



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN EL  
MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (BIVALVIA: MYTILIDAE) COLECTADO EN  
ZONAS COSTERAS DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA  
(Modalidad: Investigación)

MADARGELIS JOSEFINA BARRETO MARTÍNEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS.

CUMANÁ, 2011

BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN EL  
MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (BIVALVIA: MYTILIDAE) COLECTADO EN  
ZONAS COSTERAS DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA

APROBADO POR:

---

Prof. Edgar Zapata Vívenes  
Asesor

---

Jurado principal

---

Jurado principal

## INDICE

AGRADECIMIENTO .....	i
DEDICATORIA .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA .....	7
Área de estudio .....	7
Determinación de metales pesados .....	8
Extracción de la hemolinfa .....	9
Parámetros citológicos.....	10
Viabilidad celular y número total de hemocitos .....	10
Parámetros inmunológicos.....	10
Fagocitosis .....	10
Lisozimas .....	11
Estabilidad lisosomal .....	12
Peroxidación de lípidos.....	12
Determinación de grupos sulfhidrilos.....	13
Cuantificación de proteínas .....	14
Análisis estadísticos.....	14
RESULTADOS .....	- 16 -
DISCUSIÓN .....	- 20 -
CONCLUSIONES .....	- 32 -
BIBLIOGRAFÍA .....	- 33 -
APÉNDICES .....	- 43 -

## **AGRADECIMIENTO**

Al profesor Edgar Zapata, por su sabiduría, colaboración y el aporte de sus conocimientos en la realización y culminación de esta investigación, que me permite lograr esta meta.

Al laboratorio de Bioquímica, del Departamento de Biología, de la Escuela de Ciencias.

A la profesora Luisa Rojas, por su valiosa colaboración, ayuda y sabios conocimientos para lograr este gran sueño.

Al Departamento de Química de la Escuela de Ciencias de la UDO.

Al Departamento de Ciencias de los Materiales del IIBCAUDO.

A Gabriela Sánchez, por prestarme su apoyo desinteresadamente en el momento más oportuno de la investigación y por su amistad.

A Heidy Márquez y Carlos Figueroa, por su colaboración en el momento más difícil de la investigación.

Al TSU José Luís Prin.

Al Lcdo. Emilio Vásquez, de la Dirección de Ambiente de la Alcaldía de Ribero.

## DEDICATORIA

A:

Dios Todopoderoso, por darme la fuerza y el empuje para finalizar este anhelado sueño.

Mis padres, Ardobisa Martínez y Asdrúbal Barreto por creer en mí y tener toda la paciencia del mundo, este triunfo es para ustedes. Los amo.

Mis hermanos, Leomarys, Asdrúbal, Alexander, Enzo y Luis Alfredo. Este triunfo es también de ustedes. Los quiero mucho.

Mis sobrinos, Erika, Stevenson, Alexandra, Enmariangeles, Maria José, Jesús Arturo, Fransheska, Rosi y Marlon, que esto sea fuente de inspiración para cada uno de ustedes.

La familia Velásquez; Mamá Carmelina, Egges, Daisis, Nilda, Rubert, Henry, Richard, Elides, Carlos Eduardo, José Daniel, José Miguel, Alba Rosa, Danny, Ronald, Daniela Saraith y Andrea Gabriela. Gracias a todos ustedes por no permitir desmayar en este difícil camino que me tocó transitar y acogerme en su familia como parte de ella.

Mis amigas, Evelyn Cabrera, Gerardina Mazzola, Ana M. Carvajal, Inirida Pereda, Nilda Gónzales, Luzmarina Sotillo, Evelis Ortíz, Loida Bastardo, Maibys Ramos, Flor María Suárez y Floribel Rivero. Gracias por su amistad incondicional y estar siempre allí.

La Sra. Isabel Suárez, Sr. Enrique Rivero e Isamar C. Marval.

Mi amigo Richard Coronado. †

Todos aquellos que de una u otra manera forman parte de este logro.

Todos muchas gracias..!

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Posición del sitio de colecta, parámetros físico-químicos del agua de mar y talla de *Perna viridis* en las distintas localidades estudiadas. .... 8
- Tabla 2.** Longitud de onda, slit, sensibilidad y límites de detección para los metales analizados por espectrofotometría de emisión óptica acoplado a un plasma..... 9
- Tabla 3.** Metales pesados en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades costeras del estado Sucre. ....- 16 -
- Tabla 4.** Parámetros citológicos e inmunológicos en el mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del estado Sucre. ....- 17 -
- Tabla 5.** Parámetros bioquímicos en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del estado Sucre. ....- 19 -
- Tabla 6.** Coeficientes de correlación de Spearman ( $r^2$ ) entre los metales pesados y los parámetros celulares, inmunológicos y bioquímicos analizados en *Perna viridis* ..... 56
- Tabla 7.** Anexo 1. Concentraciones promedios o rangos de valores de metales pesados reportado en la literatura para *P. viridis* en distintas localidades de la geografía mundial ( $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de masa seca, PS;  $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de masa húmeda, PH)..... 57
- Tabla 8.** Anexo 2. Rangos de concentraciones de metales pesados en sedimentos superficiales en los sitios de colectas o zonas aledañas publicados por otros autores. Los análisis de Fe, Mn y Co no fueron realizados en ninguno de los trabajos. .... 58

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Localización geográfica de las localidades de muestreos: Chacopata-Guayacán, Río Caribe y San Antonio del Golfo. .... 7

**Figura 2.** Porcentaje de células con lisosomas estables en hemocitos de *Perna viridis*.- 18

-

## RESUMEN

El mejillón verde *Perna viridis* ha sido usado como organismo biomonitor en el diagnóstico de salud ambiental en ecosistemas marino-costeros. Por tal motivo se procedió a evaluar los niveles corporales de metales pesados en el bivalvo *P. viridis* en tres localidades costeras del estado Sucre, y su relación con marcadores biológicos (celulares y moleculares). Los ejemplares fueron colectados en las localidades de Chacopata-Guayacán (CG, Península de Araya), Rio Caribe (RC, Península de Paria) y San Antonio del Golfo (SAG, región sur del Golfo de Cariaco). CG y RC son zonas que presentan bancos naturales de explotación de la especie, y SAG es un área destinada recientemente a la acuicultura; esta última fue usada como área referencial. Se determinó la concentración de metales pesados en el tejido blando de cada organismo. De igual manera, fueron valorados algunos parámetros citológicos en la hemolinfa (número total de hemocitos, viabilidad), inmunológicos (fagocitosis) y estabilidad de las membranas lisosomales de hemocitos en presencia de rojo neutro. La actividad de lisozimas fue cuantificada en la glándula digestiva, y el daño oxidativo de lípidos (MDA), niveles de grupos sulfhidrilos y proteínas totales fueron valorados en el tejido blando. Los resultados muestran elevados niveles de los siguientes metales Zn, Cr y Cd en organismos provenientes de la localidad de CG, excediendo las concentraciones de Cr y Cd los valores permisibles por organizaciones internacionales (WHO, FAO). Algunos de los parámetros inmunológicos y citológicos mostraron diferencias significativas entre localidades, específicamente el número de células totales en hemolinfa fue menor en RC y CG. En estas últimas zonas los mejillones presentaron un ligero incremento en número de fagocitos con respecto a la zona referencial. El mayor porcentaje de hemocitos con membranas lisosomales desestabilizadas fue encontrado en los organismos de la localidad de CG, seguido de RC, encontrándose débil asociación con el contenido de MDA y proteínas totales; valores que podrían tener correspondencia con la acumulación corporal de metales pesados. Los resultados sugieren que la localidad CG muestra indicios de impacto por metales pesados, originados presumiblemente por actividades antrópica. Esta investigación muestra la utilidad de múltiples biomarcadores destinados a estimar el impacto de metales pesados sobre organismos centinelas en nuestras costas.

Palabras claves: Biomarcadores, Mejillón verde, Metales pesados.



## INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico en las zonas urbanas y la rápida industrialización han producido serios problemas de deterioro en ecosistemas marino-costeros, siendo éstos últimos los reservorios finales de desechos orgánicos e inorgánicos. La mayoría de los componentes orgánicos utilizados en actividades agrícolas e industriales pueden ser descompuestos fácilmente mediante actividad biológica; no obstante, los compuestos inorgánicos, en particular los metales pesados, son depositados continuamente en el lecho marino, creando la posibilidad de daños a nivel molecular y celular en la fauna circundante (Nicholson, 1999).

Los metales pesados forman parte de los elementos constituyentes del agua de mar, y se originan por los procesos de vulcanización, hidrotermalismo, erosión de rocas u otras fuentes de tipo antropogénicas que durante el ciclo biogeoquímico se interrelacionan con el ambiente (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999). La persistencia y biodisponibilidad de estos xenobióticos metálicos en el medio, aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, pueden tener consecuencias perjudiciales sobre algunas respuestas biológicas (Del Valls y Conradi, 2000; Nicholson y Lam, 2005).

Es bien conocido que la exposición prolongada a metales pesados puede causar daños a diferentes niveles de la organización biológica, desde el ámbito molecular hasta influir en cambios poblacionales en el ecosistema, alteraciones relacionadas con la alta toxicidad de tales xenobióticos. Los metales pueden inducir, de forma directa o por ciclo redox de su metabolismo, la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ERO) y otros radicales libres. Tales especies de oxiradicales podrían originar un desbalance oxidativo caracterizado por la desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos de membranas y oxidación de bases nitrogenadas contentivas en los ácidos nucleicos; esta condición es conocida como estrés oxidativo (Di Güilio *et al.*, 1995).

Al igual que otros contaminantes, los metales pesados son secuestrados dentro de los lisosomas celulares de distintos órganos y acumulados en altas concentraciones, produciendo alteraciones en la estabilidad de sus membranas, lo cual pudiera provocar la salida de enzimas hidrolíticas al citosol, induciendo así lisis celular (Moore, 1985). Los metales pesados pueden ser acumulados por los organismos marinos, en especial los que habitan en estrecha relación con el sedimento marino, tal es el caso de los mejillones. La naturaleza de alimentarse por filtración los coloca en pleno contacto con la mayoría de los contaminantes solubles, adheridos a partículas de sedimentos o acumulados en sus alimentos. Tal capacidad en mejillones sugiere considerarlos como organismos sensores de cambios ambientales relacionados con la disponibilidad de tóxicos en el medio, con referencia especial a los metales pesados. Los mejillones han sido utilizados como organismos centinelas en la evaluación de la calidad del ambiente marinos (Zapata, 2005); sin embargo, la acumulación de metales en sus tejidos blandos involucra procesos complejos donde juegan un papel importante la talla del organismo (Cossa *et al.*, 1979), factores genéticos (Frazier *et al.*, 1985), ciclos de desove (Lobel y Wright, 1982), sexo (Lauren, 2009), estacionalidad (Medina, 2010), temperatura y salinidad del medio (Phillips, 1976).

Los mejillones pueden incorporar en sus tejidos cantidades importantes de elementos metálicos presentes en el medio, sin que en principio su metabolismo se vea afectado. Su hábito bentónico, tipo de alimentación, poco desplazamiento, abundancia y la importancia económica los convierten en organismos de uso común en estudios ecotoxicológicos, con el único fin de establecer el grado de contaminación y estado de salud de los ecosistemas marinos (Nicholson, 2003). Estos organismos son capaces de acumular cantidades excesivas de contaminantes, aun por encima de los niveles ambientales, lo cual provee información sobre la fracción biodisponible. No obstante, la cuantificación de metales pesados acumulados en los organismos no siempre puede revelar una indicación razonable de las concentraciones

presentes en el ambiente, ya que va a depender de la toxicocinética del metal incorporado y al potencial para su desintoxicación. Distintas especies de mejillones, tales como *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, han sido objeto de investigaciones relacionadas con el impacto ambiental producido por la presencia de metales pesados en los sistemas acuáticos, principalmente en zonas templadas (Bryan y Langston, 1992; Pipe *et al.*, 1999); sin embargo, las especies del trópico y sub-trópico han sido poco estudiadas.

La ecotoxicología cuenta hoy en día con herramientas biológicas altamente sensibles a bajas concentraciones de sustancias químicas, denominadas biomarcadores, útiles en la predicción y alerta temprana de ambientes impactados por xenobióticos, fundamentados mayormente en ensayos subletales estáticos bajo condiciones controladas de laboratorio (Rand y Petrocelli, 1985). No obstante, su implementación en los estudios de campo, por lo menos en la región oriental de Venezuela, ha sido sumamente escasa. Se tiene información relevante relacionada con las variaciones de respuestas inmunológicas, moleculares y enzimáticas en organismos comunes de nuestros sistemas marino-costeros en presencia de distintos xenobióticos, usando bioensayos de toxicidad aguda y crónica. En su mayoría, estos ensayos ecotoxicológicos han utilizado frecuentemente especies de bivalvos tales como *Perna viridis* (Zapata, 2005), *Pinctada imbricata* (Nusetti *et al.*, 2004) y *Lima scabra* (Sánchez, 2008), resultados que proveen datos de línea basal relacionados con la estimación de las concentraciones subletales mínimas que puedan inducir alteraciones en respuestas biológicas como consecuencia de alteraciones originadas por un contaminante o mezclas de éstos.

