



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

HISTOPATOLOGÍA DE BRANQUIAS Y HEPATOPÁNCREAS DEL MEJILLÓN
VERDE *Perna viridis* (BIVALVIA: MYTILIDAE) EXPUESTO A DOSIS
SUBLETALES DE MERCURIO
(MODALIDAD: INVESTIGACIÓN)

ZAILÉ DE JESÚS PALACIOS RODRIGUEZ

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

CUMANÁ, 2008

HISTOPATOLOGÍA DE BRANQUIAS Y HEPATOPÁNCREAS DEL MEJILLÓN
VERDE *Perna viridis* (BIVALVIA: MYTILIDAE) EXPUESTO A DOSIS
SUBLETALES DE MERCURIO

APROBADO POR:

Prof. Mairin Lemus
Asesora

JURADO

JURADO

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLA.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	5
DE CAMPO	5
DE LABORATORIO.....	6
Diseño experimental.....	6
Determinación de mercurio.....	6
Preparación de muestras histológicas con inclusión en Parafina:.....	6
Preparación de muestras histológicas con inclusión en Resina Epóxica:	7
Análisis estadístico:.....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
ACUMULACIÓN DE Hg	9
HISTOLOGÍA BRANQUIAL.....	12
HISTOLOGÍA DEL HEPATOPANCREAS	14
CONCLUSIONES	18
RECOMENDACIONES	20
BIBLIOGRAFÍA	21
APÉNDICES.....	26

DEDICATORIA

Dandavats Pranam! a Srila Gurudev y Paramakaruna Sri Sri Nitai Gourachandra, Ki Jay! por su misericordia sin causa.

A mi papi Leonardo Palacios, por ser mi gran ejemplo a seguir, te quiero mucho.

A mi mami Zaira Rodríguez, por ser una bendición en mi vida, te quiero mucho.

A mis hermanos: Leonardo y Leonard, se puede cuando se desea de verdad.

A Héctor Gabriel, la persona más especial e incondicional que he conocido, Dandavats!

A toda mi familia como ejemplo de constancia y superación.

A los devotos de Cumaná, que con su asociación me ayudaron a fortalecerme y motivaron a culminar esta meta, Dandavats!

A mis compañeros de estudios: Rosaura, Elsy, Jennellis y Darwin con ustedes compartí momentos muy especiales durante la carrera, Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Mairin Lemus por brindarme su amistad, apoyo y confianza en todo momento para poder lograrlo, Gracias!

Al centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán y el personal que allí labora por su disposición al momento de la recolección de los mejillones y su posterior traslado a la UDO.

Al Prof. Miguel Guevara y su equipo de trabajo por el suministro de microalgas.

Al personal que labora en el laboratorio de metales pesados del Instituto Oceanográfico de Venezuela, la colaboración prestada para la lectura de las muestras.

Al personal que labora en la biblioteca “Rafael A. Curra” del Instituto Oceanográfico de Venezuela, muy especialmente al señor Juan, por su atención y ayuda prestada.

Al personal que labora en el Departamento de Biología, particularmente a la Sra. Gladys y el Sr. Franklin, por su ayuda prestada en todo momento, Gracias!

A todos los profesores del Departamento de Biología que contribuyeron a mi formación académica.

A los profesores: Julio Armas, José Veliz y Edgar Zapata por prestarme su ayuda incondicional en todo momento, Gracias!

Al profesor Baumar Marín y su equipo de trabajo por su colaboración en todo momento.

A la T.S.U Heidi Márquez por su ayuda prestada en todo momento, su compañía y su amistad, Gracias!

A la profesora María Eugenia Álvarez, por su atención y cariño.

A la Lic. Gilma Hernández y al Prof. Carlos Velásquez por su valiosa colaboración en la fase histológica.

Al T.S.U José Luis Prin por su oportuna colaboración.

LISTA DE TABLA

Tabla 1.- Factor de Bioconcentración para los tejidos de branquias y hepatopáncreas del mejillón <i>Perna viridis</i> sometidos a dosis subletales de mercurio.	12
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Contenido de mercurio ($\mu\text{g/g m.s.}$) en branquias de los mejillones verdes *Perna viridis* expuestos a dosis subletales de mercurio durante 21 días..... 9
- Figura 2. Contenido de mercurio ($\mu\text{g/g m.s.}$) en hepatopáncreas de los mejillones verdes *Perna viridis* expuestos a dosis subletales de mercurio durante 21 días. 11
- Figura 3. Tejido branquial de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión en Parafina. Coloración H & E. a: filamento branquial, b y c: lamelas branquiales, d y e: células ciliadas. 15
- Figura 4. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis $0,10 \mu\text{g/l}$ de Hg durante 21 días. Inclusión en parafina. Coloración H & E. a: zona apical del filamento con pérdida de cilios, b: zona lateral del filamento con pérdida de cilios, c: fusión de las lamelas branquiales. 15
- Figura 5. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis $0,40 \mu\text{g/l}$ de Hg durante 21 días. Inclusión en Parafina. Coloración H & E. a: hiperplasia (engrosamiento) de la región apical del filamento, b: pérdida de células ciliadas de la zona apical..... 16
- Figura 6. Tejido branquial de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión en Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: filamento branquial, b y c: lamelas branquiales. 16
- Figura 7. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis de mercurio de $0,10 \mu\text{g}$ de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: zona lateral con pérdida de células ciliadas, b: desorganización del epitelio del filamento branquial..... 16
- Figura 8. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis de mercurio de $0,40 \mu\text{g}$ de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: zona apical con pérdida de células ciliadas, b: hiperplasia (inflamación) de la lamela branquial. 16
- Figura 9. Hepatopáncreas de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: epitelio conectivo de soporte, b: túbulos digestivos, c: células piramidales que rodea el túbulo digestivo. 17
- Figura 10. Hepatopáncreas de *P. viridis* expuesto a $0,10 \mu\text{g}$ de Hg/l durante 21 días. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos. 17

Figura 11. Hepatopáncreas de <i>P. viridis</i> expuesto a 0,40 µg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos, c: adelgazamiento del epitelio que rodea el túbulo digestivo.	17
Figura 12. Hepatopáncreas de <i>P. viridis</i> en condiciones normales de laboratorio. Inclusión Resina Epóxica. Coloración Azul de Toluidina. a: epitelio conectivo de soporte, b: túbulo digestivo.	18
Figura 13. Hepatopáncreas de <i>P. viridis</i> . expuesto a 0,10 µg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina Epóxica. Coloración Azul de Toluidina. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos.	18
Figura 14. Hepatopáncreas de <i>P. viridis</i> expuesto a 0,40 µg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos, c: adelgazamiento del epitelio que rodea el túbulo digestivo.	18

RESUMEN

En la presente investigación se analizó la histología de branquias y hepatopáncreas del mejillón *Perna viridis* expuesto a dosis subletales de mercurio. Para ello se realizaron bioensayos de forma estática durante 21 días con renovación de agua y metal cada 24 horas. Se utilizaron 4 dosis subletales del metal: 0,01; 0,05; 0,10 y 0,40 $\mu\text{g/l}$ y el control. A los 21 días de exposición se disectaron branquias y el hepatopáncreas de 6 organismos, para determinar la incorporación de mercurio en ambos tejidos mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica. El resto de las muestras de los tejidos fueron utilizados para realizar las evaluaciones histológicas mediante las técnicas de inclusión en parafina y resina epóxica, aplicando luego la tinción con Hematoxilina- Eosina y Azul de Toluidina respectivamente. En esta primera fase experimental se demostró la incorporación del mercurio en las branquias, siendo esta mayor cuando los ejemplares son expuestos a 0,01 $\mu\text{g/l}$, mientras que en dosis superiores no son incorporadas con la misma magnitud. En el caso del tejido hepático se observó la mayor concentración en la dosis de 0,05 $\mu\text{g/l}$, presentándose en dosis mayores el mismo comportamiento de las branquias. Estos resultados señalan que no existe una relación dosis-respuesta para estas dosis del metal bajo estas condiciones, probablemente asociado a diversas razones, entre estas que los organismos permanecieron con sus valvas cerradas durante las dosis 0,10 y 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg evidenciando que existe un mecanismo para la incorporación del mismo. Otra pudiera estar asociada a una activación del sistema de defensa de estos organismos que induce a una movilización del metal para su posterior excreción. Histológicamente a nivel de branquias se evidenciaron en las dosis de 0,10 $\mu\text{g/l}$ de Hg pérdida de cilios en los extremos del filamento branquial, mientras que en la dosis de 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg presentaron hiperplasia o inflamación de la región apical. A nivel del hepatopáncreas se observó en la dosis de 0,10 $\mu\text{g/l}$ de Hg la pérdida de epitelio conectivo que rodea los túbulos digestivos. Para los organismos expuestos a 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg la disminución del lumen en algunos de estos conductos digestivos fue la característica más resaltante. Todo lo anterior evidencia que existen respuestas fisiológicas ante el estrés generado en los mejillones por la presencia del Hg, donde la incorporación del metal pudiera estar determinando la carga del metal en branquias y hepatopáncreas evidenciado por el patrón de acumulación de Hg.

