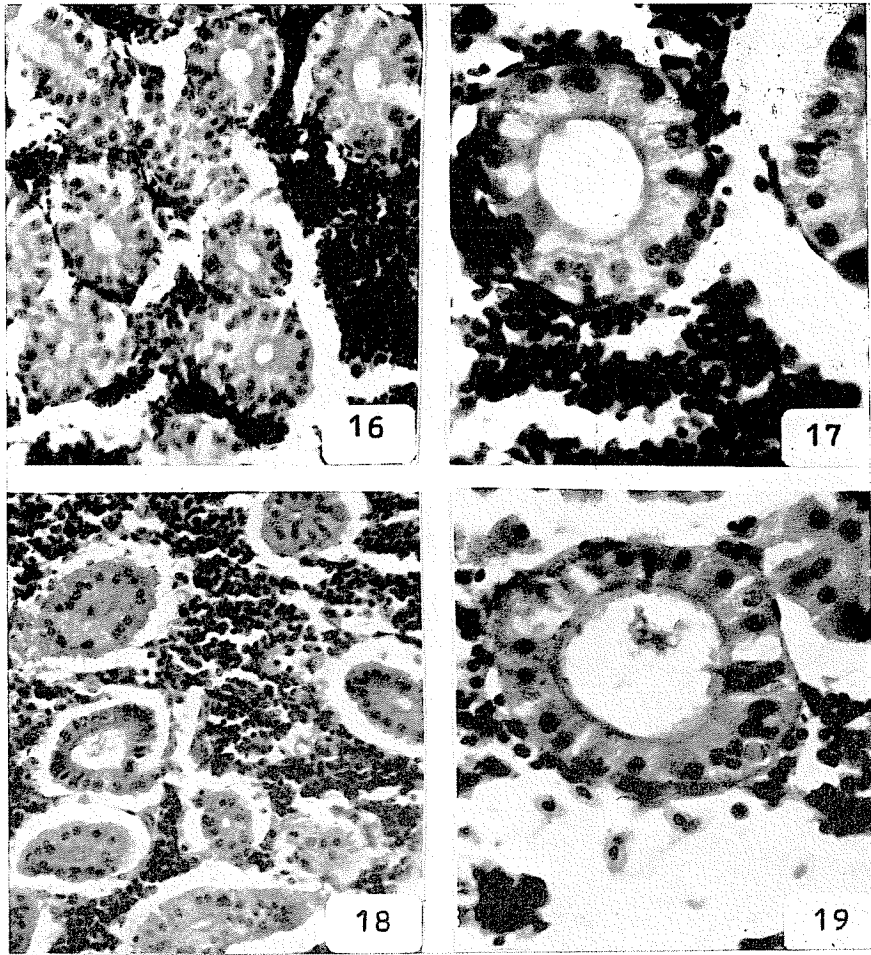


FIG. 5. — (16) y (17). Riñón de ejemplares no tratados con Cd. Tubos cortados transversalmente con núcleos en zona basal, luces vacías y tejido hemocitopoyético en cantidad normal. (18) y (19) Alteraciones producidas por el Cd. Núcleos con desorganización de su localización, a veces, hipocrómicos, luces pequeñas o dilatadas y llenas de restos amorfos eosinófilos. Signos degenerativos. (16) y (18) a 125 $\times$  y (17) y (19) a 250 $\times$ .