El estudio de algunas respuestas del sistema inmune en bivalvos constituyen biomarcadores importantes en las evaluaciones de efectos inducidos por la exposición a contaminantes químicos, pudiéndose inferir sobre los mecanismos por los cuales los tóxicos alteran este sistema. Algunos índices de las alteraciones del potencial inmune

pueden incluir los cambios en el conteo total y diferencial de hemocitos, alteraciones de los mecanismos de defensa humoral y celular (Nusetti *et al.*, 2004), condiciones que incrementan la susceptibilidad del bivalvo a microorganismos oportunistas, incluyendo infecciones bacteriales y virales. Además, las altas tasas de enfermedades infecciosas observadas en algunos organismos acuáticos son argumentos sólidos que han incrementado el interés por el uso de respuestas celulares e inmunológicas como parámetros confiables en los estudios de evaluación de riesgos de impacto ambiental.

El sistema de defensa inmunológico en bivalvos está constituido por células fagocíticas y moléculas bacteriolíticas, tales mecanismos proporcionan resistencia contra enfermedades (Sminia, 1980). La exposición a contaminantes ambientales pueden alterar las funciones y el balance del sistema inmune, resultando en efectos perjudiciales, los cuales incluyen inmunosupresión, proliferación anormal celular, alteración de los mecanismos de defensa del hospedero contra patógenos (Cheng, 1988; Cheung *et al.*, 2001). Para determinar los efectos ecotoxicológicos provocados por metales pesados que pudieran no ser evidentes mediante análisis químicos, las respuestas inmunológicas mediada por los hemocitos en bivalvos puede ser un parámetro alternativo y efectivo para este tipo de monitoreo (Pipe y Coles, 1995). El sistema inmunológico puede ser más sensible a los contaminantes químicos que cualquier otro sistema funcional. Consecuentemente, han sido estandarizados protocolos experimentales para cuantificar estas respuestas inmunológicas en una gran variedad de especies de bivalvos (Sánchez, 2008).

El efecto inmune de moluscos bivalvos a nivel celular puede ser detectado por alteraciones de la estabilidad de membranas lisosomales, considerándose que el grado de desestabilización es proporcional a la magnitud del estrés (Lowe *et al.*, 1995). Una detección previa del estrés a nivel subletal en organismos marinos a través del uso de esta respuesta, puede llegar a proveer información adicional al diagnóstico del estado ambiental antes severas concentraciones de distintos xenobióticos que rompen la

dinámica del ecosistema. La determinación de la integridad de la membrana lisosomal indica posibles condiciones deletéreas ante cambios drásticos e irreversibles que ocurren en el ambiente, convirtiéndose en un marcador útil en la toma de decisiones preventivas. Este parámetro puede estimarse mediante el tiempo de retención de colorantes, tal como el rojo neutro, presentando una relación proporcional entre la reducción del tiempo de retención del colorante en células de organismos que habitan zonas impactadas por xenobióticos (Fang *et al.*, 2008), ya que se ha demostrado que la acumulación de metales pesados se lleva a cabo en compartimientos lisosomales, lo que puede afectar la integridad funcional celular (Viarengo y Nott, 1993).

La evaluación de sistemas bioquímicos, al igual que los estudios de inmunotoxicidad, provee información acerca de la toxicidad real de los contaminantes. En este sentido, la determinación de lípidos peroxidados proporciona una opción como indicador para detectar estrés oxidativo provocado por agentes contaminantes. La lipoperoxidación de membranas es provocada por la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como el anión radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), aunado a un desbalance en el estatus del sistema antioxidante (Fridovich, 1998). Las fuentes biológicas de los radicales libres son diversas, entre ellas se cuentan la sensibilización fótica de pigmentos, reacciones de oxido-reducción, biotransformación de metales de transición, ciclos de oxido-reducción de xenobióticos y fagocitosis. Estos radicales producen, además de peroxidación de lípidos de las membranas, daños a los ácidos nucleicos, inactivación de enzimas y degradación de proteínas (Winston y Di Giulio, 1991).

Las costas del nororiente venezolano se encuentran actualmente sometidas a contaminación antropogénica por afluentes urbanos e industriales, inclusive las descargas límnicas han sido señaladas como factores importantes asociados al transporte de metales pesados, desde sitios de intensa actividad industrial y minera

hasta los sedimentos de ecosistemas locales (Martínez, 2002; Martínez, 2006), haciéndose imprescindible el empleo de las especies acuáticas que pueden estimar los posibles daños en el ambiente. Por tal motivo, en esta evaluación se ha seleccionado al mejillón verde *Perna viridis* como especie centinela de contaminación. En esta especie se ha confirmado la modulación de ciertos biomarcadores bajo condiciones subletales de exposición a xenobióticos (Tovar, 2007; Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007).

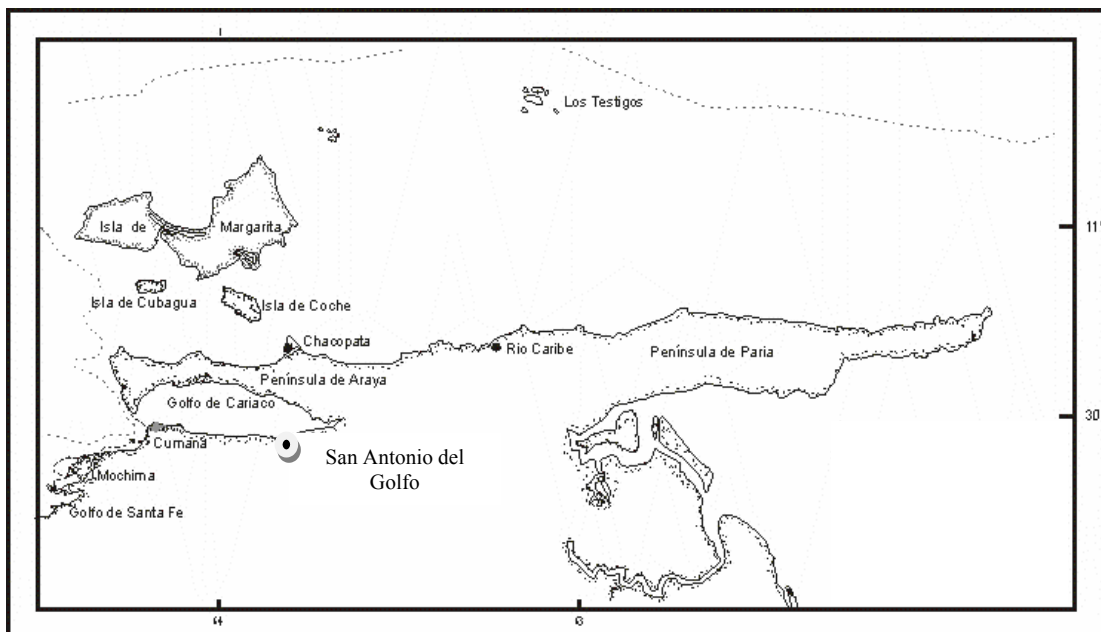
La especie *P. viridis* no es nativa de nuestras costas, llegó desde el Océano Índico, y su colonización en el estado Sucre fue observada para el año 1993 a lo largo de toda la costa norte (Agard *et al.*, 1992; Rylander *et al.*, 1996). En la actualidad se conocen muchos aspectos sobre este organismo, existiendo información relevante sobre su biología (Sreenivasan *et al.*, 1989), crecimiento instantáneo (Viñoles *et al.*, 2000), tolerancia a rangos de temperaturas y salinidad (Segnini-Bravo *et al.*, 1998) y algunos aspectos genéticos (Muhammed *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2009).

En el estado Sucre existen bancos naturales para la explotación de bivalvos, en particular las zonas de Chacopata-Guayacán y Río Caribe, los mismos producen casi dos mil quinientas toneladas al año, de las cuales casi el 70 % pertenece al mejillón verde. Adicionalmente, un sector interesado en el cultivo suspendido de mejillones han iniciado pequeños sembrados experimentales en la ensenada de Turpialito, San Antonio del Golfo y otros sitios de la costa sur y norte del Golfo de Cariaco, obteniéndose excelente resultados en su crecimiento (Tejera *et al.*, 2000; Urbano *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2006). En referencia a lo antes expuesto, en esta investigación se determinó una batería de respuestas biológicas a distintos niveles de organización (celular y molecular) en el mejillón verde *P. viridis* colectado en distintas localidades costeras del estado Sucre, a bien de establecer posibles alteraciones en parámetros bioquímicos y celulares, y su relación con la carga corporal de metales pesados, que permitan visualizar los diferentes grados de contaminación en las zonas de estudios.

## METODOLOGÍA

### Área de estudio

Los ejemplares del mejillón verde *Perna viridis* fueron colectados en tres localidades costeras del estado Sucre, al noreste de Venezuela (Fig. 1): Chacopata-Guayacán (CG) localizada en la región norte de la Península de Araya, Río Caribe (RC) situada en extremo noreste de la Península de Paria, y San Antonio del Golfo (SAG) ubicada en la costa sureste del Golfo de Cariaco. CG y RC son zonas a mar abierto que presentan bancos naturales extensamente explotables de la especie, sin embargo SAG es un área que actualmente ha sido destinada a la actividad de cultivos de mejillones a baja escala; esta última localidad fue usada como área referencial. La captura de los bivalvos se realizó manualmente mediante buceo a profundidades de 1 a 2 metros. En cada estación, se seleccionaron entre 60 a 80 organismos con tallas entre 7,5-9,2 cm, sin distinción de sexo.



**Figura 1.** Localización geográfica de las localidades de muestreos: Chacopata-Guayacán, Río Caribe y San Antonio del Golfo.

Algunos datos sobre la ubicación geográfica del sitio de muestreo, parámetros físico-químicos del agua de mar y talla de *P. viridis* en las distintas localidades estudiadas se muestran en la tabla 1. Los parámetros ambientales, tales como temperatura, salinidad y pH fueron estimados in situ a través de instrumentos de campo (termómetro ambiental YSI, refractómetro y pH-metro). Los ejemplares fueron transportados hasta el laboratorio en cavas de aislamiento térmico con agua proveniente del sitio de captura con aireación continua. Los epibiontes de las conchas fueron removidos manualmente. Los organismos fueron mantenidos en acuarios bajo condiciones controladas de salinidad ( $36 \pm 0,1$  UPS), pH ( $7,7 \pm 0,2$ ), temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), oxigenación (90-95%) durante 2-3 días. En este periodo los organismos fueron restringidos de alimento.

**Tabla 1.** Posición del sitio de colecta, parámetros físico-químicos del agua de mar y talla de *Perna viridis* en las distintas localidades estudiadas.

Características	GC	RC	SAG
Posición	11°35' N y 64°00' O	10°42' N 63°07' O	10°42' N 63°07' O
Temperatura (°C)	27,01	26,50	26,90
Salinidad (UPS)	37,9	38,0	37,0
pH	7,85	7,77	7,55
Talla (mm)	8,1±1,2	8,6±0,8	7,9±1,9

### Determinación de metales pesados

La determinación de metales pesados se realizó en un espectrofotómetro de emisión óptica, inductivamente acoplado a un plasma (IPC-OES) (marca Perkin Elmer, modelo 5300), siguiendo la metodología propuesta por Rojas et al. (2002). Para ello se pesó todo el tejido blando, los mismos fueron colocados en fiolas de 25 ml para su deshidratación a  $60^\circ\text{C}$  durante tres días, o hasta presentar peso constante. Pasado este tiempo se pesaron y se procedió a realizar una pre-digestión por 24 horas



con 10 ml de ácido nítrico concentrado a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras fueron digeridas a 60°C por 4 horas, y luego a 80°C por 2 horas. Posteriormente, se adicionaron 10 ml de agua desionizada, se filtró sobre papel Watman N° 42 y se completó hasta un volumen final de 25 ml con agua desionizada. Las concentraciones de los metales pesados (cobre, hierro, zinc, cromo, cadmio y plomo) en las muestras se estimaron a partir de curvas patrones. La longitud de onda, slit, sensibilidad y límites de detección se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Longitud de onda, slit, sensibilidad y límites de detección para los metales analizados por espectrofotometría de emisión óptica acoplado a un plasma.