INTRODUCCIÓN

El deterioro en ecosistemas marino-costeros debido a los vertidos industriales, domésticos y agrícolas por parte del hombre, ha captado la atención de la comunidad científica en general con el objetivo de integrar información sobre los riesgos asociados a la contaminación, presencia de los agentes contaminantes y efectos que estos producen sobre los organismos acuáticos. (Gutiérrez y Muñoz, 2003; Gerlach, 1981).

Los océanos y mares son el depósito final de la mayoría de las sustancias desechadas por el hombre. Con el tiempo, la actividad biológica favorece la descomposición de los compuestos orgánicos a dióxido de carbono y agua como producto final. Sin embargo, las especies inorgánicas, especialmente los metales pesados, están continuamente acumulándose en el medio marino, de allí deriva el interés de entender el comportamiento físico, químico y biológico de los metales en los sistemas marinos (Martínez, 2002).

Los metales pesados engloban un grupo de elementos que se encuentran disponibles en bajas concentraciones en la naturaleza. Se dividen en dos grupos, los esenciales que se requieren para el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos, incluyen al Fe, Mg, Mn, Co, Zn y Cu, y los que aún no tienen una función biológica establecida, pero son considerados como los principales contaminantes del ambiente acuático representado por el Cd, Hg, Cr y Pb (Viarengo, 1985). Estos elementos se encuentran asociados a graves problemas de salud ambiental, debido a su persistencia y capacidad para concentrarse en muchos organismos acuáticos. Su toxicidad, aún en bajas concentraciones, ha producido serios efectos sobre la salud pública (Toledo *et al.*, 2000).

Las vías por las cuales los metales pesados se incorporan a los ecosistemas acuáticos están relacionadas con las actividades antropogénicas, como las operaciones de minería y quema de combustibles fósiles, también mediante la deliberada aplicación de biocida, así como los depósitos de desechos de aguas residuales y efluentes industriales que representan el mayor aporte de contaminantes a nivel global. El efecto tóxico de los metales pesados puede ser muy variado dependiendo de la especiación del metal. En presencia de quelantes o sustancias complejas la toxicidad de los metales pesados con frecuencia es menor que cuando se encuentra en forma iónica o disponible. Muchos

organismos acuáticos permanecen vivos ante la presencia de bajas concentraciones de metales disueltos en el agua, pero al incrementarse estas concentraciones con el paso del tiempo inevitablemente se van acumulando en sus tejidos, lo cual afecta negativamente sus procesos fisiológicos (Gerlach, 1981).

Los efectos de los metales pesados se describen a manera general como alteraciones bioquímicas de los diferentes compartimientos subcelulares. El mecanismo de acumulación de metal por las células aún no está del todo claro, pero las evidencias indican que los metales atraviesan la membrana celular esencialmente por un proceso de transporte pasivo, aunque la endocitosis también puede suceder (Viarengo, 1985). Una vez que los metales atraviesan la membrana celular, ellos reaccionan con los componentes del citosol formando diferentes complejos con enlaces sulfhidrilos, quelantes y sales. Los metales también pueden enlazarse a los grupos aminos, péptidos, lípidos y a los grupos carboxilos de las proteínas. Muchas de estas proteínas son enzimas y las uniones a cationes metálicos pueden alterar su actividad catalítica (Moore, 1985; Viarengo, 1985).

El Hg es uno de los metales pesados más tóxicos debido a que todos aquellos compuestos que contienen este metal son letales al presentarse en concentraciones significativamente pequeñas. Las distintas formas del Hg exhiben características algo diferentes en cuanto a toxicidad, distribución, acumulación y tiempo de retención en el organismo (Laya, 1992).

En el pasado ocurrieron graves problemas de contaminación por Hg, siendo los más relevantes a nivel mundial, el envenenamiento colectivo en la bahía de Minamata en los años 1953-60, y Niigata en 1964-65, ocasionados por la ingesta de organismos marinos contaminados por metilmercurio, arrojando alrededor de 1 200 víctimas (Laya, 1992). Venezuela no ha sido la excepción en casos de contaminación mercurial, uno de los de mayor importancia ha sido el del golfo Triste, estado Carabobo, en donde se encontraron altos niveles de Hg provenientes de los desechos vertidos por la planta cloro-soda de la petroquímica de Morón, que provocó un gran deterioro del ambiente e intoxicación de personas por consumo de organismos contaminados. El otro caso, más alarmante, es el de Guayana, estado Bolívar, donde se han encontrado elevados niveles de Hg debido a la intensiva explotación aurífera que requiere de este metal en la técnica del sistema de dragado para la extracción de oro. Principalmente en la zona correspondiente a las cuencas del bajo Caroní donde está presente la mayor concentración del metal, ocasionando graves problemas de salud a las comunidades cercanas a la zona, por la ingesta de especies,

principalmente de peces, contaminadas con la forma química de metilmercurio (Laya, 1992).

El Hg ingresa al ambiente a través de dos vías diferentes, una es el ciclo biogeoquímico natural llevado a cabo en la biosfera y la otra son las actividades antropogénicas. El ciclo natural del mercurio involucra su descomposición mediante procesos erosivos de rocas y minerales, la evaporación del agua y posterior deposición en suelos y océanos mediante las precipitaciones y escorrentías. Entre las vías antropogénicas del Hg se incluye emisiones industriales de plantas que emplean o manufacturan componentes mercuriales, incineración de desechos, quema de combustibles fósiles, actividades mineras y el uso de fungicidas que contienen Hg. Hoy en día, la mayor contaminación por Hg reside en el ambiente acuático debido a que este elemento es transformado a partir del Hg inorgánico a metilmercurio por la biota acuática, particularmente por las bacterias sulfato-reductoras (Ochoa *et al.*, 2002; Hammersmidt *et al.*, 2004). La mayoría del metilmercurio (CH_3Hg) formado de esta manera ingresa al tejido biológico, como consecuencia, se genera una acumulación de esta forma química en los organismos acuáticos, con los subsecuentes fenómenos de biomagnificación a lo largo de la cadena trófica (Ruelas *et al.*, 2003).

Los estudios de contaminación por metales pesados tienen el propósito de diagnosticar y proteger los ecosistemas marinos costeros y la salud humana. Con este fin, se han empleado organismos centinelas como indicadores biológicos cuantitativos de la contaminación de metales pesados en el medio marino. Desde hace más de dos décadas y hasta la actualidad se ha propuesto el uso de mejillones para evaluar las tendencias espaciales y temporales de algunos contaminantes en ambientes costeros. Estos organismos acumulan los metales a partir de su alimento, del sedimento y del agua de mar en concentraciones que exceden considerablemente a las encontradas en el ambiente, además de hacerlo en proporción a las concentraciones encontradas en su alrededor (Gutiérrez y Muñoz, 2003).

Diversos estudios se han realizado empleando a los bivalvos para biomonitorizar la presencia de metales pesados. Roesijadi *et al.* (1982) establecieron la tolerancia a Hg en *Mytilus edulis* y su relación con las proteínas enlazadoras de Hg; Haynes *et al.*, (1997) compararon dos especies de bivalvos: *Donax deltoides* y *Mytilus edulis* como monitores de vertidos expuestos a metales en Australia; Bebianno y Machado (1997) utilizaron a *Mytilus galloprovincialis* como biomonitor de las concentraciones de los metales Cd, Cu, Fe, Mn, Ni y Zn, y determinaron los niveles de metalotioninas en sus tejidos; Petrovic

et al., (2001) evaluaron en la células de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* la estabilidad de la membrana lisosomal y los niveles de metalotioninas como biomarcadores; y Gutiérrez y Muñoz (2003) analizaron la variabilidad geográfica de Hg, Co, Fe y Ni en la costa de Baja California con la especie *Mytilus californianus*.