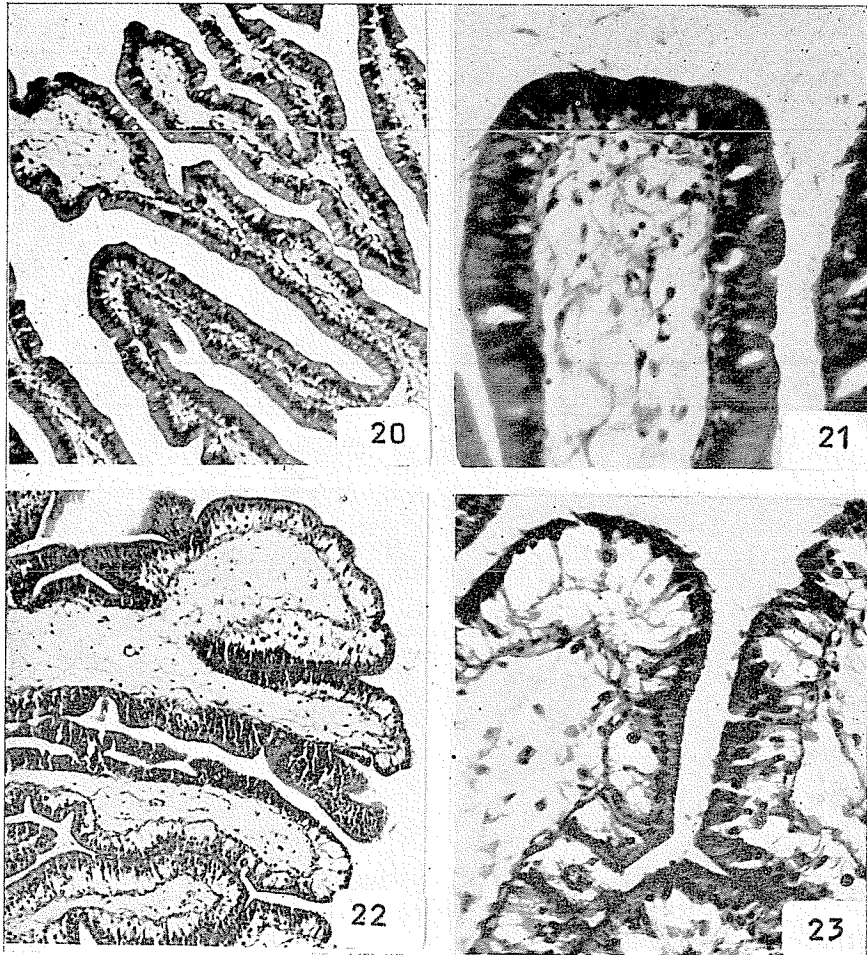


FIG. 6. — (20) y (21) Intestino de ejemplares no tratados con Cd. Epitelio de las vellosidades cortadas longitudinalmente con núcleos basales en todas las zonas, basal continua, corión reticulado con vasos finos y células propias. (22) y (23) Alteraciones producidas por el Cd. Pérdida de la orientación de los núcleos del epitelio de las vellosidades, hiperchromatismo, vacuolización y detritus en la periferia. Signos manifiestos de necrosis. (20) y (22) a  $37,5\times$  y (21) y (23) a  $125\times$ .