Metal	$\lambda$	S	Sen	LMD
Zinc	213,9	0,7	0,018	0,002
Cobre	324,7	0,7	0,08	0,002
Cadmio	228,8	0,7	0,03	0,001
Cromo	357,9	0,7	0,08	0,003
Hierro	251,0	0,2	0,04	0,002
Plomo	283,3	0,7	0,45	0,03

$\lambda$ : Longitud de onda (nm), S: Slit (nm), Sen: sensibilidad (mg/l), LMD: límites mínimos de detección (mg/l). Los resultados fueron expresados en microgramos de metal por masa seca total.

### **Extracción de la hemolinfa**

Para la obtención de la hemolinfa se procedió a mantener las valvas del organismo abiertas con un varilla de vidrio durante de 10 a 30 segundos. La hemolinfa fue extraída por punción directa al pie y seno venoso; este último órgano se encuentra ubicado cerca de la porción fásica del músculo abductor. Para tal fin se usó una jeringa hipodérmica de 1 ml de capacidad, esterilizada, con aguja calibre 20 (TR-Gamma-Bulkwan, Medical mc). El volumen de hemolinfa extraído (~0,5 ml), conteniendo la jeringa 0,5 ml agua de mar estéril, filtrada a miliporo (45  $\mu$ m), fue posteriormente transferido a tubos de microcentrífuga eppendorf de 1,5 ml de

capacidad, manteniéndose a una temperatura de aproximadamente 10°C. Luego se centrifugó a 900 g durante 10 minutos a 10 °C. Se tomó la fracción precipitada y finalmente se resuspendió en un mililitro de agua de mar con EDTA 4 mmol/l. Esta fracción fue usada para determinar los parámetros citológicos y funciones inmunológicas.

### **Parámetros citológicos**

#### **Viabilidad celular y número total de hemocitos**

La viabilidad celular y la cuantificación del número de células totales por mililitro se determinaron por tinción diferencial con el colorante vital eosina yellow (0,1%) en agua de mar estéril, y posteriormente filtrado en papel Whatman N° 1 (Nicholson, 2003). Se tomaron 100 µl de la suspensión final de hemocitos y se mezclaron con un volumen igual del colorante, se resuspendió y se tomó luego una alícuota de 10 µl para hacer el conteo celular en un hemocitómetro por microscopía de luz (magnificación de 400X). Se contaron 100 células, diferenciando las vivas de las muertas porque estas últimas toman la coloración en su citoplasma. El número total de hemocitos por mililitro se determinó en los cuatro cuadrantes de la cámara y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Número de células/ml= (X/2) 10<sup>4</sup> (Goven *et al.*, 1996).

### **Parámetros inmunológicos**

#### Fagocitosis

Para evaluar la actividad fagocítica de los hemocitos se ajustó el número total de células a una concentración de 2x10<sup>6</sup> hemocitos/ml. Se Empleó como antígeno a *Saccharomyces cerevisiae*, inactivada por calor (stock 5 mg/ml en agua de mar

estéril), la cual se filtró en papel Whatman N° 1, aplicándole vacío, con la finalidad de eliminar los aglomerados y disponer de levaduras separada. Del filtrado de levaduras se tomaron 200  $\mu$ l y se diluyeron en 3 ml de agua de mar filtrada. En un tubo de eppendorf de 1,5 ml de capacidad se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión de hemocitos con un volumen igual de la suspensión final de levaduras. Se mezcló suavemente y luego se centrifugó a 1 000 g por 5 minutos. Las muestras centrifugadas se incubaron por un periodo de 24 a 48 h a 4 °C para que ocurriera la fagocitosis. Culminado el período de incubación, se retiraron 100  $\mu$ l de sobrenadante y se descartaron. Al precipitado celular se le añadieron 100  $\mu$ l del azul de tripano 0,4% m/v y se resuspendió suavemente con una pipeta Pasteur plástica. Finalmente se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se colocó en un hemocitómetro para su observación y conteo en un microscopio de luz a 400X de magnificación. En el que se determinó el porcentaje de fagocitos y se contaron 100 células viables por cada muestra, considerándose como fagocitos a los hemocitos que contenían en su citoplasma al menos una levadura o restos de su digestión.

### **Lisozimas**

El protocolo empleado para evaluar la actividad de la lisozima en la glándula digestiva de *P. viridis* fue basado en la lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus*, empleando lisoplasmas de agarosa. Para la preparación del agar se realizó una adaptación de la metodología de Goven *et al.*, (1996). Se empleó para la preparación del gel: buffer fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 67 mmol/l a pH 6,0; agarosa (tipo II) 1%, cloruro de sodio (NaCl) 0,1% y *M. lysodeikticus* 0,4 mg/ml (Todos los reactivos fueron comprados a Sigma Chemical Co.). Se añadieron todos los reactivos en el buffer fosfato pH 6,0 y luego se colocaron volúmenes de 8,0 ml de la solución gel en placas de Petri plásticas (5 cm de diámetro), se dejaron solidificar y se guardaron a 8°C hasta su posterior uso. A cada placa de agar se les perforó un orificio de 5 mm de diámetro, distribuidos simétricamente en cuatro puntos.

A un grupo de 12 bivalvos por cada localidad se les extrajeron las glándulas digestivas para ensayos de lisozimas. Seguidamente se pesaron y homogenizaron en buffer fosfato 100 mmol/l pH 6,24 a 4°C, en una relación peso-volumen 20%, usando un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogenizado resultante se centrifugó a 2 000 g por 10 minutos, y el sobrenadante obtenido se empleó como fuente directa de lisozima. Un volumen equivalente a 40 µl del extracto de lisozima se sembró, bajo condiciones estériles, en cada orificio de la lisoplaca. Las lisoplacas fueron incubadas a 37°C en una estufa durante 48 horas. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos y se compararon con los producidos por el estándar de lisozimas de clara de huevo (HEL), utilizando un análisis de regresión lineal según la siguiente ecuación:  $HEL (\mu\text{g/ml}) = \text{Antilog } 10 [a + b (\text{diámetro en mm})] \times 10$ .

#### Estabilidad lisosomal

La hemolinfa colectada fue transferida a un tubo siliconizado, y se conservó por un máximo de 3-5 minutos. Posteriormente, se transfirieron 40 µl del contenido del tubo a la lámina y se mezclaron con 40 µl de una solución rojo neutro disuelto en dimetil sulfóxido durante 15 minutos. Todo esto realizado en cámara oscura. Las observaciones fueron realizadas en microscopia de luz (400X) durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Se cuantificó el porcentaje de células dañadas versus no dañadas (Lowe y Pipe, 1994).

#### **Peroxidación de lípidos**

La lipoperoxidación se determinó por el revelado de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Nuseti *et al.*, 2001). El principio de este ensayo es medir la formación de uno de los principales productos de la peroxidación, el malonaldehído (MDA). Los tejidos blandos de animales completos fueron homogenizados a una velocidad menor a 12 000 rpm por 20 segundos, en frío. La

proporción del homogenizado fue de 50 mg/ml, en una solución tampón de imidazol-HCl 50 mmol/l a 15 °C. El homogenizado se colocó en una centrífuga refrigerada Eppendorff a 1 000 g por 20 minutos. Una cantidad de 250 µl del homogeneizado se colocó en tubos eppendorf y fueron incubados en baño de agua a 37°C, con agitación constante durante 10 minutos. Se adicionaron a cada tubo 250 µl de ácido tricloroacético 12,5%, HCl 0,8 mol/l y 500 µl de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%. Estos fueron incubados en un baño de agua a 90°C con agitación constante por 30 minutos. Los tubos fueron retirados y colocados en baño de hielo por 10 minutos, centrifugados luego a 1 500 g durante 10 minutos a 4°C y transferidos los sobrenadante para su posterior medición. La absorbancia de las muestras fue medida a 535 nm con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de MDA se calculó usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar. Los valores fueron expresados en nanomoles de MDA y normalizados por miligramos de proteínas.

### **Determinación de grupos sulfhidrilos**

La concentración de grupos sulfhidrilos se determinó por el método de Ellman(1958). Para ello se pesó todo el tejido y se homogenizó en 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l a pH 7,5 y se centrifugó a 2 200 g por 15 minutos. Del sobrenadante se tomó 50 µl de las muestras. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: solución de DTNB (Stock) constituido de 50 mmol/l de acetato de sodio y 2 mmol/l de DNTB en 100 ml de agua destilada, buffer tris 100 mmol/l. En la cubeta experimental se añadieron 500 µl de DNTB, 250 µl de agua destilada y 200µl de buffer tris y 50 µl de la muestra y posteriormente se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se leyó a una absorbancia a 412 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto y se utilizando glutatona reducida como estándar.

## **Cuantificación de proteínas**

La concentración se determinó por el método de Lowry et al., 1951. Para ello se pesó todo el tejido, se homogenizaron en 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l a pH 7,5 y centrifugados a 2 200 g por 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 20  $\mu$ l de la muestra. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: El reactivo A compuesto de 10 g de carbonato de sodio en 500 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH 100 mmol/l) y el reactivo B compuesto de 0,5 g de tártaro de sodio/potasio en 30ml de agua destilada y luego se disolvió en 0,25 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) hasta un volumen de 50ml.

En la cubeta experimental se colocaron 880  $\mu$ l del reactivo 1(solución cobre alcalina) el cual está compuesto de 50 ml del reactivo A con 1ml del reactivo B, 20  $\mu$ l de la muestra y se mezclaron bien, luego se incubaron por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l del reactivo 2, compuesto de 50 ml del reactivo Folin-Ciocalteu en 100 ml de agua destilada y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se midieron con una absorbancia a 650 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto y se utilizó albúmina de suero de bovino como estándar. Los resultados fueron expresados en gramo de masa húmeda (g.m.h).

## **Análisis estadísticos**

Los parámetros citológicos (viabilidad y número total de hemocitos), así como las funciones inmunológicas de tipo celular (fagocitosis) y de tipo humoral (lisozimas) fueron analizados comparando las localidades en estudio. Para tal propósito se empleó un ANOVA de una vía con réplica (Sokal y Rohlf, 1981). Se aplicó una prueba de contraste múltiple de Tukey cuando se hallaron diferencias significativas en la prueba “a priori”. En adición, se estimó la asociación entre los

parámetros moleculares y celulares versus el contenido corporal de metales pesados mediante un análisis de correlación de Spearman.

## RESULTADOS

En la tabla 3 se muestran las concentraciones de metales pesados contenidos en el tejido blando de *P. viridis* colectado en las localidades de Chacopata-Guayacán (CG), Río Caribe (RC) y San Antonio del Golfo (SAG) en el estado Sucre. Los niveles de la mayoría de los metales esenciales presentaron variaciones entre los organismos colectados, observándose los mayores promedios de cobre (Cu) y hierro (Fe) en los ejemplares provenientes de las balsas de cultivos de la zona de SAG (zona referencial), zinc (Zn) y cromo (Cr) estuvieron incrementados en los mejillones de CG. Del mismo modo, las concentraciones de los metales no esenciales como cadmio (Cd) y plomo (Pb) fueron superiores en los ejemplares colectados en las costas de CG.

Tabla 3. Metales pesados en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades costeras del estado Sucre.

Metal	Chacopata-Guayacán	Río Caribe	San Antonio del Golfo	Fs	P
Cu	8,17 ± 4,03*	5,67 ± 0,69*	11,11 ± 1,26	3,08	0,059
Fe	103,18 ± 92,69	51,1 ± 10,31*	138,41 ± 15,83	3,07	0,061
Zn	51,33 ± 9,98*†	37,78 ± 10,23*	13,20 ± 7,61	9,55	0,001
Cr	5,84 ± 2,73*†	1,36 ± 0,45	3,60 ± 1,05	3,72	0,035
Cd	5,58 ± 1,62*†	0,12 ± 0,21	0,08 ± 0,23	9,37	0,001
Pb	0,12 ± 0,20*	ND	ND	5,12	0,012

\*Representa diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) con respecto a la zona de referencia. †Muestra valores no permisibles según organizaciones internacionales: WHO (World Health Organization) y FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Los datos se expresan en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de metal por gramo de masa seca (media  $\pm$  desviación estándar).



En CG, los niveles de Zn, Cd y Cr en *P. viridis* exceden los valores permisibles establecidos por agencias ambientales internacionales para organismos que habitan ecosistema marino-costeros (WHO, 1987); sólo los niveles de Pb fueron considerados relativamente bajos (0,12 µg/g), y en organismos provenientes de RC y SAG se registraron niveles por debajo del índice de detección (<0,03 µg/g).