Entre los daños más frecuentes provocados por la acción de metales pesados en los bivalvos, destacan daños oxidativos a lípidos, proteínas y ADN (Nusetti *et al.*, 2004), alteración de la actividad catalítica de las enzimas involucradas en el metabolismo del ADN y ARN (Moore, 1985), así como también patologías a nivel de branquias, hepatopáncreas y músculo principalmente, como tejidos blancos expuestos a metales pesados (Gregory *et al.*, 1999, Znidaric *et al.*, 2006).

Se han realizado estudios a nivel de daños histológicos en distintos organismos marinos, Andersen y Baatrup (1988) encontraron alteraciones histológicas en branquias y hepatopáncreas del camarón *Crangon crangon* luego de someterlo a dosis de mercurio; Torreblanca *et al.* (1992) señalaron en el cangrejo rojo *Procambarus clarkii* cambios en la composición bioquímica de branquias, hepatopáncreas y músculo, particularmente en los niveles de lípidos, proteínas y glucógeno después de exposiciones subletales a Hg; Bowmer *et al.* (1994) localizaron daños histopatológicos a nivel de branquias, hepatopáncreas y gónadas en el bivalvo *Cerestodema edule* expuesto a hidrocarburos; Gregory *et al.* (1999) determinaron alteraciones histológicas en la superficie branquial del mejillón *Perna perna* sometido dosis de Hg; Bjerregaard y Deplege (2002) señalaron que cationes metálicos afectan la osmorregulación y como consecuencia la hidratación de los tejidos branquiales y del músculo del cangrejo *Carcinus maenas*; Heerden *et al.* (2004) encontraron en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* un aumento en la proliferación de células productoras de mucus del tejido branquial, así como una inducción a una mayor síntesis de metalotioninas provocada por una corta exposición a Cu; Li *et al.* (2007) describieron las alteraciones de los tejidos: branquias y hepatopáncreas de la gamba gigante *Macrobrachium rosenbergii* sometida a dosis de Cu.

Perna viridis es una de las especies de mejillón más utilizada como organismo bioacumulador de metales pesados, por su capacidad de captar y retener los iones metálicos presentes en el medio marino, mediante su alimentación por filtración y por su condición de organismo sésil en su etapa adulta. Bracho *et al.* (2000) determinaron el efecto de la alimentación sobre su condición fisiológica según el cociente ARN/ADN; Viñoles *et al.* (2000) estudiaron el efecto de la temperatura de aclimatación sobre su

crecimiento instantáneo; Caihuan y Wang (2002) estudiaron la asimilación e ingestión de metales traza por el mejillón verde en una mezcla de fitoplancton y sedimentos; mientras que Rojas *et al.* (2002) compararon los metales pesados presentes en el mejillón verde y ostras procedentes de Trinidad y Venezuela.

Rojas (2005) realizó un estudio de contaminación por mercurio en mejillones *Perna viridis* de la península de Chacopata, encontrando en el año de muestreo concentraciones máximas de $0,4 \mu\text{g/g}^{-1}$ m.s durante el mes de febrero, mientras que entre $0,10$ y $0,20 \mu\text{g/g}^{-1}$.m.s en julio y octubre, siendo el valor máximo permitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el consumo humano $0,5 \mu\text{g/g}^{-1}$.m.s (Laya, 1992). Conocida y estudiada su condición de organismo bioacumulador de metales pesados motiva a desarrollar estudios sobre los daños que le provocan determinadas concentraciones de mercurio a sus tejidos, esto con el propósito de ampliar el conocimiento en los estudios a nivel histológico en estos organismos. Por tal razón, se persigue evaluar los daños a nivel branquial y del hepatopáncreas del mejillón verde *Perna viridis* durante el proceso de exposición a dosis subletales de Hg ($0,01$; $0,05$; $0,10$ y $0,40 \mu\text{g/l}^{-1}$) en un período de 21 días.

METODOLOGÍA

DE CAMPO

Los ejemplares de *Perna viridis*, en estado juvenil, se colectaron en la localidad de Guayacán, que se encuentra situada en el noreste de la Península de Araya del estado Sucre, entre $10^{\circ} 39'$ y $10^{\circ} 41'$ de latitud norte y $63^{\circ} 47'$ y $63^{\circ} 49'$ de longitud oeste. La extracción de los especímenes se realizó en la zona costera entre 1 y 3 m de profundidad, mediante buceo libre. Los mismos fueron transportados en una cava térmica con agua de mar al Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán, en donde los organismos fueron lavados para eliminar restos de sedimentos y epibiontes adosados a sus conchas.

DE LABORATORIO

Diseño experimental

Todos los organismos fueron colocados en acuarios de PVC de 3 l, en grupos de 20 organismos por acuario. Previo a las exposiciones al metal los mejillones se aclimataron por un período de 7 días (Salinidad: 36 ‰, pH: 7,8; temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$), controlando nivel de agua, aireación continua y su alimentación con microalgas de la especie *Tetraselmis chuii*. En la fase de exposición al Hg durante 21 días, se colocaron 2 acuarios para cada dosis a emplear: 0,01; 0,05; 0,10 y 0,40 $\mu\text{g de Hg/l}^{-1}$ y controles. Diariamente fueron monitoreados todos los acuarios para el cambio del agua, adición de las dosis de Hg y alimentación con microalgas. Culminados los 21 días de exposición a las dosis los organismos se sacrificaron para su análisis.

Determinación de mercurio

Para la detección y cuantificación de mercurio en branquias y hepatopáncreas, se les determinó primero a los tejidos su masa húmeda y luego su masa seca, después de haberse colocado en una estufa por 48 horas a 60°C . Cada muestra se trató con 5 ml de ácido nítrico al 65 % y 2 ml de ácido sulfúrico al 95% (5:2 v/v) (Rojas *et al.*, 2002). El volumen obtenido fue diluido con agua desionizada en matraces aforados de 25 ml. Luego se les añadió permanganato de potasio (5% m/v), observado un cambio de coloración se le añadió 50 ml de hidroxilamina (5% m/v) para neutralizar el exceso de permanganato de potasio y, finalmente, el análisis se completó midiendo la absorbancia a 253 nm en un espectrofotómetro de absorción atómica (EAAS) a vapor frío Perkin Elmer 3110 acoplado a un sistema Mercurio-Hidruro Perkin Elmer MHS-10.

Preparación de muestras histológicas con inclusión en Parafina:

Se tomaron 8 mejillones finalizado el bioensayo y se les disectaron branquias y hepatopáncreas, estas muestras fueron fijadas en Bouin durante aproximadamente 1 hora, para mantener las condiciones biológicas del tejido, les siguió el periodo de deshidratación sumergiéndolas en etanol de 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100% en un lapso de 10 minutos en cada uno, en ese orden creciente de concentración. Continuó el proceso de clarificación colocando las muestras en xilol I, II y III de 5 a 10 minutos en cada uno. Luego se colocaron en la estufa en xilol – parafina durante 2 horas. A esto le siguió la impregnación en parafina a una temperatura de $56-60^\circ\text{C}$, se colocaron las muestras en parafina I y II

durante 1 hora cada una. Finalizado el tiempo en parafina II se procedió a colocarlas rápidamente, antes de que solidifique, en bloques de inclusión.

Una vez solidificada la parafina, los bloques se retiraron de los moldes de inclusión, quedando listos para su posterior corte. Los moldes con las muestras de tejido se colocaron en un micrótopo para realizar los cortes de aproximadamente 5 a 7 μm . Los cortes pasaron a la fase de coloración siguiendo la técnica de hematoxilina – eosina. Se sumergieron en xilol I, dos veces consecutivamente, durante un máximo de 3 minutos, luego fueron colocadas en etanol de 100, 95 y 70%, una vez en cada uno por 3 minutos, sacadas rápidamente y lavadas con agua corriente, para luego sumergirlas en la hematoxilina de 2 a 5 minutos, lavadas con agua corriente y, sumergidas en eosina de 1 a 3 minutos. Posteriormente colocadas en etanol 70, 95, 100%, en este último dos veces, por un período de 3 minutos en cada uno. Luego pasadas por una mezcla de etanol absoluto 100% y xilol (1:1) durante máximo 5 minutos y finalmente en xilol I y II por 5 minutos en cada uno. Finalmente visualizadas al microscopio óptico y fotografiadas con una cámara digital adaptada al microscopio.