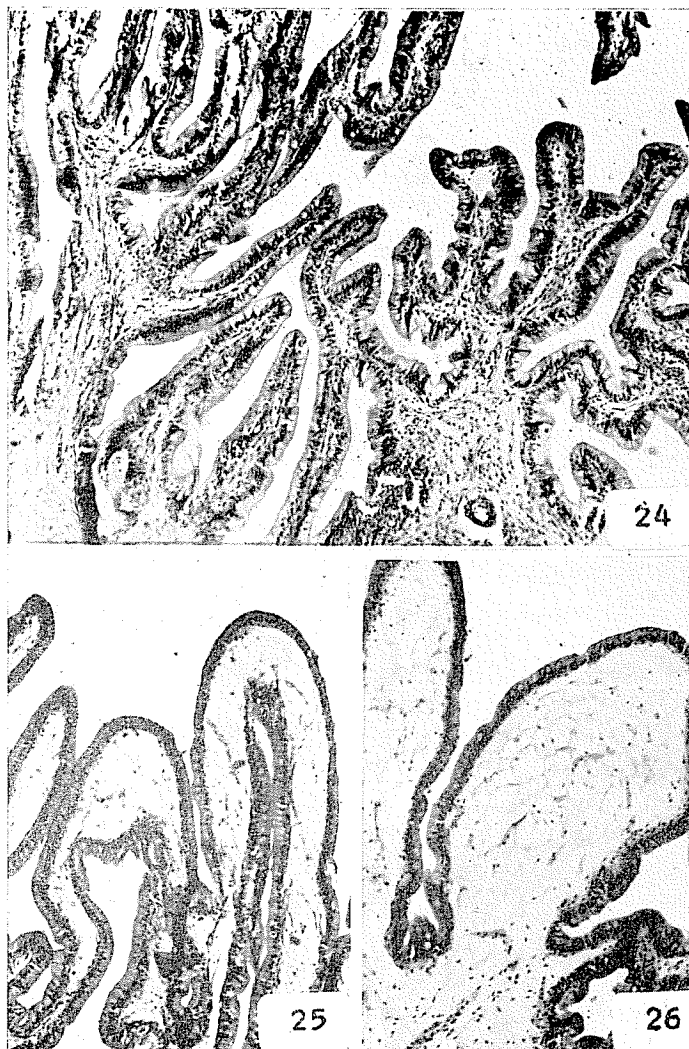


FIG. 7. — (24). Intestino de ejemplares no tratados con Hg. Caracteres como en la figura 6 fotomicrografía (20), (25) y (26). Alteraciones producidas por el Hg. En ambas se observa gran aumento del corión de las vellosidades. El epitelio de revestimiento presenta hiper Cromatismo nuclear y de la porción apical del citoplasma. 37,5 $\times$ .

## SUMMARY

UPTAKE AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF CADMIUM AND MERCURY TO THE SAPO (*Halobatrachus didactylus*). — Cadmium and Mercury uptake by «Sapo», *Halobatrachus didactylus*, exposed to 50 ppm of Cadmium in sea water for 4 days and 0,1 ppm of Mercury in sea water for 49 days is studied. Accumulations of Cadmium in flesh, blood, liver, kidney and intestine and mercury in flesh and liver is determined.

The citohematological and histopathological aspects of this study were undertaken in the hope for a better knowledge of the effects of cadmium and mercury on the blood, liver, kidney and intestine.

## BIBLIOGRAFÍA

- CALABRESE, A. y col. — 1975. Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals. *Elsevier Scientific Publishing Company*. Amsterdam.
- EATON, J. G. — 1974. Chronic Cadmium toxicity to the Bluegill (*Leponis macrochirus Rafinesque*) *Transaction of the American Fisheries Soc.*, 103 (4): 729-35.
- EISLER, R., G. E. ZARDOGIAN y R. J. HENNEKEY. — 1972. Cadmium uptake by marine organisms. *J. Fish Res. Board Canada*, 29: 1367-1369.
- ESTABLIER, R. — 1972. Concentración de mercurio en los tejidos de algunos peces, moluscos y crustáceos del Golfo de Cádiz y caladeros del noroeste africano. *Inv. Pesq.*, 36 (2): 355-364.
- 1975. Concentración de Cadmio en organismos marinos de la costa sudatlántica española. *Informes Técnicos del Inst. de Inv. Pesq.*, n.º 26, páginas 1-6.
- 1977. Estudio de la contaminación marina por metales pesados y sus efectos biológicos. *Ibidem*, en prensa.
- FRIEBERG, L. y col. — 1974. Cadmium in the environment (2.ª ed.). *C.R.C. Press, Inc. USA*.
- GARDNER, G. R. y P. P. YEVICH. — 1970. Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *J. Fish Res. Board Can.*, 27: 2185-2196.
- GREIG, R. A. y col. — 1974. Physiological response of the Cunner *Tautoglabrus adspersus*, to Cadmium. II Uptake of Cadmium by organs and Tissues. *NOAA Technical Report NMFS*, SSRF-681. Seattle (USA).
- GUTIÉRREZ, M. — 1962. Leichte und rasche Herstellung eines Farbstoff-Fixative (Blau G 239) für die zytöhämatologie *Blut*, VII: 424-425.
- 1967. Estudios hematológicos en el Atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.*, 3 (1): 53-90.
- JACKIM, E., J. M. HAMLIN y S. SONIS. — 1970. Effects of metal poisoning on five liver enzymes in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 27: 383-390.
- McKIM, J. M. y col. — 1975. Effects of pollution on fresh water fish. *Journal Water Poll. Control Federation*, 47 (6): 1711-1768.
- NEWMAN, M. W., S. A. MACLEAN. — 1974. Physiological response of the cunner, *Tautoglabrus adspersus*, to Cadmium. VI Histopathology. *NOAA Tech. Rep. NMFS SSRF-681*, págs.27-33.