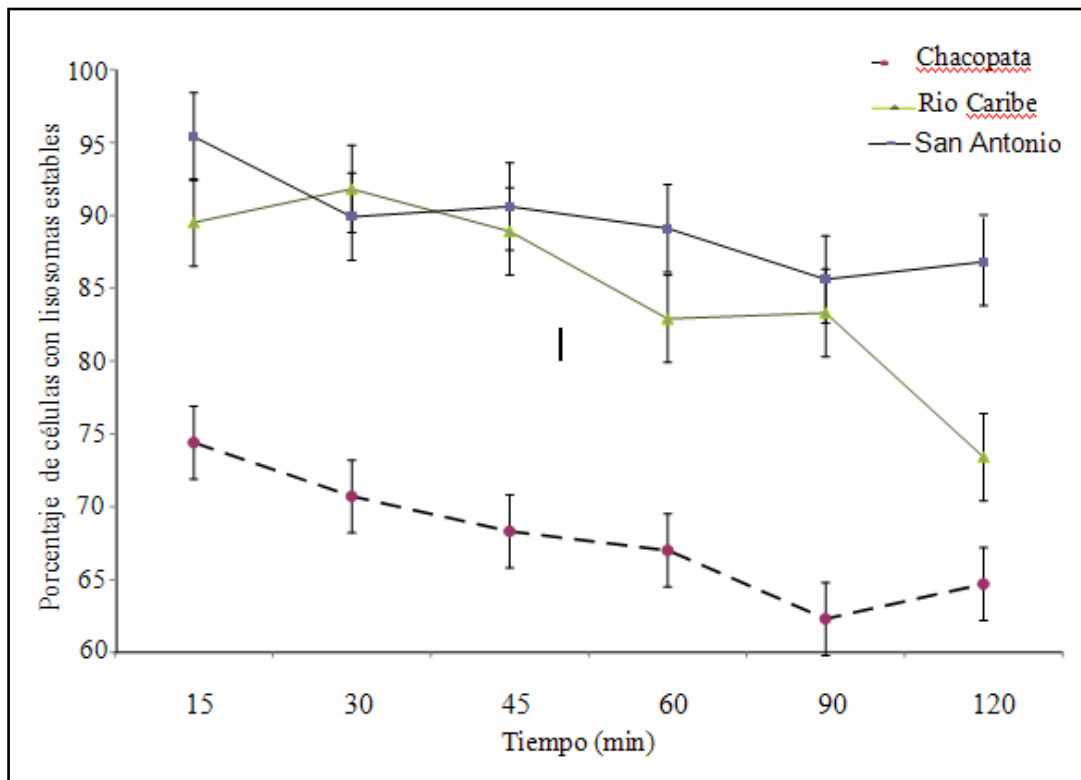
Tabla 4. Parámetros citológicos e inmunológicos en el mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del estado Sucre.

Parámetros	Chacopata-Guayacán	Río Caribe	San Antonio del Golfo	Fs	P
Viabilidad 1	79,60 ± 24,39	89,40 ± 6,02	78,50 ± 15,14	1,30	0,30
NTH 2	1,69 ± 0,27*	1,58 ± 0,24*	2,02 ± 0,54	3,59	0,04
Fagocitosis 3	5,57 ± 2,17*	6,79±1,52 *	4,51 ± 1,50	4,23	0,02
Lisozima 4	0,85 ± 0,05	0,85 ± 0,06	0,82 ± 0,04	1,89	0,17

\*Representa diferencias significativas a un  $\alpha=0,05$ . Las variables se encuentran expresadas en: 1porcentaje de viabilidad; 2Número total de hemocitos (x106); 3 porcentaje de células fagocíticas; 4 µmoles de enzima/gramo de masa húmeda.

Los parámetros celulares e inmunológicos cuantificados en *P. viridis* se presentan en la tabla 4. La viabilidad celular en hemocitos no presentó variación estadística entre los organismos colectados inter-localidades, oscilando sus promedios entre 78,50-89,40%, con un rango desde 70 a 100%. Con respecto al número total de hemocitos los menores registros se observaron en los mejillones de CG y RC en comparación con la zona referencial de SAG (2,02x105cel/ml). El porcentaje de fagocitos fue significativamente mayor en los organismos provenientes de CG y RC, con respecto a la estación referencial (SAG). Adicionalmente, una ligera elevación en la actividad de lisozimas en la glándula digestiva fue observada en los organismos de RC, pero sin ninguna significancia estadística ( $p>0,05$ ).

En la figura 2 se muestran las variaciones en el porcentaje de hemocitos con lisosomas estables en *Perna viridis* en las diferentes áreas de colecta. El porcentaje de células con reducida capacidad de retener en sus compartimientos lisosomales el rojo neutro fue significativamente alta en los organismos colectados en CG (Fs=3,59; p<0,05), observándose efectos celulares en los primeros 15 minutos de ensayo, obteniéndose ~25,60% de los hemocitos afectados. Consecuentemente, sus valores incrementaron hasta alcanzar un ~45,30% de hemocitos dañados durante 2 horas. Los valores promedio mínimos de la localidad de RC fueron alcanzado en los 120 minutos (~26,60%). No obstante, la mayor estabilidad lisosomal fue encontrada en los organismos de SAG, evidenciándose un rango de estabilidad del 86,80-95,40% durante el transcurso de ensayo.



**Figura 2.** Porcentaje de células con lisosomas estables en hemocitos de *Perna viridis*.

El tiempo en el cual se observa daño en el 50% de las células circundantes no pudo ser alcanzado durante 120 minutos, lo que sugiere un buen estado de salud aparente, al menos en los mejillones colectados en RC y SAG.

Los biomarcadores moleculares examinados muestran concentraciones de proteínas totales y grupos –SH elevadas en los mejillones cultivados en SAG, lo que demuestra su estado nutricional y sus niveles de antioxidantes (tioles). Contrariamente, los niveles de malondialdehído, un marcador de daño oxidativo, se presentan incrementados en los mejillones de GC y RC (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros bioquímicos en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del estado Sucre.

Localidad	Chacopata	Río Caribe	San Antonio	Fs	P
Proteínas 1	19,68 ± 4,92	15,45 ± 5,49	22,34 ± 6,93	0,70	0,503
Grupos tioles 2	0,35 ± 0,13*	0,12 ± 0,13*	0,72 ± 0,25	13,27	0,001
Malonaldehído 3	1,54 ± 2,03	1,13 ± 0,56	0,90 ± 0,30	0,97	0,388

\*Representa diferencias significativas a un  $\alpha=0,05$ . Expresados en: 1 mg proteínas/gramos de masa húmeda; 2  $\mu$ moles de –SH/mg proteínas; 3 nmoles de MDA/mg de proteínas.

Las asociaciones significativas entre los metales pesados y los marcadores biológicos cuantificados fueron evidenciadas entre los niveles de Cu/viabilidad celular (-0,60), Zn/grupos tioles (0,51), Cd/grupos tioles (-0,45), Cr/MDA (0,58) y Cd/desestabilización lisosomal (-0,40) (Tabla 6).

## DISCUSIÓN

Los resultados revelan elevados niveles corporales de metales pesados, especialmente Zn, Cr y Cd, en el mejillón verde *Perna viridis* proveniente de la zona de Chacopata-Guayacán (CG), presentando correspondencia con alteraciones en la estabilidad lisosomal y niveles de lipoperoxidación. La presencia de altas concentraciones de metales acumulados en los tejidos blandos del mejillón verde, con consideración especial al Cd, asociada a una reducida estabilidad lisosomal en hemocitos, permite evidenciar la disponibilidad de tales elementos en esa localidad CG de muestreo y sus efectos celulares. Adicionalmente, las alteraciones en particulares marcadores biológicos entre los mejillones de las tres localidades evaluadas, aunados a los niveles corporales de metales de origen antropogénico, permite inferir que existe un ligero gradiente de contaminación en el siguiente orden: Chacopata-Guayacán (CG)>Río Caribe (RC)> San Antonio del Golfo (SAG).

Los ejemplares de *P. viridis* presentaron niveles de los metales esenciales (Cu y Fe) que estuvieron dentro de los rangos reportados para organismos de áreas no contaminadas, encontrándose los mayores promedios en los mejillones cultivados en SAG. Al menos para el Cu, la Organización Mundial de la Salud (WHO) considera que los niveles corporales para organismos marinos deben ser menores a 30 µg/g de tejido seco (Tabla 7, Anexo 1). Los valores encontrados en *P. viridis* en SAG posiblemente se encuentran asociados a la disponibilidad del metal en el medio de cultivo, aunado a los requerimientos metabólicos del organismo para mantener la tasa de crecimiento, reproducción y desove en siembras de suspensión. Concentraciones similares de Cu y Fe han sido señaladas en distintos órganos para especies afines, tal es el caso de *P. perna* cultivada experimentalmente en la ensenada de Turpialito del Golfo de Cariaco (Castillo *et al.*, 2005). Estos autores reportan concentraciones de Cu y Fe en músculo (158,69 y 61,23 µg/g) y gónadas (7,17 y 6,61 µg/g), respectivamente. Como nota interesante, investigaciones anteriores realizadas en las

zonas de Chacopata y RC muestran rangos de Cu y Fe (1,70-2,60 y 1,70-2,10  $\mu\text{g/g}$ ) de masa húmeda respectivos, relativamente menores en contraste con este estudio (Rojas *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2005).

Las descargas de Cu y Fe al mar presentan como fuentes principales a las actividades mineras, refinera, tratamiento y en pinturas para barcos. A pesar que el Cu es un elemento esencial que eficientemente es regulado a bajas concentraciones, existen evidencias experimentales de que un considerable número de especies de bivalvos presentan sensibilidad a niveles de 1–10  $\mu\text{g/l}$  (Bryan y Langston, 1992). Diversos autores han señalado que *P. viridis* es una buena especie para monitorear contaminación por metales esenciales en el medio acuático (Phillips, 1976; Phillips, 1985; Chidambaram, 1991). De igual forma, otros bivalvos abundantes en la región han sido usado como organismos sensores de contaminación ambiental, como es el caso del guacuco *Tivela mactroides*. En este organismo, al igual que *P. viridis*, se ha detectado una relación estrecha entre los niveles del Cu en los tejidos y el sedimento donde habita (Acosta *et al.*, 2006), aunque su contenido corporal puede variar con la estacionalidad y disponibilidad en el medio (Medina, 2010).

Los niveles de Fe reportados para las tres localidades muestran promedios incrementados si se comparan con trabajos en otras zonas a nivel mundial (Tabla 7, Anexo 1). Es conocido que el Fe es uno de los elementos trazas esenciales que juega un rol fundamental en muchas reacciones bioquímicas, actuando como cofactor enzimático, transporte de electrones en citocromos, activación del oxígeno mediante oxidasas y oxigenasas, y transporte de oxígeno (Almeida *et al.*, 2007). El Fe se encuentra en altas cantidades en sedimentos, aunque normalmente en forma insoluble; sin embargo, debido a complejas reacciones que se suceden de forma natural en el mar, se pueden producir formas solubles (Bonilla *et al.*, 1995). La determinación de Fe dentro de la evaluación

ecotoxicológica inter-localidades fue considerada, ya que la zona oriental de nuestro país, en especial el estado Sucre, se encuentra influenciada por las descargas del río Orinoco y sus afluentes, cauces que transportan cantidades significativas del metal hasta nuestros ecosistemas.

En *P. viridis*, el Fe puede ser eficientemente acumulado en presencia de concentraciones subletales bajo bioensayos de exposición, inclusive cuando son pre-expuestos a otros metales. Zapata-Vívenes y Nusetti (2007) reportan que este organismo puede acumular en la glándula digestiva entre 180,0 y 249,6 µg de Fe/g masa seca, en organismos expuestos a concentraciones de 200 y 500 mmol/l del metal, mezclado con ascorbato 300 mmol/l en agua de mar, durante una semana, en comparación a los organismos controles (92,7-96,0 µg/g masa seca). Tsangaris *et al.* (2007) señala que en sedimentos de la bahía de Larimna (Grecia), impactada por descargas de efluentes de plantas de amalgama hierro-níquel se han reportados valores para *P. viridis* en un intervalo de 824-1 082 µg/g.

Es conocido que elevadas concentraciones de Cu y Fe pueden afectar negativamente la fisiología celular de forma independiente, permitiendo la formación de especies reactivas del oxígeno, mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Fridovich, 1998). Estos radicales libres son responsables de alteraciones moleculares y estructurales de macromoléculas de importancia biológica que incluyen la peroxidación de lípidos de membrana, degradación de proteínas y oxidación de bases nitrogenadas (Wiston y Di Giúlio, 1991).

El zinc se encuentra de forma natural en el aire, agua y suelo, pero las concentraciones están aumentando por causas no naturales, a través de las actividades humanas. La mayoría del zinc es adicionado durante actividades industriales, como es la

minería, la combustión de carbón y residuos y el procesado del acero. La producción mundial de zinc está todavía creciendo. En algunas especies parece existir una relación entre los valores de Zn y el tamaño del animal, lo que puede significar requerimientos metabólicos diferentes entre individuos jóvenes y adultos (Kennish, 1997). Los valores de Zn en los ejemplares provenientes de CG, están ligeramente por encima de los valores permisibles, lo que podría indicar concentraciones de alarma sobre la entrada de este metal por influencia antropogénica.