Preparación de muestras histológicas con inclusión en Resina Epóxica:

Para correlacionar el procedimiento histológico con la técnica en parafina, se tomaron otros 8 mejillones para incluirlos en resina epóxica, estos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas a 4°C, luego se le realizaron 3 lavados durante 10 minutos con buffer fosfato 0.1 M y pH 7.6 para ser post-fijadas en tetróxido de osmio acuoso al 1% durante 1:30 hora. Posteriormente lavadas 2 veces con agua destilada para precontrastar con acetato de uranilo al 2% acuoso durante 10 minutos. Seguidamente fueron lavadas con agua destilada, para luego deshidratar en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 80, 90, 95, 100 y 100 %) por 10 minutos en cada uno. De allí colocadas en oxido de propileno durante 10 minutos. Finalmente colocadas en una mezcla de resina y oxido de propileno en proporciones 1:3 durante ½ hora, 1:1 por 12 hora y 3:1 durante 1 hora respectivamente. Al retirarlas de la mezcla resina y propileno 3:1 se pasaron a los moldes y se les colocó resina solamente. Una vez las muestras en los moldes se dejaron solidificar. Se realizaron cortes gruesos al ultramicrotomo y coloreadas con azul de toluidina.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos de las concentraciones de mercurio en el tejido de los mejillones de los grupos control y expuestos se analizaron mediante un análisis de varianza sencillo, modelo I con ayuda del

programa estadístico Statgrafics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACUMULACIÓN DE Hg

Durante la exposición de los organismos juveniles de *P. viridis* a Hg, se encontraron diferencias altamente significativas en el tejido branquial entre los grupos experimentales y el grupo control ($F_s = 35,61$; $p < 0,05$), presentando para los organismos expuestos a la dosis de $0,01 \mu\text{g/l}$ de Hg un valor de $0,314 \pm 0,067 \mu\text{g/g.m.s}$, descendiendo en las dosis $0,05 \mu\text{g/l}$ de Hg y $0,10 \mu\text{g/l}$ de Hg con valores de $0,102 \pm 0,044 \mu\text{g/g.m.s}$ y $0,026 \pm 0,005 \mu\text{g/g.m.s}$ respectivamente, evidenciando una disminución en la incorporación del Hg cuando la dosis supera la concentración de $0,01 \mu\text{g/l}$ de exposición, sin embargo, a la dosis de $0,4 \mu\text{g/l}$ de Hg este se incrementó con un valor de $0,169 \pm 0,068$, pero sin alcanzar el máximo valor de Hg acumulado por los expuestos a $0,01 \mu\text{g/l}$ de Hg (Fig. 1).

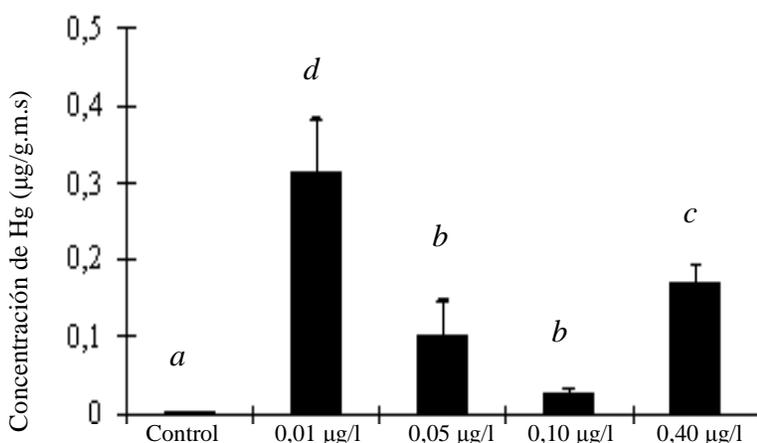


Figura 1. Contenido de mercurio ($\mu\text{g/g m.s}$) en branquias de los mejillones verdes *Perna viridis* expuestos a dosis subletales de mercurio durante 21 días.

Las branquias son estructuras que están en contacto directo con el medio acuoso donde se encuentra disuelto el metal y a la vez representan la principal vía por la cual el metal ingresa al interior del organismo (Sze y Lee, 1995; Laporte *et al.*, 2002). Estudios realizados con bivalvos en condiciones de laboratorio expuestos a diferentes metales y concentraciones, mostraron un patrón definido de incorporación del respectivo metal, en donde las concentraciones eran proporcionales al tiempo de exposición, llevando a concluir que, las branquias son una eficaz barrera capaz de llegar a retener más del 50% del metal que ingresa al interior del organismo (Andersen y Baatrup, 1988; Prakash y Jagannathan, 1995; Joiris *et al.*, 2000; Anandraj *et al.*, 2002; Laporte *et al.*, 2002; Znidaric *et al.*, 2006).

Estos resultados evidentemente sugieren que concentraciones elevadas de Hg no son incorporadas en la misma proporción que lo hacen cuando están expuestos a bajas dosis. Esto puede ser explicado mediante la función que desempeña este tejido. Las branquias son las responsables del flujo de agua que ingresa al interior de estos organismos filtradores (Krishnakumar *et al.*, 1990; Swaileh y Adelung, 1994), por lo tanto están expuestas constantemente a todo agente tóxico que se encuentre disuelto en el agua, en este caso el Hg. Los elevados niveles de mercurio en las branquias está asociado a dos aspectos relevantes, el primero de ellos es que constituye la principal vía de entrada del tóxico y su posterior acumulación en otros compartimientos u órganos de estos organismos, por ello es considerada la ruta de incorporación del metal por excelencia (Laporte *et al.*, 2002). La segunda se refiere a la gran capacidad de biotransformación del metal (Moore, 1985) lo cual es influenciado por la alta relación superficie/volumen que esta presenta. Otro aspecto que probablemente influyó en las altas concentraciones de Hg en branquias fue el cierre mecánico de las valvas de los organismos *P.viridis* en las dosis más altas, 0,10 y 0,40 μg de Hg/l. Este mecanismo ha sido reportado para la especie *P.viridis* (Chan, 1988; Yap *et al.*, 2004) y *P. perna* (Anandraj *et al.*, 2002). Estos bivalvos optan por utilizar una vía de respiración anaeróbica ante el estrés presente en el medio provocado por el metal, lo que trae consigo una disminución del metabolismo, así como en la tasa de filtración y la tasa de incorporación de oxígeno (Yap *et al.*, 2004). Por todos estos aspectos, el tejido branquial es considerado muy sensible a la acción tóxica del metal (Laporte *et al.*, 2002)

En el tejido hepático la incorporación del Hg estuvo marcada en un inicio por un patrón progresivo de acumulación, encontrándose diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control ($F_s = 8,19$; $p > 0,05$) presentando en la dosis de 0,01 μg de Hg/l un valor de $0,040 \pm 0,007$ $\mu\text{g/g.m.s}$, en la dosis de 0,05 μg de Hg/l incorpora una mayor cantidad del metal alcanzado un valor de $0,064 \pm 0,030$ $\mu\text{g/g.m.s}$, disminuyendo para la dosis de 0,10 $\mu\text{g/l}$ a $0,029 \pm 0,014$ $\mu\text{g/g.m.s}$ para finalmente aumentar nuevamente en 0,40 $\mu\text{g/l}$ a $0,047 \pm 0,023$ $\mu\text{g/g.m.s}$. (Fig. 2).

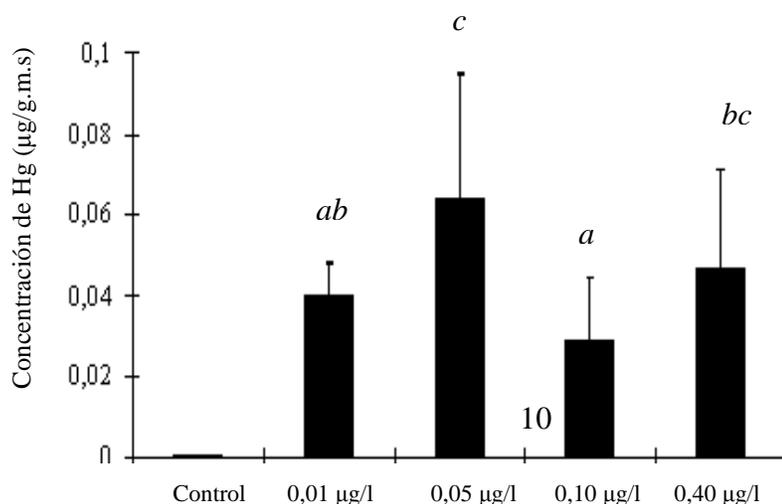


Figura 2. Contenido de mercurio ($\mu\text{g/g}$ m.s.) en hepatopáncreas de los mejillones verdes *Perna viridis* expuestos a dosis subletales de mercurio durante 21 días.

El hepatopáncreas de los moluscos bivalvos es de especial interés debido a la importancia de su función como principal órgano de actividad metabólica, y por ser el tejido de mayor afinidad hacia los iones metálicos, esto explica el hecho de que acumule elevadas concentraciones del metal (Rodríguez *et al.*, 2005). Las células del hepatopáncreas son ricas en lisosomas y estos organelos conjuntamente con proteínas enlazadoras de metales son los involucrados en los procesos de detoxificación, bien sea, por su acumulación en cuerpos residuales o a manera de excreción como materia fecal (Viarengo, 1985; Chan, 1988).

Posiblemente la acumulación del metal en el hepatopáncreas mantiene en el organismo una tasa de incorporación por debajo de la encontrada con exposición a $0,05 \mu\text{g}$ de Hg/l, lo que plantea la activación de un mecanismo de regulación del metal, que está siendo modulado por la tasa de incorporación a través de las branquias dado que las mismas presentan un patrón similar al observado en el hepatopáncreas.

Estos resultados evidencian respuestas fisiológicas ante el estrés generado en los mejillones por la presencia del Hg, donde la incorporación del metal está determinando la adición del metal en branquias y hepatopáncreas evidenciado por el patrón de acumulación de Hg. Esto se explica debido que la cantidad de metal acumulado en las branquias se distribuye luego hacia los tejidos y órganos mas sensibles a la acción de xenobióticos, particularmente el hepatopáncreas, el cual a parte de tener un gran tamaño en estos organismos, presenta gran afinidad hacia los iones metálicos debido a que contiene organelos y moléculas relacionadas con los procesos de detoxificación (Roesijadi, 1992; Alemán, 2007).

En un estudio realizado por Chan (1988) en la especie *Perna viridis* en condiciones de laboratorio sometida a Cu, Zn, Pb y Cd, estos organismos presentaron un patrón lineal de acumulación para los metales Cu, Pb y Cd, con respecto al Zn el autor señala un mecanismo de regulación de los niveles de este metal, por ser considerado esencial para el funcionamiento de muchas enzimas presentes en el organismo de estos bivalvos. Con respecto a los metales restantes no esenciales, reporta para esta

especie un mecanismo de detoxificación llevado a cabo en la glándula digestiva, lugar donde se concentra el metal para su posterior depuración a manera de gránulos o vesículas que son excretadas fuera del organismo.

Lo señalado anteriormente demuestra que la bioconcentración de Hg para branquias y hepatopáncreas disminuye al incrementarse las concentraciones del metal, esto es contrastado con el factor de bioconcentración (FBC), el cual determina la relación entre la concentración del metal dentro de los compartimientos en el organismo (tejido blando) y la concentración del metal del medio acuoso que lo circunda (Tabla 1). Esto sugiere que cuando los organismos presentaban mayor concentración del metal biodisponible, es decir, cuando las dosis son significativamente más altas, estos incorporaban menor cantidad de Hg, lo cual se pudo observar claramente a partir de la dosis de 0,05 µg/l en ambos tejidos analizados. Esto coincide con los resultados antes expresados en las figuras 1 y 2.

Tabla 1.- Factor de Bioconcentración para los tejidos de branquias y hepatopáncreas del mejillón *Perna viridis* sometidos a dosis subletales de mercurio.

Dosis	Branquias	Hepatopáncreas
0,01 µg/l	31,391 ± 0,066	3,942 ± 0,007
0,05 µg/l	2,038 ± 0,044	1,277 ± 0,030
0,10 µg/l	0,263 ± 0,005	0,285 ± 0,014
0,40 µg/l	0,421 ± 0,06	0,118 ± 0,023

N=5, FBC= Concentración de Hg en tejido/Concentración Hg en agua

Con todo lo expuesto anteriormente encontramos que el mejillón *P. viridis* logró incorporar el Hg en sus tejidos pero siguiendo un patrón bifásico en donde inicialmente se da una rápida acumulación del metal seguido por un progresivo declive en las concentraciones del metal al incrementarse las dosis de Hg, algo muy similar fue reportado por Prakash y Jagannatha (1995) para esta especie pero sometida a concentraciones subletales de los metales aluminio, plomo y cadmio.

HISTOLOGÍA BRANQUIAL

Las branquias actúan a manera de barrera biológica debido a que está localizada en una posición

fisiológica estratégica, ya que representan el límite existente entre el medio contaminado y el resto del interior del organismo (Laporte *et al.*, 2002). La estructura branquial del mejillón *P. viridis* consta de numerosos filamentos branquiales que en su base se revisten de epitelio conectivo y se constituyen de un par de lamelas branquiales, estos en su extremo apical y a los laterales presentan numerosas células ciliadas. En su interior presenta un espacio hemocélico y una capa de células epiteliales que le dan soporte a toda la estructura del filamento (Figs. 3 y 6) (Gregory *et al.*, 1999, Rodríguez *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2007).

En los organismos del grupo control las lamelas branquiales presentan en la región apical y en los laterales un gran número de células ciliadas que se proyectan desde las llamadas células epiteliales (Figs. 3d y 3e). Este tipo de célula cumple la función de oxigenar el epitelio lamelar de las branquias (Gregory *et al.*, 1999).

A los 21 días de exposición, los organismos sometidos a la dosis 0,10 µg de Hg/l presentaron una evidente disminución en el número de cilios que constituyen la superficie externa del filamento, (Figs. 4 y 7) se observa detalle de un filamento branquial de *P. viridis* donde, se muestra, una disminución en la cantidad de cilios en la región apical y en los laterales del mismo, así como desorganización del epitelio del filamento. Estos resultados concuerdan con los encontrados en Rodríguez *et al.*, (2005) quienes reportan a nivel branquial para la especie *Crassostrea angulata* sometida a dosis subletales de cobre (200 y 600 µg/l Cu²⁺) desorganización del tejido epitelial, alteración en la porción apical de las células ciliadas, hiperplasia y fusión de laminillas.

Los organismos sometidos a la dosis de 0,40 µg de Hg/l presentaron una ligera inflamación o hinchazón del tejido branquial durante los 21 días de exposición. Esta patología es denominada hiperplasia y es una de las alteraciones histológicas específica que se evidencia en presencia de agentes contaminantes. Esta lesión fue reportada por Bowmer *et al.*, (1994) en el bivalvo *Cerastodema edule* expuesto a hidrocarburos, Heerden *et al.*, (2004) en el pez *Oncorhynchus mykiss* expuesto a cobre y por Li *et al.*, (2007) en el camarón *Macrobrachium rosenbergii* expuesto a cobre. Esta alteración se caracteriza por una inflamación de las células epiteliales del filamento branquial a consecuencia de la acción tóxica del metal presente.

En las figuras 5 y 8 se evidencia la inflamación de la zona apical del filamento branquial de los organismos expuestos a la dosis 0,40 µg de Hg/l. También se observó, en la misma zona, la disminución de células ciliadas. Estos resultados aun cuando no muestran histológicamente alteraciones específicas para este metal en particular, evidencian daños titulares frecuentes en organismos marinos expuestos a metales pesados o algún otro tipo de xenobiótico.

HISTOLOGÍA DEL HEPATOPANCREAS

Histológicamente el hepatopáncreas del mejillón *Perna viridis* se constituye de un epitelio conectivo de soporte, en este se encuentran inmersos una gran cantidad de túbulos o conductos digestivos, estos en su interior se conforman de una hilera de células piramidales que a su vez también se rodean de tejido conectivo (Figs. 9 y 12) (Li *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005). En los organismos expuestos a 0,10 µg de Hg/l se encontraron anomalías en el tejido entre las que se encuentran una disminución en la superficie del tejido conectivo, oclusión de la luz en algunos conductos digestivos y reducción del epitelio que rodea los conductos digestivos (Figs. 10y 13).

Estos resultados anteriores concuerdan con lo encontrado por otros autores como el caso de Bowmer *et al.* (1994) quienes observaron en la glándula digestiva del bivalvo *Cerestodema edule* degeneración de los túbulos digestivos, mientras que Rodríguez *et al.* (2005) encontraron en el hepatopáncreas del bivalvo *Crassostrea angulata* adelgazamiento del epitelio que rodea los conductos digestivos y pérdida del tejido conectivo que los circunda.

Los organismos sometidos a la dosis de 0,40 µg de Hg/l, a nivel del hepatopáncreas presentaron, de igual manera que los de la dosis de 0,10 µg de Hg/l, reducción del lumen de algunos conductos digestivos así como también pérdida de gran parte del tejido conectivo que rodea dichas estructuras, con la diferencia que en presencia de esta dosis más elevada las lesiones se hicieron más evidentes que las encontradas en dosis anteriores (Figs. 11 y 14).