El Cr es un metal encontrado en el ambiente en dos formas diferentes, trivalente y hexavalente. La forma hexavalente es más soluble, tóxica y de mayor interés en el ambiente, originada en procesos industriales del papel y cartón, petroquímicos, compuestos orgánicos, soda cáustica, abonos, refinerías, metalúrgica, metales diferentes al hierro, industria de autos y aviones, vidrio, cemento, asbesto, textiles, cueros, plantas a vapor, pigmentos, pinturas, cerámicas, fungicidas y ladrillos a prueba de fuego (Bonilla *et al.*, 1995; Bonilla *et al.*, 1998). El Cr es un metal muy abundante en la superficie terrestre y es considerado como potencialmente tóxico, provocando daños a los organismos marinos, e incluso a seres humanos por transferencia alimenticia. El contenido de Cr en los sedimentos marinos costeros es mayor que en los de mar abierto (Bonilla y González, 1992) y su toxicidad y/o letalidad puede ser alcanzada a concentraciones relativamente bajas. Se ha determinado que la concentración letal media a 96 horas para *P. viridis* en presencia de Cr es de 2,27 µg/l (1,94-2,70 µg/l) (Vijayavel *et al.*, 2007). Es conocido que el Cr, al igual que otros metales, puede causar estrés oxidativo dependiendo de su concentración, aunado a daño directo sobre el ADN y perturbación de la expresión genética en diversas especies acuáticas (Roling *et al.*, 2006).

Los valores de Cd en la zona de CG son elevados. Se ha considerado que este metal es un contaminante reciente, el mismo es utilizado en numerosas actividades industriales. A

nivel molecular, el Cd puede competir en sistemas biológicos con el Zn, Cu y Ca por sitios de unión de macromoléculas, esta unión afecta la función de enzimas de cadenas transportadoras de electrones mitocondrial, exacerbación de especies reactivas del oxígeno y alteraciones en adaptaciones moleculares a anoxia (Tovar, 2007; Zapata, 2005). El Cd es considerado como uno de los elementos químicos más biotóxicos (especialmente en su forma  $Cd^{2+}$ ) en los ecosistemas marinos, a los que penetra por deposición atmosférica, por la descarga de diversos afluentes, bioacumulación y de la escorrentía límnic (Sadiq, 1992).

La principal utilización de Cd en la industria es en la fabricación de acumuladores, pigmentos y estabilizantes. Se ha determinado que la exposición previa a metales puede facilitar su absorción y acumulación en *P. viridis* (Blackmore y Wang, 2002). Es presumible que descargas constantes del metal al medio, produce su incorporación a tejidos de los bivalvos, sin efectos externos visibles. No obstante, se ha demostrado que niveles subletales de Cd pueden alterar las funciones de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, tales como la piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, respiración mitocondrial (Citocromo C oxidasa) y actividad antioxidante (Catalasa) (Tovar, 2007), así como cambios negativos en la tasa de respiración, crecimiento, entre otros (Narváez *et al.*, 2005).

Los valores de Pb encontrados en mejillones de las localidades de CG y RC son considerados menores en comparación con los resultados encontrados por Laurent (2009) y Rojas *et al.* (2005), para la mismas zonas de muestreos, y costas cercanas como San Juan de las Galdonas en la Península de Paria (Márquez *et al.*, 2006). En estas zonas, el Pb se encuentra en múltiples formas químicas, aunque su mayor parte se encuentra en forma de especies inorgánicas de origen litogénico (Bonilla *et al.*, 1995). El origen de este metal en nuestros ecosistemas es reciente, generalmente proveniente de vertidos directos de gasolina y lubricantes usados de motores. La zona de CG presenta un importante tráfico de



vehículos marítimos, debido a la pesca artesanal, lo que podría constituir un foco de contaminación por Pb (Acosta y Lodeiros, 2004).

Al contrastar los datos publicados por recientes investigaciones relacionadas con metales pesados en *P. viridis* en localidades regionales y mundiales, se puede considerar que muestran cierto grado de similitud a reportes en áreas tales como Karnataska (India) y ciertas zonas de las costas del Golfo de Tailandia, caracterizadas por poseer bajos niveles de contaminación con tales xenobióticos. Excepcionalmente, los valores de Cr y Cd en la Zona de CG superan, los reportes de áreas costeras con altos índices de contaminación, tales como Gujarat Mocha (Tailandia) y la bahía de Hong Kong (China) (Tabla 7, Anexo 1).

En general, los niveles de metales pesados en mejillones pueden tener correspondencia al contenido de xenobióticos metálicos en sedimentos marinos de nuestra región oriental; en los mismos se han observado incrementos considerablemente en los últimos años, como lo demuestran los trabajos de calidad ambiental llevados a cabo por Bonilla (1999), Martínez (2002), Martínez (2006), Márquez *et al.* (2005) y Márquez *et al.* (2006), estos autores revelan concentraciones de algunos metales que superan los valores permisibles. Por tal motivo, los reportes de metales pesados corporalmente acumulados en *P. viridis* de la zona de CG pueden ser justificados por los niveles elevados en su entorno. Algunos trabajos han mostrado los promedios y/o rangos referenciales de metales pesados contentivos en sedimentos superficiales analizados por distintos autores en los sitios de colectas o en zonas aledañas a nuestro estudio (Tabla 8, Anexo 2).

Las concentraciones corporales de Cd y Pb en el mejillón de la localidad de CG pueden estar originadas por continuos derrames de combustibles, aceites hidráulicos y de motores de embarcaciones pesqueras, frecuentemente observados en estaciones de servicios

aledañas al sitio de colecta. Se conoce que estos derivados del petróleo poseen excedidas concentraciones de metales pesados (Nusetti *et al.*, 2005), además de diversos xenobióticos orgánicos, que pueden quedar disponibles a la biota circundante. Los efectos de tales xenobióticos en bivalvos han sido conocidos, tanto a nivel celular y bioquímico, mediante la realización de bioensayos de toxicidad subletal bajo condiciones controladas de laboratorio (Nusetti *et al.*, 2004; Sánchez, 2008).

Los parámetros celulares e inmunológicos presentaron variaciones en los organismos que habitan las zonas de CG y RC, especialmente se evidenció una reducida cantidad de hemocitos por mililitro de hemolinfa con respecto a la zona control. A pesar que no se han planteado rangos referenciales en tales parámetros que discriminen a organismos sanos de contaminados, se tiene información que una gran variedad de agentes contaminantes pueden modular las funciones normales del sistema inmunológico en moluscos bivalvos (Pipe *et al.*, 1999, Livingstone *et al.*, 2000). Por lo general, la exposición crónica, en cortos o largos periodos, de metales pesados y otras sustancias orgánicas tales como hidrocarburos aromáticos, pesticidas y bifenilos policlorados, ejercen efectos negativos sobre la viabilidad, número de hemocitos y la actividad fagocítica de los hemocitos (Nusetti *et al.*, 2004).

En los ejemplares de CG y RC se observó una reducida cantidad en el número de células circundantes en hemolinfa. Sin embargo, el porcentaje de fagocitos estuvo incrementado en los organismos de tales localidades. De manera similar, algunos cambios en los parámetros inmunológicos han sido observados en el mejillón *Mytilus edulis* trasplantado a una zona impactada por petróleo crudo, producto de un derrame en la línea costera de la Bahía de Milford Haven (Gales), en Reino Unido (Dyrynda *et al.*, 2000). Inicialmente, una severa inmunosupresión ocurrió en organismos de sitios impactados, debido a altos niveles de hidrocarburos aromáticos acumulados, observándose, una

reducida acción fagocítica, producción de anión superóxido y variación entre el número total y diferencial de células totales de organismos colectados en zonas con un gradiente de contaminación. Sin embargo al reducirse temporalmente las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio, la actividad inmune incrementó a niveles similares a los observados en mejillones del sitio de referencia (Dyrynda *et al.*, 1997).

En estos resultados no se observaron variaciones en la actividad de lisozimas en los mejillones de localidad en estudio, lo que demuestra la efectividad del sistema de defensas no específico humoral en estos organismos, a pesar de las concentraciones de metales acumulados. La actividad de las lisozimas ha sido usada como biomarcador en inmunoensayos de biotoxicidad de xenobióticos. Su acción bacteriolítica ha sido ampliamente examinada en moluscos expuestos a concentraciones subletales de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo metales pesados. Muchos autores han encontrado efectos tóxicos agudos de distintos metales (Cu, Zn, Hg) sobre la actividad de la enzima en mejillones (Pipe *et al.*, 1999).

El mayor porcentaje de células en lisosomas estables por el rojo neutro y su relación con los máximos niveles de metales pesados acumulados fue presentado en los mejillones de CG, lo que permite inferir sobre el grado de contaminación en esta zona costera. Este tipo de biomarcador refleja una señal de alerta de contaminación humana que debe ser considerada. Los cambios significativos en la estabilidad de las membranas lisosomales es un indicio de respuestas al estrés en presencia de metales pesados (Lowe *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 2004), y de igual manera ha sido correlacionada con los efectos a muy bajos niveles de exposición de hidrocarburos policíclicos en los mejillones del mediterráneo *M. galloprovincialis* y el mejillón marrón *P. perna* (Francione *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007). Este parámetro se ha llegado a considerar como una herramienta sensible en el monitoreo

ambiental y su uso ha sido recomendado por organizaciones internacionales tales como WHO-FAO y UNEP (UNEP/RAMOGE, 1999). Se ha demostrado que la contaminación química tiene consecuencias directas sobre la morfología y funcionamiento de los lisosomas, ya que los mismos juegan un rol importante en la compartimentación celular de xenobióticos orgánicos y metales pesados (Viarengo y Nott, 1993). En estudios de campo, Talet *et al.* (2009) mostraron un decrecimiento en retención del rojo neutro en lisosomas de hemocitos en *M. galloprovinciales*, trasplantados a zonas con altos niveles de polución orgánica localizada en la costa Oeste de Argelia.

Los lisosomas son organelos citoplásmáticos que contienen elevadas cantidades de enzimas hidrolasas que son capaces de degradar macromoléculas a productos de baja masa molecular. Se conoce que los metales pesados son transferidos a través de la membrana plasmática celular por difusión facilitada mediante un sistema dependiente de ATP, realizado presumiblemente por proteínas inter-membranas específicas, ionoforos o receptores mediados por endocitosis. Una vez que los metales se localizan en el interior de la célula, los mismos se unen a una variedad de ligandos existentes que regulan sus concentraciones, lo cual permite su flujo, manteniendo un gradiente electroquímico que permite iniciar manifestaciones tóxicas relacionadas con la inactivación de ciertas enzimas y componentes bioquímicos (Nott y Moore, 1987).

Los organismos de CG presentaron los mayores promedios de MDA relacionados por miligramo de proteínas corporal. La mayoría de los metales acumulados poseen capacidad de inducir producción exacerbada de especies reactivas del oxígeno (EROs). La sobreproducción de radicales libres, tales como anión superóxido y radical hidroxilo pueden perturbar la eficiencia antioxidante, lo cual ofrece un preámbulo para alteraciones oxidativas (peroxidación) de las membranas biológicas. Diversas investigaciones han demostrado el papel de estos radicales libres como intermediarios en la toxicidad de

contaminantes orgánicos en bivalvos marinos: *Mytilus edulis* (Livingstone *et al.*, 2000), *M. galloprovincialis* (Livingstone, 2001) y *Perna viridis* (Cheung *et al.*, 2001). Las consecuencias citotóxicas pueden ser evidenciadas por inactivación enzimática, lipoperoxidación de membranas celulares, deterioro del ADN y muerte celular (Di Giulio *et al.*, 1995).

A pesar de las elevadas concentraciones de Cd, un fuerte inductor de lipoperoxidación, sus valores no presentaron asociación estadística con los niveles de MDA en su ambiente natural (Tabla 6). Prakash y Rao-Jagannatha (1995), reportaron una elevada producción de MDA en la misma especie expuesta a concentraciones de 200  $\mu\text{mol Cd/l}$  en agua de mar 7 días. Estos autores sugieren que el Cd, a bajas concentraciones, actúa como inductor de MDA, debido a deficiencias directas o indirectas en las defensas antioxidantes, tales como el sistema redox GSH/GSSG y las actividades de algunas enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), todas dependientes de tioles. Contrariamente, Zapata-Vivenes y Nusetti (2007) demostraron, bajo condiciones controladas, que concentraciones de Cd acumuladas en la glándula digestiva cercanas a los 10  $\mu\text{g/g}$  de masa seca no producen cambios en los niveles de MDA en *P. viridis* en un periodo agudo, pero si los organismos expuestos a hierro.

La determinación de grupos tioles totales ha sido utilizada como un marcador de contaminación por metales pesados en distintos sistemas biológicos (Hernández, 2006). Con la valoración de los grupos tioles, en esta investigación, se pretendió obtener en forma generalizada, la sumatoria de las concentraciones de GSH, homocisteína, cisteína y otros compuestos contentivos de  $-\text{SH}$ , inclusive proteínas. Los grupos  $-\text{SH}$  son químicamente activos y presentan una altísima afinidad por metales pesados (Golman *et al.*, 2001). Los tioles de baja masa molecular, actúan como antioxidantes endógenos y amortiguadores redox, siendo importantes en la homeostasis celular. Estas funciones celulares son

mediadas por modificaciones post-traduccionales (procesos de tiolación de proteínas), las cuales involucran la formación de mezclas de disulfuros entre GSH y residuos de cisteína de cadenas polipeptídicas (Rubino *et al.*, 2004).

*P. viridis* posee defensas bioquímicas (compuestos y enzimas antioxidantes) para contrarrestar los daños oxidativos. Uno de los compuestos más importantes es la glutatión reducida, junto a otros compuestos de baja masa molecular contentivos de grupos sulfhidrilos (-SH). Las concentraciones de -SH en organismos provenientes de CG y RC, posiblemente corresponda a un desajuste de las respuestas moleculares de compensación antioxidante contra la producción de intermediarios reactivos experimentada por el ingreso excesivo del metales pesados al organismo. Además, se han reportado incrementos en la concentración de GSH como respuesta antioxidante en *P. viridis* sometidos a bifenilos policlorados (PBCs), un fuerte inductor de daño oxidativo (Cheung *et al.*, 2002).

Los biomarcadores usados, además de tener la ventaja de ser rápidos, fáciles de realizar, económicos y sensibles, permiten diagnosticar condiciones de estrés químico a diferentes niveles de organización biológica, desde el nivel subcelular (estabilidad de membrana lisosomal), celular (número total de hemocitos, viabilidad celular), inmunológicos (fagocitosis, lisozimas) hasta molecular (daños oxidativos en membranas biológicas, grupos tioles, proteínas totales). El uso de biomarcadores puede originar información relevante sobre las condiciones del organismo en estudio, proveyendo los datos necesarios para el entendimiento del modo de acción de los contaminantes, así como la comprensión de la mecánica en los procesos relacionados con la intoxicación y depuración de xenobióticos, sugiriéndose a estas respuestas biológicas como señales de alerta temprana a focos de contaminación química.

Esta investigación sugiere la implementación de biomarcadores a nivel celular o bioquímico en organismos biomonitores locales, con miras a complementar los estudios ambientales, permitiendo, así revelar cambios inducidos por xenobióticos metálicos sobre la fisiología de los organismos que habitan ecosistemas marino-costeros.

## CONCLUSIONES

Se hallaron concentraciones de metales pesados que exceden los valores permisibles de importancia ecotoxicológica (Zn, Cr y Cd), en poblaciones de mejillones *Perna viridis* provenientes de la localidad de Chacopata-Guayacan, seguido por Río Caribe, y en menor grado San Antonio del Golfo.

Los biomarcadores analizados muestran diferencias significativas entre los organismos de las distintas áreas de colecta, observándose débiles relaciones entre respuestas celulares y moleculares y la contaminación por metales.

La combinación de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica, conjuntamente con los análisis químicos de contaminantes acumulados corporalmente en *P. viridis* sugieren ser una alternativa para la evaluación de áreas impactadas por xenobióticos metálicos.



## BIBLIOGRAFÍA

Acosta, V. y Lodeiros, C. 2004. Metales pesados en la almeja *Tivela mactroides* (Born, Bivalvia Veneridae) en localidades costeras con diferentes grados de contaminación en Venezuela. *Ciencias Marinas*, 30(2): 323-333.

Acost, V.; Prieto, A. y Lodeiros, C. 2006. Índice de condición de los mejillones *Perna perna* y *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) bajo un sistema suspendido de cultivo en la ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 24(2): 177-192.

Agard, J.; Kishore, R. y Baine, B. 1992. *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). First records of the Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribb. Mar. Stud.*, 3: 59-60.

Almeida, E.; Dias-Bainy, A.; Melo-L. A.; Regina-M., G.; Miyamoto, S.; Onuki, J.; Fujita, L.; Machado, C.; Manso, F.; Ronsein, G.; Sigolo, C.; Barbosa-Brochini, S., Gracioso, A.; Gennari-Medeiros, M. y Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146(4): 588-600.

Bayen, S.; Thomas, G.; Lee, H. y Obbard, J. 2004. Organochlorine pesticides and heavy metals in green mussel, *Perna viridis* in Singapore. *Water, Air and Soil Pollut.*, 155: 103-16.

Blackmore, G. y Wang, W. 2002. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environ. Sci. Technol.*, 36(5): 989-995.

Bonilla, J. 1999. Calidad del agua de la Ensenada Grande de Obispo. Estado Sucre. Venezuela. *Act. Cient. Ven.*, 2(50): 1-86.

Bonilla, J.; Fermín, J.; Gamboa, B. y Carrera, M. 1995. Aspectos geoquímicos de los sedimentos superficiales del ecosistema marino costero de Jose, Estado Anzoátegui, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. UDO*, 34: 5-25.

Bonilla, J.; Fermín, J. y González, C. 1998. Análisis estadístico multivariante aplicado al grado textural y a los aspectos geoquímicos de los sedimentos del ecosistema marino costero de Jose, estado Anzoátegui, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr Univ Oriente*, 37: 53-62.

Bonilla, J. y González, C. 1992. Algunos aspectos geológicos y características químicas en los sedimentos de la Laguna de Piritu. Estado Anzoátegui, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 31: 45-55.

Bryan, G. y Langston, W. 1992. Bioavailability accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: A review. *Environ. Pollut.*, 76: 89-131.

Castillo, I.; Acosta, V. y Martínez, G. 2005. Niveles de metales pesados en gónadas y músculo aductor del mejillón marrón, *Perna perna*, cultivado en la ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 23(2): 141-154.

Cheng, T. 1988. In vivo effects of heavy metals on cellular defenses mechanism of *Crassostrea virginica*: total and differential haemocyte counts. *J. Invert. Pathol.*, 51: 207-214.

Cheung, C.; Zheng, G.; Li, A.; Richardson, B. y Lam, P. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidant responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.*, 52: 189-203.

Cheung, C.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 2002. Relationship between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbon (polychlorinated biphenyl and chlorinated pesticides) and antioxidant responses of marine mussel, *Perna viridis*. *Mar. Poll. Bull.*, 45: 181-191.

Chidambaram, N. 1991. The green mussel *Perna viridis* as an indicator of copper pollution along Madras coast, Bay of Bengal. *Indian J. Environ. Prot.*, 11: 727-732.

Cossa, D.; Bourget, A. y Piuze, J. 1979. Sexual maturation as source of variation in the relation slip between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis* (L). *Mar. Pollut.*, 10: 174-176.

Del Valls, T. y Conradi, M. 2000. Avances en ecotoxicología marina: Comparación entre tests de laboratorio y estudios *in situ* para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. *Ciencias Marinas*, 26(1): 39-64.

Di Güilio, R.; Benson, W.; Sander, B. y Vanveld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms, metabolisms, adaptation and toxicity. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M. (Ed.). Segunda edición. Taylor & Francis. Washington DC, USA. Págs. 523-561.

Dyrynda, E., Pipe, R. y Ratcliffe, N. 1997. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell. Tiss. Res.*, 289: 527-536

Dyrynda, E.; Law, R.; Dyrynda, P.; Kelly, C.; Pipe, R. y Ratcliffe, N. 2000. Changes in immune parameter of natural *Mytilus edulis* population following a major oil spill (Sea Empress, Wales, UK). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 206: 155-170.

Ellman, G. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.*, 74: 443-450.

Fang, J.; Wu, R.; Zheng, G.; Lam, P. y Shin P. 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 57(6-12): 467-72.

Francione, E.; Wagener, A.; Scofield, A.; Depledge, M. y Cavalier, B. 2007. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH) exposure and effects, *Mar. Pollut. Bull.*, 54(3): 329-338.

Frazier, J.; George, S. y Overnell, J. 1985. Characterization of two molecular weight classes of Cd-binding proteins the *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80: 257-262.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.

Goldman, L.; Shannon, M. y Weiss, B. 2001. The committee on environmental health. Mercury in the environment: Implications for pediatricians. *Technical report. Pediatrics*, 108: 197-205.

Goven, A.; Chen, S.; Fitzpatrick, L. Y. Venables, B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic and celomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 607-613.

Goven, A.; Fitzpatrick, L. y Venable, B. 1996. Chemical toxicity and host defence in earthworm. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 712: 280-299.

Gutiérrez-Galindo, E.; Villaescusa-Celaya, J. y Arreola-Chimal, A. 1999. Bioacumulación de metales en mejillones de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Ciencias Marinas*, 25(4): 557-578.

Harding, J.; Couturier, C.; Parsons, G. y Roos, N. 2004. Evaluation of the neutral red retention assay as stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* Spp) in relation to seasonal and environmental conditions. *J. Shell. Res.*, 23(3): 745-751.

Hernández, J. 2006. Metalotioneínas y lipoperoxidación en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* expuesta a cadmio. Tesis de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela.

Kennish, M. 1997. Practical handbook of Estuarine and Marine Pollution. CRC Pres. Boca de Ratón, Florida. Pág. 524.

Laurent, C. 2009. Variación estacional de la concentración de metales pesados (Zinc, Cobre, Cadmio, Cromo, Plomo y Níquel) en machos y hembras de *Perna viridis*, en la localidad de Guayacán, Península de Araya Edo. Sucre-Venezuela.

Livingstone, D. 1993. Biotechnology and pollution: use of molecular biomarkers in the aquatic environment *J. Chem Tech Biotechnol.*, 57: 195-211.

Livingstone, D. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 42: 656-666.

Livingstone, D.; Chipman, J.; Lowe, D.; Minier, C.; Michelmore, M.; Peters, L. y Pipe, R. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*) and others mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.*, 13: 56-91.

Lobel, P. y Wright, D. 1982. Gonadal and nongonadal zinc concentration in mussel. *Mar. Pollut. Bull.*, 13: 323-329.

Lowe, D. y Pipe, R. 1994. Contaminant induced lisosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.*, 30: 357-365.

Lowe, D. 1995. Lysosomal membrane impairment in blood cells of *Perna viridis*: an in

vitro marker of contaminant induced damage. *Res. Bull. Phuket Mar. Biol. Cent.*, 60: 79-82.

Lowe, D.; Fossato, U. y Depledge, M. 1995. Contaminant induced lysosomal membrane damage en blood cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Venice lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129: 189-196.

Márquez, A., Bonilla, J., Martínez, G., Senior, W., Aguilera, D. y González, A. 2005. Estudio geoquímico de los sedimentos superficiales del litoral nororiental del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 44(2): 89-103.

Márquez, A.; Martínez, G.; Arismendi, J.; Castañeda, J.; Lemus, M.; Iabichella, M.; Aparicio, R. y Senior, W. 2006. Estudio integrado de las características ambientales del medio marino costero en la Plataforma Norte de la Península de Paria y Sector Norte del Golfo de Paria. Estudio de línea base ambiental, socioeconómica y de salud. Proyecto Mariscal Sucre CAMUDOCA. Consultora Ambiental de la Universidad de Oriente. Informe final. Volumen II. Componente Abiótico.

Martínez, G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos del golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, UDO.*, 41: 83-93.

Martínez, G. 2006. Contaminación por metales pesados en sedimentos superficiales de seis regiones marino-costera del oriente de Venezuela. Trabajo para optar a la categoría de profesor asociado. Departamento de Oceanografía, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Medina, A. 2010. Metalotioneínas y metales pesados en el guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia), colectado en playa Caicara, estado Anzoátegui, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en biología.

Moore, M. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. pollut. Bull.*, 16: 134-139.

Muhammed, Z.; Khan M. y Goswami U. 2009. Cytogenetic studies in green mussel, *Perna viridis* (Mytiloidea: Pteriomorpha), from West Coast of India. *Mar. Biol.*, 153 (5): 987-993.

Narváez, N.; Lodeiros, C.; Nusetti, O.; Lemus, M. y Maeda-Martínez, A. 2005.

Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L.1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ciencias Marinas*, 31(1A): 91-102.

Nicholson, S. 1999. Cardiac and lysosomal responses to periodic copper in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Pollut. Bull.*, 38: 1157-1162.

Nicholson, S. 2003. Lysosomal membrane stability phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal copper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.

Nicholson, S. y Lam, P. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Inter.*, 31(1): 121-132.

Nicholson, S. y Szefer, P. 2003. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and sell of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 46:1040-1043.

Nott, J.A y Moore, M.N.1987. Effects polycycli aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum. *Histochem J.*, 19: 357-368.