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran alteraciones histológicas tanto en branquias como en hepatopáncreas, sin embargo, estas alteraciones han sido reportadas por exposiciones a diferentes xenobióticos, no solamente metales pesados (Gregory *et al.*, 1999, Laporte *et al.*, 2002, Rodríguez *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2007) por lo que no sería una respuesta específica ante la presencia del Hg como elemento sino más bien de las dosis del mismo empleadas en esta experiencia.

Por ello, es necesario realizar estudios más detallados para determinar el sitio de la célula donde se encuentra el metal, su movilización y nivel de donde pudiera estar actuando, además de corroborarlos con determinaciones bioquímicas bien detalladas en trabajos con biomarcadores de toxicidad por metales pesados. En este sentido, Newton y Cope (2006), señalan que son necesarios mayores estudios de histología, que permitan asociar la relación entre el tóxico y las alteraciones histopatológicas.

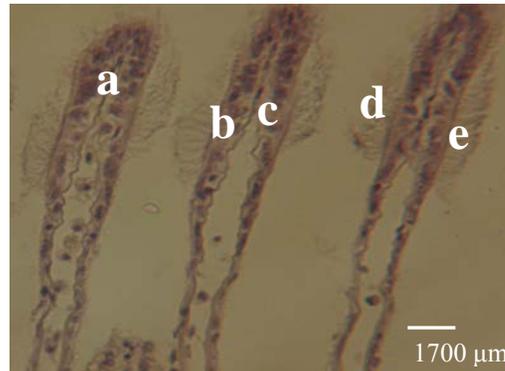


Figura 3. Tejido branquial de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión en Parafina. Coloración H & E. a: filamento branquial, b y c: lamelas branquiales, d y e: células ciliadas.

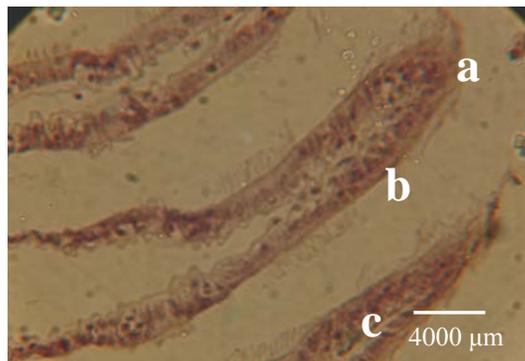


Figura 4. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis 0,10 μg/l de Hg durante 21 días. Inclusión en parafina. Coloración H & E. a: zona apical del filamento con pérdida de cilios, b: zona lateral del filamento con pérdida de cilios, c: fusión de las lamelas branquiales.

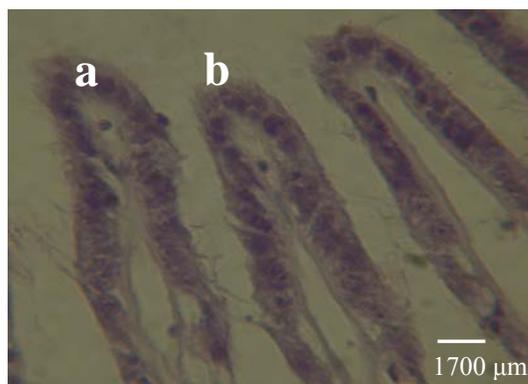


Figura 5. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg durante 21 días. Inclusión en Parafina. Coloración H & E. a: hiperplasia (engrosamiento) de la región apical del filamento, b: pérdida de células ciliadas de la zona apical.

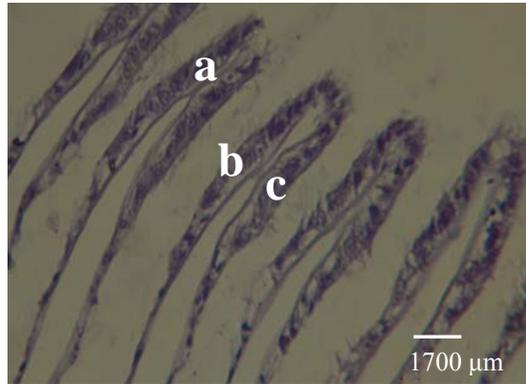
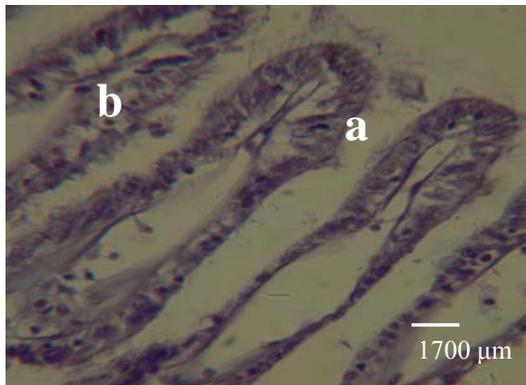


Figura 6. Tejido normales de

Coloración Azul de Toluidina. a: filamento branquial, b y c: lamelas branquiales.



branquial de *P. viridis* en condiciones laboratorio. Inclusión en Resina.

Figura 7. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis de mercurio de 0,10 $\mu\text{g/l}$ de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: zona lateral con pérdida de células ciliadas, b: desorganización del epitelio del filamento branquial.

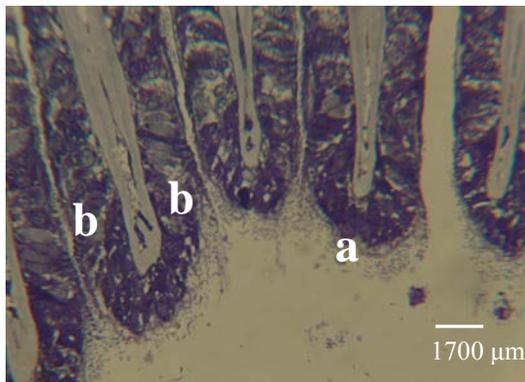


Figura 8. Tejido branquial de *P. viridis* expuesto a dosis de mercurio de 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: zona apical con pérdida de células ciliadas, b: hiperplasia (inflamación) de la lamela branquial.

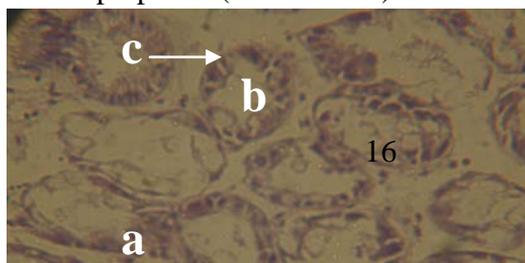


Figura 9. Hepatopáncreas de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: epitelio conectivo de soporte, b: túbulos digestivos, c: células piramidales que rodea el túbulo digestivo.

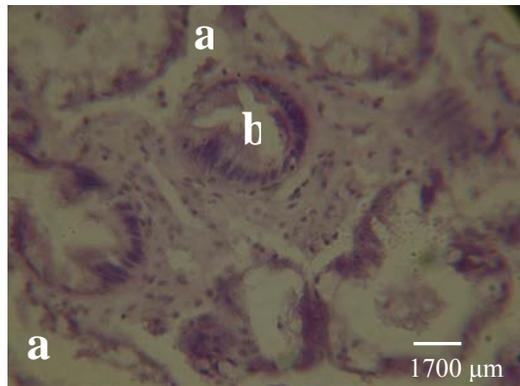


Figura 10. Hepatopáncreas de *P. viridis* expuesto a 0,10 μg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos.

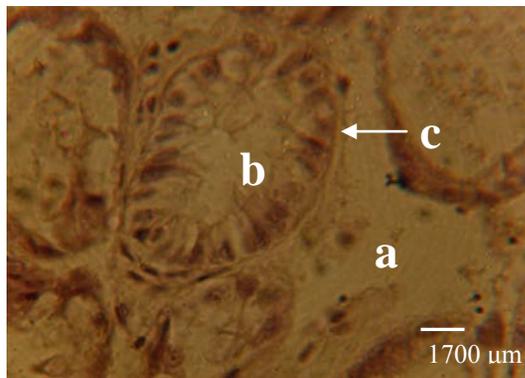


Figura 11. Hepatopáncreas de *P. viridis* expuesto a 0,40 μg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Parafina. Coloración H & E. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos, c: adelgazamiento del epitelio que rodea el túbulo digestivo.