Nuseti, O.; Esclapés, M.; Salazar, G.; Nusetti, S. y Pulido, S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complana* (Amphinomidae ) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Toxicol.*, 66: 576-581.

Nuseti, O.; Marcano, L.; Zapata, E.; Esclapés, M.; Nusetti S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil nº 6. *Interciencia*, 29: 324-329.

Nuseti, O. A., Zapata, E., Esclapés y Rojas, A. 2005. Antioxidant Enzymes and Tissue Regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) Exposed to Used Vehicle Crankcase Oil. *Arch. Environ. Toxicol. Contam.*, 48: 509–514.

Ong, C.; Yusoff, C.; Yap, K. y Tan, S. 2009. Genetic characterization of *Perna viridis* L. in peninsular Malaysia using microsatellite markers. *J. Genet.*, 88(2): 153-163.

Pereira, C.; Abessa, D., Bainy, A.; Zaroni, L., Gasparro, M, Bicego M.; Taniguchi, S., Furley, T y Sousa, E. 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from Sao Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(3): 462-469.

Pérez, M.; Martínez, G. y Fermín I. 2006. Biodisponibilidad de metales traza en sedimentos superficiales del ecosistema lagunar costero Bocaripo-Chacopata (Península de Araya, Estado sucre). *Bol. Inst. Oceanogr UDO.*, 45(2): 81-91.

Phillips, D. 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by Zn, Cd, Pb and Cu. Effect of environmental variables on uptake metals. *Mar. Biol.*, 38: 59-69.

Phillips, D. 1985. Organochlorines and trace metals in green-lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong waters: a test of indicator ability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21:251-258.

Pipe, R. y Coles, J. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immun.*, 5: 581-595.

Pipe, R.; Coles, F. y Ramanathan, K. 1999. Cooper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aqua. Toxicol.*, 46: 43-54.

Prakash, N. y Rao-Jagannatha, K. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cel. Biochem.*, 146: 107-114.

Rand, G. y Petrocelli, S. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corporation, Washington, D.C. Pág 665 .

Rojas-Astudillo, L.; Chang Yen, I.; Agard, J.; Bedel, I. y Hubbard, R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oyster (*Crassostrea* sp) from Trinidad and Venezuela. *Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 410-415.

Rojas de Astudillo, L.; Chang-Yen, I. y Bekele, I. 2005. Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 53(1): 41-53.

Rojas-Astudillo, L.; Chang Yen, I.; Agard, J.; Bedel, I. y Hubbard, R. 2002. Heavy metals

in green mussel (*Perna viridis*) and oyster (*Crassostrea* sp) from Trinidad and Venezuela. *Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 410-415.

Roling, J.; Bain L.; Gardea-Torresdey, J.; Bader, J. y Baldwin, W. 2006. Hexavalent chromium reduces larvae growth and alters gene expression in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2725-2733.

Rubino, F.; Verduci, C.; Giampiccolo, R.; Pulvirenti, S.; Brambilla, G. y Colombi, A. 2004. Characterization of the disulfides of bio-thiols by electrospray ionization and triple-quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.*, 39(12): 1408-1416.

Rylander, J.; Pérez, j. y Gómez, J. 1996. Status of green mussel *Perna viridis* (Linneaus,1758) (Bivalvia: Mytilidae) in the north-eastern Venezuela. *Carib. Mar. Stud.*, 5: 86-87.

Sadiq, M. 1992. *Toxic metal chemistry in marine enviroments*. Marcel Dekker. New York, Estados Unidos.

Sánchez, G. 2008. Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten *Lima scabra* (Born, 1778) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en biología.

Segnini-Bravo; Chung, K. y Pérez, J. 1998. Salinity and temperature tolerance of green mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Rev. Biol. Trop.*, 46(5): 121-125.

Seis, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free. Rad. Biol. Med.*, 27 (9/10): 916-921.

Sreenivasan, P.; Thangarelu, R. y Poovanna, P. 1989. Biology of the green mussel, *Perna viridis* (Linneaus, 1758) culture in Muttukadu Logoon Madras. *Indian J. Fish*, 36(2): 64-67.

Sminia, J. 1980. Phagocytic cells in molluscs. En: *Aspects of Developmental and Comparative Immunology*. Solomon, J.B. (Ed). Pergamon, London. Págs. 125-132.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistic in biological reasearch*. Second Edition. W.H. Freeman & Co. New York. Pág 859.

Talet, Z...; Behali, I.; Gherros, H.; Ykhlef-Allal, A.; Bachir-Bouia-Djar, B.; Amiar, J. y



Boutibaz, B. 2009. Monitoring of environmental pollution an the Alegrian west cost using caged mussels *Mytilus edulis*. *Oceanologia*, 51(1): 63-84.

Tejera E.; Oñate, I.; Nuñez, M. y Lodeiros, C. 2000. Crecimiento inicial del mejillón *Perna perna* (Linné, 1758) y *Perna viridis* (Linné, 1758) bajo condiciones de cultivos suspendidos en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Cent. Invest. Biol. LUZ*, 34: 143-158.

Tewari, A.; Joshi, H.; Raghunathan, C.; Sravankumar, V. y Khambhaty, Y. 2001. Effect of heavy metal pollution on growth, carotenoid content and bacterial flora in the gut of *Perna viridis* (L.) in situ condition. *Curr. Sci.*, 81: 819-828.

Tovar, M. 2007. Actividad de las enzimas piruvatoquinasa, fosfoenolpiruvato, carboxiquinasa, citocromo c oxidasa, catalasa en *Perna viridis* pre-expuesta a cadmio, en condición de aerobiosis y anoxia. Trabajo de Postgrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Tsangaris, C., Papathanasiou, E. y Cotou, E. 2007. Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotox. Environ. Saf.*, 66(2): 232-243.

UNEP/RAMOGGE. 1999. Manual on the biomarker recommended for the MED POL biomonitoring programme, UNEP, Athens. Pág. 92.

Urbano, T.; Lodeiros, C.; De Donato, M.; Acosta, V.; Arrieché, D.; Nuñez, M. y Hilmelman, J. 2005. Crecimiento y supervivencia de los mejillones *Perna perna*, *Perna viridis* y de un morfotipo indefinido bajo cultivo suspendido. *Ciencias Marinas*, 31(3): 517-528.

Viarengo, A. y Nott, J. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 104: 355-372.

Vijayavel, K.; Gopalakrishnan S. y Balasubramanian, M. 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69(6): 979-986.

Viñoles, I.; Segnini, M.; Bracho, M y Chung, K. 2000. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el coeficiente

ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.*, 48(I): 159-170.

World Health Organisation (WHO). 1987. Evaluation of certain food additives and contaminants. 33rd Report of the joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 776, Geneva. Pág. 80.

Yap, C.; Ismail, A y Tan, S. 2004. Heavy metal (Cd, Cu, Pb and Zn) concentrations in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from some wild and aquaculture sites in the west coast of Peninsular Malaysia. *Food Chem.*, 84: 569–575.

Winston, G. y Di Giulio, R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.

Zapata, E. 2005. Metalotioninas y enzimas glucolíticas regulatorias en el mejillón verde *Perna viridis* sujeto a estrés oxidativo. Trabajo de Postgrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Zapata-Vívenes, E. y Nusetti, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shell. Res.*, 26(2): 1–10.

## **APÉNDICES**

Tabla 1. Análisis de varianza de los niveles de Cu en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	57,807	2	28,904	3,08	0,059
Intra localidades	309,346	33	9,374		
Total corregido	367,153	35			

Tabla 1a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Cu en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	6,0712	X
Río Caribe	12	8,2021	X
San Antonio	12	9,0913	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	2,1308	3,91
Chacopta-San Antonio	-0,8892	3,91
Río Caribe-San Antonio	-3,02200	3,91

Tabla 2. Análisis de varianza de los niveles de Fe en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	21697,0	2	10840,0	3,07	0,061
Intra localidades	106105,0	30	3536,0		
Total corregido	127802,0	32			

Tabla 2a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Fe en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	11	52,619	X
Río Caribe	12	105,665	X
San Antonio	10	108,510	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	55,8907	81,8476
Chacopta-San Antonio	2,8459	80,2060
Río Caribe-San Antonio	-53,0448	78,1922

Tabla 3. Análisis de varianza de los niveles de Zn en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	4427,29	2	2213,64	9,55	0,0005
Intra localidades	7648,69	33	231,78		
Total corregido	12075,98	35			

Tabla 3a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Zn en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	38,6389	X
Río Caribe	12	16,1427	X
San Antonio	12	40,5760	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	*-22,4962	19,4423
Chacopta-San Antonio	-1,9372	19,4423
Río Caribe-San Antonio	*-24,4334	19,4423

\*Indica diferencia significativa

Tabla 4. Análisis de varianza de los niveles de Cr en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	15602,80	2	7801,40	3,72	0,03
Intra localidades	69139,80	32	2095,14		
Total corregido	84742,60	34			

Tabla 4a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Cr en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	2,5923	X
Río Caribe	12	14,8358	XX
San Antonio	12	51,5851	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	36,7493	45,8625
Chacopta-San Antonio	*48,9927	45,8625
Río Caribe-San Antonio	12,2434	45,8625

\*Indica diferencia significativa

Tabla 5. Análisis de varianza de los niveles de Cd en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	104,97	2	52,49	9,37	0,0006
Intra localidades	184,86	32	5,60		
Total corregido	289,83	34			

Tabla 5a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Cd en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	0,1419	X
Río Caribe	12	2,8776	XX
San Antonio	12	4,3242	X
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	*-4,8223		3,0225
Chacopta-San Antonio	-2,1458		3,0225
Río Caribe-San Antonio	2,0364		3,0225

\*indica diferencia significativa

Tabla 6. Análisis de varianza de los niveles de Pb en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	0,161	2	0,081	5,120	0,012
Intra localidades	0,519	32	0,016		
Total corregido	0,680	34			

Tabla 6a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Pb en el tejido blando del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	0,000	X
Río Caribe	12	0,000	X
San Antonio	12	0,142	X
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	0,142		0,1601
Chacopta-San Antonio	0,142		0,1601
Río Caribe-San Antonio	0,000		0,1601

Tabla 7. Análisis de varianza para la viabilidad celular (%) en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	720,2	2	360,1	1,3	0,30
Intra localidades	7743,3	27	286,8		
Total corregido	8463,5	29			

Tabla 7a. Contraste múltiple de rango para la viabilidad celular (%) en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	10	78,5	X
Río Caribe	10	79,6	X
San Antonio	10	89,4	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	9,8	18,9
Chacopta-San Antonio	1,1	18,9
Río Caribe-San Antonio	10,9	18,9

Tabla 8. Análisis de varianza para el número total de células (NTC/ml) en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	1,04504E10	2	5,2252E19	3,59	0,04
Intra localidades	3,93330E10	27	1,45678E9		
Total corregido	4,97834E10	29			



Tabla 8a. Contrate múltiple de rango para el número total de células (NTC/ml) en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	10	158375,0	X
Río Caribe	10	169625,0	XX
San Antonio	10	202375,0	X
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	11250,0		35023,0
Chacopta-San Antonio	-32750,0		35023,0
Río Caribe-San Antonio	*-44000,0		35023,0

Tabla 9. Análisis de varianza para la actividad fagocítica en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	26,114	2	13,057	4,230	0,025
Intra localidades	83,413	27	3,089		
Total corregido	109,527	29			

Tabla 9a. Contrate múltiple de rango para la actividad fagocítica en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	10	4,51072	X
Río Caribe	10	5,56856	XX
San Antonio	10	6,79403	X
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	1,22547		1,94947
Chacopta-San Antonio	1,05783		1.94947
Río Caribe-San Antonio	*2,2833		1.94947

\*Indica diferencia significativa

Tabla 10. Análisis de varianza para la actividad de lisozima (Ug/ml) en la glándula del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	0,001	2	0,005	1,89	0,16
Intra localidades	0,085	32	0,003		
Total corregido	0,086	34			

Tabla 10a. Contrate múltiple de rango para la actividad de lisozima (Ug/ml) en la glándula mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	12	0,81896	X
Río Caribe	12	0,85220	X
San Antonio	12	0,85349	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	-0,00012878	0,0508215
Chacopta-San Antonio	0,0341841	0,0508215
Río Caribe-San Antonio	0,0354179	0,0508215

Tabla 11. Análisis de varianza para retención de rojo neutro en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	1847,41	2	923,70	3,57	0,04
Intra localidades	6985,59	27			
Total corregido	8833,00	29			

Tabla 11a. Contraste múltiple de rango para retención de rojo neutro en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	14	61,6633	X
Río Caribe	14	77,3878	X
San Antonio	12	77,4268	XX
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	*-15,7245		15,0774
Chacopta-San Antonio	-15,7653		30,1547
Río Caribe-San Antonio	-14,0408		30,1547