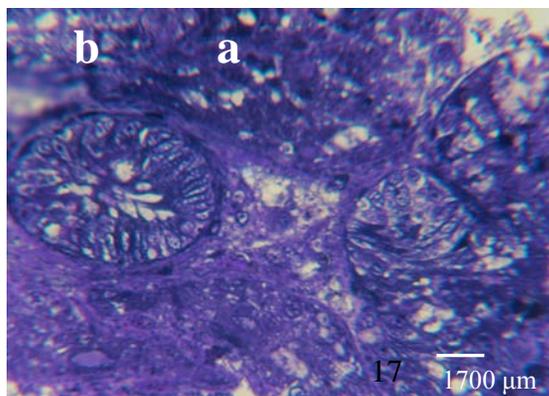


Figura 12. Hepatopáncreas de *P. viridis* en condiciones normales de laboratorio. Inclusión Resina Epóxica. Coloración Azul de Toluidina. a: epitelio conectivo de soporte, b: túbulo digestivo.

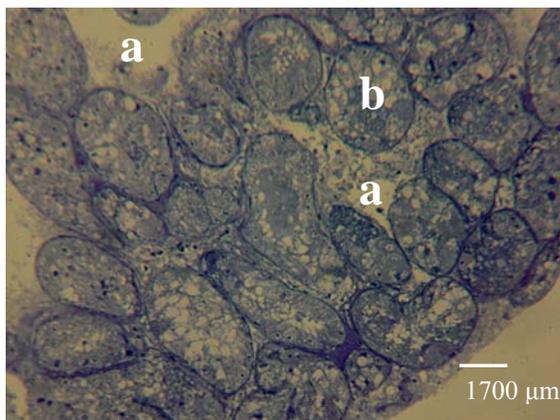


Figura 13. Hepatopáncreas de *P. viridis*. expuesto a 0,10 μg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina Epóxica. Coloración Azul de Toluidina. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos.

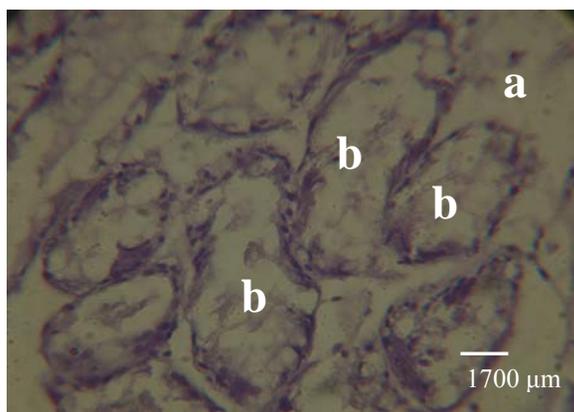


Figura 14. Hepatopáncreas de *P. viridis* expuesto a 0,40 μg de Hg/l durante 21 días. Inclusión Resina. Coloración Azul de Toluidina. a: pérdida del tejido conectivo, b: oclusión del lumen de los túbulos conectivos, c: adelgazamiento del epitelio que rodea el túbulo digestivo.

CONCLUSIONES

La incorporación de Hg en las branquias y hepatopáncreas del mejillón *P. viridis* experimentó un comportamiento dosis-respuesta hasta la concentración de 0,05 µg/l, a partir de 0,10 µg/l disminuyó la entrada del tóxico señalando que existe un mecanismo para la incorporación del mismo.

El factor de bioconcentración para los tejidos branquias y hepatopáncreas aumenta en función del incremento en la concentración de Hg debido a un cierre valvar evidente en los dosis de 0,10 y 0,40 µg/l.

Al analizar correlativamente los tejidos branquias y hepatopáncreas en parafina y resina por acción tóxica del Hg las alteraciones histológicas se dilucidaron mejor con la técnica de inclusión en resina epóxica.

Las branquias presentaron pérdida de cilios en los extremos de los filamentos branquiales en los organismos sometidos a las dosis de 0,10 µg/l y una inflamación (hiperplasia) en la zona apical del filamento en los organismos sometidos a 0,40 µg/l.

El hepatopáncreas presentó oclusión del lumen de algunos conductos digestivos en los organismos sometidos a la dosis de 0,10 µg/l y reducción del epitelio que rodea los conductos digestivos en los organismos sometidos a la dosis de 0,40 µg/l.

RECOMENDACIONES

Para obtener resultados más confiables en estudios realizados a nivel histológico por la acción tóxica de metales pesados, se hace indispensable el empleo de técnicas más específicas para la determinación de las lesiones presentes en algún tejido en particular. Por tal motivo se recomienda la aplicación de técnicas histoquímicas que estén enfocadas a detectar la deposición del metal en el tejido como la microscopía electrónica de transmisión/energía dispersiva de rayos x.

BIBLIOGRAFÍA

- Alemán, L. 2007. Citotoxicidad del mercurio en el mejillón verde *Perna viridis* (l. 1758) (Mollusca: Bivalvia). Trabajo de Grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela.
- Anandraj, A.; Marshall, D.; Gregory, M. y McClurg, T. 2002. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comp. Biochem. Physio.*, 132C: 355- 363.
- Andersen, J. y Baatrup, E. 1988. Ultraestructural localization of mercury accumulations in the gills, hepatopáncreas, midgut, and antennal glands of the brown shrimp, *Crangon crangon*. *Aquat. Toxicol.*, 13: 309-324.
- Bebiano, M. y Machado, M. 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Mar. Poll. Bull.*, 34 (8): 666-671.
- Bjerregaard, P. y Deplege, M. 2002. Trace metal concentrations and contents in the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*: effects of size and tissue hydration. *Mar. Biol.*, 141: 741-752.
- Bowmer, T. y Jenner, H. 1994. The detection of chronic biological effects in the marine intertidal bivalve *Cerastodema edule*, in model fuel ash: reproduction and histopathology. *Environ. Poll.*, 85: 191-204.
- Bracho, M.; Segnini, M.; Viñoles, I. y Chung, K. 2000. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el cociente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.*, 48(1): 171-182.
- Caihuan, K. y Wang, W. 2002. Trace metal ingestion and assimilation by the green mussel *Perna viridis* in phytoplankton and sediment mixture. *Mar. Biol.*, 140: 327-335.
- Chan, H. 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, cooper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 48: 295-303.
- Cuartas, E.; Díaz, A. y Petriella, A. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Decapada). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.*, 15: 5-13.
- Gerlach, S. 1981. *Marine Pollution. Diagnosis and Therapy*. Springer- Verlag. New York.
- Gregory, M.; George, R.; Marshall, D.; Anandraj, A. y McClurg, T. 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar. Poll. Bull.*, 39: 116-121.
- Gutiérrez, E. y Muñoz, A. 2003. Variabilidad geográfica de la concentración de Hg, Co, Fe y Ni en mejillones *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) de la Costa de Baja California. *Cienc. Mar.*, 29

(1): 21-34.

- Hammershmidt, C.; Fitzgerald, W.; Lamborg, C.; Balcom, P. y Visscher, P. 2004. Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island sound. *Mar. Chem.*, 90: 31-52.
- Haynes, D.; Leeder, J. y Rayment, P. 1997. A comparison of the bivalve species *Donax deltoids* and *Mytilus edulis* as monitors of metal exposure from effluent discharge along the ninety mile beach, Victoria, Australia. *Mar. Poll. Bull.*, 34 (5): 326-331.
- Heerden, D.; Vosloo, A. y Nikinmaa, M. 2004. Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF- 1 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 69: 271-280.
- Joiris, C.; Hoslbeek, L. y Otchere, F. 2000. Mercury in the bivalves *Crassostrea tulipa* and *Perna perna* from Ghana. *Mar. Poll. Bull.*, 40(5): 457-460.
- Krishnakumar, P.; Damodaran, R. y Nambisan, P. 1990. Accumulation, distribution and depuration of mercury in the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus). *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*, 99 (4): 345-352.
- Laporte, J.; Truchot, J.; Mesmer-Dudons, N. y Boudou, A. 2002. Bioaccumulation of inorganic and methylated mercury by the gills of the shore crab *Carcinus maenas*: transepithelial fluxes and histochemical localization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 231: 215-228.
- Laya, W. 1992. Determinación del contenido mercurial en tejidos de peces, de sedimentos y agua del bajo Caroní y zona de confluencia en el río Orinoco. Edo. Bolívar-Venezuela. Tesis de pregrado (Modalidad: pasantía). Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Li, N.; Zhao, Y. y Yang, J. 2007. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopáncreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 53: 73-79.
- Martínez, G. 2002. Metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanog. Venezuela, Univ. Oriente.*, 41 (1 y 2): 83-96.
- Moore, M. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Poll. Bull.*, 16 (4): 134-139.
- Moore, M. 1991. Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals. *Histochemical Journal.*, 23: 495-500.
- Newton, T. Y Cope, G. 2006. Biomarker responses of unionid mussels to environmental contaminants. En: *Freshwater bivalve ecotoxicology*. Farris, J. y Van Hassel, J. (eds). Cambridge University press, Cambridge. Págs. 257-284.
- Nusetti, 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 N° 6. *Interciencia.*, 29(6):324-328.