\*indica diferencia significativa

Tabla 12. Análisis de varianza para retención de rojo neutro en la hemolinfa según el porcentaje de células dañadas del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	1351,19	2	675,59	1,73	0,21
Intra localidades	5845,51	15	389,70		
Total corregido	7196,70	17			

Tabla 12a. Contraste múltiple de rango para retención de rojo neutro según el porcentaje de células dañadas en la hemolinfa del mejillón verde *P. viridis* colectados en distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	6	16,8889	X
Río Caribe	6	17,6627	X
San Antonio	6	35,6429	X
<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>		<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	17,98		29,73
Chacopta-San Antonio	18,75		29,73
Río Caribe-San Antonio	0,77		29,73

Tabla 13. Análisis de varianza de los niveles de proteínas (mg proteínas/gramos de masa húmeda) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	338,76	2	169,37	0,70	0,51
Intra localidades	9710,05	40	242,75		
Total corregido	10048,81	42			

Tabla 13a. Contraste múltiple de rango de los niveles de proteínas (mg proteínas/gramos de masa húmeda) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	14	15,4449	X
Río Caribe	15	19,6771	X
San Antonio	14	22,3394	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	4,2322	14,0943
Chacopta-San Antonio	-2,6623	14,0943
Río Caribe-San Antonio	-6,8945	14,3352

Tabla 14. Análisis de varianza de los niveles de grupos tioles ( $\mu$ moles de  $-SH/mg$  proteínas) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	2,54	2	1,26	13,27	0,00
Intra localidades	3,83	40	0,09		
Total corregido	6,37	42			

Tabla 14a. Contraste múltiple de rango para grupos tioles ( $-SH/mg$  proteínas) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	15	0,344878	X
Río Caribe	14	0,123542	X
San Antonio	14	0,718849	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	0,221336	0,279761
Chacopta-San Antonio	*-0,373971	0,279761
Río Caribe-San Antonio	*-0,595306	0,284544

\*indica diferencia significativa

Tabla 15. Análisis de varianza de los niveles de Malonaldehído (nmoles de MDA/mg proteína) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Sc</b>	<b>Gl</b>	<b>Mc</b>	<b>Fs</b>	<b>P</b>
Entre localidades	3,063	2	1,532	0,970	0,388
Intra localidades	63,242	40	1,581		
Total corregido	66,305	42			

Tabla 15a. Contraste múltiple de rango de los niveles de Malonaldehído (nmoles de MDA/mg proteína) en el tejido blando del mejillón verde *P.viridis* colectados en las distintas localidades del Estado Sucre. F: frecuencia, M: media, Gh: grupo homogéneo.

<b>Localidad</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Gh</b>
Chacopata	14	0,8970	X
Río Caribe	15	1,1275	X
San Antonio	14	1,5372	X

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límite</b>
Chacopata-Río Caribe	0,4097	1,1374
Chacopta-San Antonio	0,6401	1,1374
Río Caribe-San Antonio	0,2304	1,1374

## **ANEXOS**

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Spearman ( $r^2$ ) entre los metales pesados y los parámetros celulares, inmunológicos y bioquímicos analizados en *Perna viridis*

Metal	Viabilidad	NTC	Fagocitos	Lisozima	RRN	MDA	-SH	Proteínas
Zn	-0,29 (8,33)	-0,24 (6,24)	-0,23 (5,47)	-0,11 (1,24)	0,37 (14,12)	0,30 (8,90)	0,51 (26,54)*	0,26 (6,64)
Cu	-0,60 (36,44)*	-0,15 (2,39)	-0,24 (5,76)	-0,03 (1,12)	0,47 (22,83)	-0,13 (1,96)	0,52 (26,75)*	-0,13 (1,75)
Fe	0,05 (0,32)	-0,18 (3,07)	0,08 (0,77)	-0,22 (4,87)	0,30 (9,55)	-0,15 (2,16)	0,19 (3,69)	-0,06 (0,42)
Cr	-0,17 (3,04)	-0,21 (4,37)	-0,07 (0,48)	0,28 (9,73)	0,30 (9,05)	0,58 (33,18)*	0,17 (3,04)	-0,34(11,93)
Cd	0,04 (0,15)	0,03 (0,11)	-0,09 (0,73)	0,15 (2,36)	-0,40 (16,3)*	-0,05 (0,34)	-0,45 (19,96) *	-0,16 (2,65)
Pb	-0,09 (0,97)	-0,08(0,75)	0,08 (0,67)	0,15 (2,30)	0,09 (0,76)	-0,31 (9,73)	-0,05 (0,27)	0,27 (7,34)

\*Muestra las relaciones moderadamente fuerte entre las variables, usando como variable independiente a los metales pesados y como variables dependientes a los biomarcadores moleculares y celulares.



Tabla 7. Anexo 1. Concentraciones promedios o rangos de valores de metales pesados reportado en la literatura para *P. viridis* en distintas localidades de la geografía mundial ( $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de masa seca, PS;  $\mu\text{g}/\text{gramo}$  de masa húmeda, PH).

Sitio de muestreo	Zn	Cu	Fe	Cr	Cd	Pb
Chacopata, Ven <sup>1*</sup>	28,54±8,29	2,64±0,75	-	0,87±0,83	1,20±0,52	0,41±0,84
S. Juan Galdonas, Ven <sup>2*</sup>	-	4,53±1,34	-	0,50±0,29	2,22±1,36†	0,49±0,41
Karnataska, In <sup>3*</sup>	7,47-42,98	0,08-3,46	15,7-286	0,02-2,83	0,24-2,99	nd
Hong Kong <sup>4</sup>	-	15,1±0,7	-	5,1±1,5†	2,5±0,64†	3,7±0,9†
Rio Caribe, Ven <sup>5+</sup>	12,8±0,2	2,1±0,1	-	0,39±0,02	<0,01	2,1±0,3†
Singapur <sup>6*</sup>	280±89	28±4	-	1,7±0,2	-	5,6±3,2†
Chacopata, Ven <sup>5+</sup>	5,6±0,4	1,7±0,1	-	0,19±0,01	<0,01	-
Rio Caribe, Ven <sup>7+</sup>	25±28	1,7±0,7	-	0,12±0,04	0,16±0,25	-
Costa de Malasia <sup>8*</sup>	46±28	34±42	1,1±0,6	-	1,1±0,6	38±24†
Gujarat Mocha, <sup>9*</sup>	52,62-813,2†	6,82-21,22	-	0,01-1,60	4,2-10,8†	30,6-63,8†
Golfo de Tl <sup>10*</sup>	58,27-253,7†	0,66-17,92	0,11-2,38	0,01-1,60	0,11-2,38	0,19-3,80†
Rayong, Tl <sup>11+</sup>	14,2	7,3	0,38	-	0,38	0,11
Chao Phirya, Tl <sup>11+</sup>	54,7†	8,7	3,3	-	3,3†	83,3†
Valores permisibles WHO	50	30	-	2	2	2

<sup>1</sup> Laurent (2009), <sup>2</sup> Marquez et al., (2006), <sup>3</sup> Sasikumar (2006), <sup>4</sup> Nicolson y Szefer, 2003, <sup>5</sup> Rojas *et al.* (2005), <sup>6</sup> Bayen *et al.*, 2004, <sup>7</sup> Rojas *et al.* (2002), <sup>8</sup> Yap *et al.* (2004), <sup>9</sup> Tewari (2001), <sup>10</sup> Ruasgwises y Ruasgwises (1997), <sup>11</sup> Menasveta y Cheevaparana, 1981. Ven (Venezuela), In (India), Tl (Tailandia). ps: peso seco\*; ph: peso húmedo<sup>+</sup>

Tabla 8. Anexo 2. Rangos de concentraciones de metales pesados en sedimentos superficiales en los sitios de colectas o zonas aledañas publicados por otros autores. Los análisis de Fe, Mn y Co no fueron realizados en ninguno de los trabajos.

Sitio de Colecta	Zn	Cu	Cr	Cd	Pb	Referencia
Laguna de Chacopata	2,09-2,65	0,10-0,32	<0,01	0,02-0,03	2,14-6,30†	Pérez <i>et al.</i> , 2006
Río Caribe	31,3-254,3†	1,96-34,96†	5,12-122,55†	0,06-2,0†	0,04-22,6†	Márquez <i>et al.</i> , 2006
Río Caribe	48,0±1,0	12,1±0,4†	32,0 ±2,0†	<0,01	2,1±0,3	Rojas <i>et al.</i> , 2005
San Antonio del Golfo	2,01-222,4†	0,63-67,01†	2,51-97,15†	0-6,21†	0-37,08†	Martínez, 2002
Sedimentos no contaminado	<110	<10	<20	<1,0	<5	Sakid, 1992

Expresados en mg/kg de sedimento seco. †

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	Biomarcadores De Contaminación Por Metales Pesados En El Mejillón Verde <i>Perna Viridis</i> (Bivalvia: Mytilidae) Colectado En Zonas Costeras Del Estado Sucre, Venezuela.
---------------	---

#### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail
Barreto M., Madargelis J.	CVLAC   10 946 301
	e-mail   mbarreto22@hotmail.com
	e-mail   barretom01@gmail.com

#### Palabras o frases claves:

Biomarcadores

Mejillón Verde

Metales Pesados

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	Bioanálisis

### Resumen (abstract):

El mejillón verde *Perna viridis* ha sido usado como organismo biomonitor en el diagnóstico de salud ambiental en ecosistemas marino-costeros. Por tal motivo se procedió a evaluar los niveles corporales de metales pesados en el bivalvo *P. viridis* en tres localidades costeras del estado Sucre, y su relación con marcadores biológicos (celulares y moleculares). Los ejemplares fueron colectados en las localidades de Chacopata-Guayacán (CG, Península de Araya), Río Caribe (RC, Península de Paria) y San Antonio del Golfo (SAG, región sur del Golfo de Cariaco). CG y RC son zonas que presentan bancos naturales de explotación de la especie, y SAG es un área destinada recientemente a la acuicultura; esta última fue usada como área referencial. Se determinó la concentración de metales pesados en el tejido blando de cada organismo. De igual manera, fueron valorados algunos parámetros citológicos en la hemolinfa (número total de hemocitos, viabilidad), inmunológicos (fagocitosis) y estabilidad de las membranas lisosomales de hemocitos en presencia de rojo neutro. La actividad de lisozimas fue cuantificada en la glándula digestiva, y el daño oxidativo de lípidos (MDA), niveles de grupos sulfhídricos y proteínas totales fueron valorados en el tejido blando. Los resultados muestran elevados niveles de los siguientes metales Zn, Cr y Cd en organismos provenientes de la localidad de CG, excediendo las concentraciones de Cr y Cd los valores permisibles por organizaciones internacionales (WHO, FAO). Algunos de los parámetros inmunológicos y citológicos mostraron diferencias significativas entre localidades, específicamente el número de células totales en hemolinfa fue menor en RC y CG. En estas últimas zonas los mejillones presentaron un ligero incremento en número de fagocitos con respecto a la zona referencial. El mayor porcentaje de hemocitos con membranas lisosomales desestabilizadas fue encontrado en los organismos de la localidad de CG, seguido de RC, encontrándose débil asociación con el contenido de MDA y proteínas totales; valores que podrían tener correspondencia con la acumulación corporal de metales pesados. Los resultados sugieren que la localidad CG muestra indicios de impacto por metales pesados, originados presumiblemente por actividades antrópicas. Esta investigación muestra la utilidad de múltiples biomarcadores destinados a estimar el impacto de metales pesados sobre organismos centinelas en nuestras costas.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
<b>Zapata-Vívenes, Edgar</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input checked="" type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12 269 219			
	e-mail	Edzapata2002@yahoo.com			
	e-mail				
<b>Lemus, Mairin</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail	Mlemus@gmail.com			
	e-mail				
<b>Leida, Marcano</b>	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail	leidadelvalle@gmail.com			
	e-mail				

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	04	01

Lenguaje: SPA

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-BarretoMadargelis.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Temporal:** \_\_\_\_\_ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

---

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

---

Área de Estudio: BIOANÁLISIS

---

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

---

---

---

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

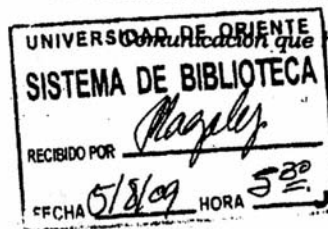
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNVELO**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



---

**AUTOR**

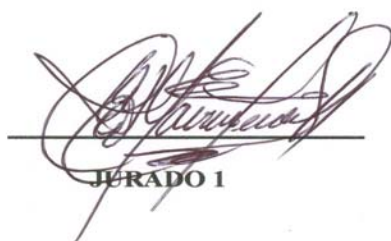


---

**TUTOR 1**

---

**TUTOR 2**



---

**JURADO 1**



---

**JURADO 2**

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**



---