- Ochoa, H.; Sepúlveda, M. y Gross, T. 2002. Mercury in feathers from Chilean birds: influence, of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 340- 390.
- Petrovic, S.; Ozretic, M.; Krajnovic-Ozretic, M. y Bobinac, D. 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers in field study. *Mar. Poll. Bull.*, 42 (12): 1373-1378.
- Prakash, T. y Jagannatha, K. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metals exposure. *Mol. y Cell. Biochem.*, 146: 107-113.
- Rodríguez, A.; Arellano, J.; González, M.; Blasco, J. y Sarasquete, C. 2005. Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*. *Cienc. Mar.*, 31(3): 455-466.
- Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicol.*, 22: 81-114.
- Roesijadi, G.; Drum, A.; Thomas, J. y Fellingham, W. 1982. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. *Mar. Poll. Bull.*, 13(7): 250-253.
- Rojas, L.; Chang-Yen, I.; Haggard, J., Bekele, I. y Hubbard, R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oysters (*Crassostrea* sp.) from Trinidad and Venezuela. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 410-415.
- Rojas, N. 2005. Metalotioninas como mecanismo de alarma por contaminación de mercurio (Hg) en *Perna viridis* provenientes de 2 zonas del Estado Sucre, Península de Araya y Península de Paria, Edo. Sucre, Venezuela. Trabajo de Grado. Maestría en Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Ruelas, J.; Horvat, M.; Pérez, H. y Páez, F. 2003. Distribución de metilmercurio y mercurio en tejidos de ballenas grises (*Eschritius robustus*) y delfines tornillos (*Stenella longirostry*) varados en bajo golfo de california, México. *Cienc. Mar.*, 29 (1): 1-8.
- Swaileh, K. y Adelung, D. 1994. Levels of trace metals and effect of body size on metal content and concentration in *Artica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic. *Mar. Poll. Bull.*, 28 (8): 500-505.
- Sze, P. y Lee, S. 1995. The potential role of mucus in the depuration of cooper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Poll. Bull.*, 31 (4-12): 390-393.
- Toledo, J.; Lemus, M. y Cheng, K. 2000. Cobre, cadmio y plomo en el pez *Cyprinodon dearborni*, sedimentos y agua en dos lagunas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 48 (1): 225-231.

- Torreblanca, A.; Del Ramo, J. y Díaz, J. 1992. Changes in biochemical composition of gills, hepatopancreas and muscle of the red crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) after sublethal exposure to mercury. *Comp. Biochem. Physio.*, 102C (2): 247-252.
- Viarengo, A. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bull.*, 16 (4): 153-158.
- Viñoles, I.; Segnini, M.; Bracho, A. y Chung, K. 2000. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el cociente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.*, 48 (1): 159-170.
- Yap, C.; Ismail, A.; Tan, S. y Rahim, I. 2004. Assessment of different soft tissue of the green lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) as biomonitoring agents of Pb: field and laboratory studies. *Water, Air and Soil Pollution.*, 153: 253-268.
- Znidaric, M.; Falnoga, I.; Skreblin, M. y Turk, V. 2006. Induction of metallothionein like proteins by mercury and distribution of mercury and selenium in the gill tissues in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biological Trace Element Research.*, 111: 121-135.

APÉNDICES

Apéndice 1.- Análisis de varianza (95 % de confiabilidad) para el contenido de mercurio en branquias del mejillón *P. viridis* expuesto a dosis subletales de mercurio durante 21 días.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	Coeficiente Fs
Entre las dosis de mercurio	0,317235	4	0,0793088	35,61***
Dentro de las dosis de mercurio	0,0445484	20	0,00222742	
Total	0,361783	24		

***= Existen diferencias altamente significativas

Apéndice 2.- Análisis de varianza (95 % de confiabilidad) para el contenido de mercurio en el hepatopáncreas del mejillón *Perna viridis* expuesto a dosis subletales de mercurio durante 21 días.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	Coeficiente Fs
Entre las dosis de mercurio	0,0113256	4	0,00283139	8,19*
Dentro de las dosis de mercurio	0,00691306	20	0,000345653	
Total	0,0182386	24		

* Existen diferencias significativas

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	HISTOPATOLOGÍA DE BRANQUIAS Y HEPATOPÁNCREAS DEL MEJILLÓNVERDE <i>Perna viridis</i> (BIVALVIA: MYTILIDAE) EXPUESTO A DOSIS SUBLETALES DE MERCURIO
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
PALACIOS RODRIGUEZ, ZAILÉ DE JESÚS	CVLAC	15 933 369
	e-mail	zaileanion@gmail.com
	e-mail	zaile_82@yahoo.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Perna viridis</i> , branquias, hepatopáncreas, mercurio, histología

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Biología	Ecotoxicología

Resumen (abstract):

En la presente investigación se analizó la histología de branquias y hepatopáncreas del mejillón *Perna viridis* expuesto a dosis subletales de mercurio. Para ello se realizaron bioensayos de forma estática durante 21 días con renovación de agua y metal cada 24 horas. Se utilizaron 4 dosis subletales del metal: 0,01; 0,05; 0,10 y 0,40 $\mu\text{g/l}$ y el control. A los 21 días de exposición se disectaron branquias y el hepatopáncreas de 6 organismos, para determinar la incorporación de mercurio en ambos tejidos mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica. El resto de las muestras de los tejidos fueron utilizados para realizar las evaluaciones histológicas mediante las técnicas de inclusión en parafina y resina epóxica, aplicando luego la tinción con Hematoxilina- Eosina y Azul de Toluidina respectivamente. En esta primera fase experimental se demostró la incorporación del mercurio en las branquias, siendo esta mayor cuando los ejemplares son expuestos a 0,01 $\mu\text{g/l}$, mientras que en dosis superiores no son incorporadas con la misma magnitud. En el caso del tejido hepático se observó la mayor concentración en la dosis de 0,05 $\mu\text{g/l}$, presentándose en dosis mayores el mismo comportamiento de las branquias. Estos resultados señalan que no existe una relación dosis-respuesta para estas dosis del metal bajo estas condiciones, probablemente asociado a diversas razones, entre estas que los organismos permanecieron con sus valvas cerradas durante las dosis 0,10 y 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg evidenciando que existe un mecanismo para la incorporación del mismo. Otra pudiera estar asociada a una activación del sistema de defensa de estos organismos que induce a una movilización del metal para su posterior excreción. Histológicamente a nivel de branquias se evidenciaron en las dosis de 0,10 $\mu\text{g/l}$ de Hg pérdida de cilios en los extremos del filamento branquial, mientras que en la dosis de 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg presentaron hiperplasia o inflamación de la región apical. A nivel del hepatopáncreas se observó en la dosis de 0,10 $\mu\text{g/l}$ de Hg la pérdida de epitelio conectivo que rodea los túbulos digestivos. Para los organismos expuestos a 0,40 $\mu\text{g/l}$ de Hg la disminución del lumen en algunos de estos conductos digestivos fue la característica más resaltante. Todo lo anterior evidencia que existen respuestas fisiológicas ante el estrés generado en los mejillones por la presencia del Hg, donde la incorporación del metal pudiera estar determinando la carga del metal en branquias y hepatopáncreas evidenciado por el patrón de acumulación de Hg.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Lemus Mairin	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6 429 405
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	
Velásquez Carlos	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5 186 829
	e-mail	cajovel@hotmail.com
	e-mail	
Martins Carmen	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11 376 329
	e-mail	beatrizmh17@hotmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
01	08	2008

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
zailé palacios-tesis	Word

Alcance:

Espacial : Universal (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Investigación

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Biología

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

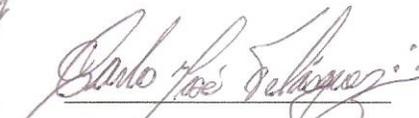
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Yo, Zailé de Jesús Palacios Rodríguez, de cédula Nro. 15 933 369, estudiante de la Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, acepto que este trabajo sea utilizado como fuente de información para futuras investigaciones en el área. No está permitida la reproducción total o parcial de esta tesis de grado, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito del autor.


AUTOR 1


ASESORA


JURADO 1


JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



