



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

**PROTEÍNAS ENLAZADORAS DE CADMIO EN HEMOLINFA DEL
MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (Mollusca: Bivalvia) (Modalidad:
Tesis de grado)**

ANA TERESA FERNÁNDEZ SUÁREZ

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

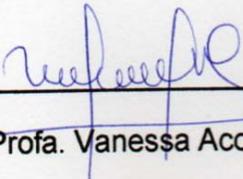
CUMANÁ, 2012

**PROTEÍNAS ENLAZADORAS DE CADMIO EN HEMOLINFA DEL
MEJILLÓN VERDE *Perna viridis* (Mollusca: Bivalvia)**

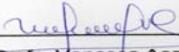
APROBADO POR:



Profa. Mairin Lemus



Profa. Vanessa Acosta
Jurado Principal



Profa. Vanessa Acosta
Jurado Principal



Prof. Edgar Zapata
Jurado Principal

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE | i |
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| LISTA DE TABLAS | iv |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| RESUMEN | vi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| METODOLOGÍA | 5 |
| Obtención de los organismos | 5 |
| Bioensayo de exposición subletal | 5 |
| Extracción de hemolinfa | 5 |
| Determinación de la incorporación de cadmio en los tejidos | 6 |
| Cuantificación de proteínas en plasma y células de la hemolinfa..... | 7 |
| Separación de proteínas del plasma y células de la hemolinfa | 7 |
| Determinación del contenido de cadmio en plasma y células de la hemolinfa..... | 7 |
| Masa molecular aparente de las proteínas enlazadoras de cadmio | 8 |
| Análisis estadísticos | 8 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 9 |
| Incorporación de cadmio en los tejidos analizados..... | 9 |
| Proteínas enlazadoras de cadmio en la fracción plasmática y celular de la hemolinfa..... | 12 |
| CONCLUSIONES | 19 |
| BIBLIOGRAFÍA | 20 |
| HOJA DE METADATOS | 24 |

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso, el Divino niño y mi angelito de la guarda.

AGRADECIMIENTOS

A Diosito lindo por todas las bendiciones que me ha dado y por haberme guiado por el buen camino.

A mis padres y hermanos por todo el amor y el apoyo recibido a lo largo de mi vida.

A Ángel por estar ahí en todo momento, amándome, ayudándome, apapachándome y dándome ánimo en los momentos más difíciles de mi carrera.

A mi hija por estar ahí siempre con una sonrisa, una linda mirada o incluso con una travesura, pero llenándome de amor y satisfacciones cada día.

A mi exclusivo staff de niñeras Anita, María Ynés y Lorena, les agradezco mucho, las quiero un montón y junto con mi esposo y mi hija las considero mi familia cumanesa.

A mi asesora Mairin Lemus por todo el conocimiento transmitido y al técnico Prin del ICP-IIBCA por toda su colaboración.

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|---|
| Tabla 1. Resultados de las pruebas Mann-Whitney (Wilcoxon) para evaluar diferencias entre grupos controles y expuestos (a 1 mg/L de Cd x 48 h) para cada tejido de <i>Perna viridis</i> estudiado. | 9 |
|--|---|

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Concentraciones medias de cadmio registradas en la hemolinfa (A), hepatopáncreas-gónadas (B) y manto (C) del mejillón verde *P. viridis* después de 48 horas de exposición a 1 mg/L de cadmio..... 10
- Figura 2.** Perfiles cromatográficos de proteínas en la fracción plasmática de la hemolinfa para los grupos controles (A) y expuestos (B) del mejillón verde *P. viridis*, después de 48 h de exposición a 1 mg/L de Cd, y porcentaje de cadmio (C) en esta fracción..... 14
- Figura 3.** Perfiles cromatográficos de proteínas en la fracción celular de la hemolinfa para los grupos controles (A) y expuestos (B) del mejillón verde *P. viridis*, después de 48 h de exposición a 1 mg/L de Cd, y porcentaje de cadmio (C) en esta fracción. 15

RESUMEN

El problema de la contaminación es múltiple, se presenta en formas diversas y las principales consecuencias biológicas derivan de sus devastadores efectos sobre la vida. En este sentido, se han dirigido diversas investigaciones a la selección de organismos modelos como biomarcadores, tanto bioquímicos como fisiológicos, apropiados para evaluar su condición biológica en áreas impactadas por contaminantes. En el presente trabajo se evaluó la incorporación de cadmio (Cd) en diferentes tejidos (hemolinfa, hepatopáncreas y manto) y las proteínas enlazadora de Cd en las fracciones plasmáticas y celular de la hemolinfa, de ejemplares de *Perna viridis* recolectados en el corredor comprendido entre Chacopata y Taguapire, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Los organismos se expusieron a una concentración de 1ppm de Cd durante 48 horas (grupos experimentales). En la hemolinfa, se registraron concentraciones medias en los grupos controles de 0,00 $\mu\text{g Cd / mL}$ de hemolinfa y para los grupos expuestos de 0,19 $\mu\text{g Cd / mL}$ de hemolinfa, denotando diferencias significativas ($p = 0,027$). En el hepatopáncreas-gónadas, para los grupos no expuestos, las concentraciones del metal fueron 0,10 $\mu\text{g Cd / g}$ hepatopáncreas y para los grupos expuestos 18,20 $\mu\text{g Cd / g}$ hepatopáncreas, también significativamente diferentes ($p = 0,002$). En el manto, igualmente se observaron diferencias significativas ($p = 0,002$) en cuanto al contenido de cadmio entre los organismos controles (0,069 $\mu\text{g Cd / g}$ manto) y los organismos expuestos (10,77 $\mu\text{g Cd / g}$ manto). La acumulación de cadmio es menor y temporal en la hemolinfa, concentrándose los mayores niveles del metal en el manto y en el hepatopáncreas-gónadas, para su quelación y posterior eliminación. Con respecto a las proteínas evaluadas, en ambas fracciones de la hemolinfa (plasma y células) se observó un comportamiento similar entre los perfiles cromatográficos, a 280 nm y 245 nm, tanto en los organismos controles como expuestos, pudiéndose notar dos grupos proteicos enlazadores del Cd, uno de bajo peso molecular ($< 12,4$ KDa) y otro de mayor peso molecular ($> 12,4$ KDa e incluso mayores a 29 KDa); sin embargo, la fracción celular fue la que tuvo mayor capacidad de enlazamiento con el metal (con un máximo de 25% Cd).

Palabras claves: Cadmio, bioacumulación, proteínas enlazadoras de metales.

INTRODUCCIÓN

La contaminación marina es un hecho bien conocido y uno de los problemas más generalizados en el mundo, la cual ha traído como consecuencia la alteración de muchos ecosistemas marinos costeros, por lo que en los últimos años ha surgido un creciente interés por estudiar el deterioro de las zonas costeras de las regiones tropicales. La contaminación de los ecosistemas acuáticos se ha originado fundamentalmente por el exacerbado desarrollo industrial y rápido crecimiento de las regiones aledañas a éstos, trayendo como consecuencia que ciertos productos químicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos policlorados y metales pesados, resultado de las actividades humanas, sean vertidos diariamente a los mares (Araúz *et al.*, 2009).

Particularmente los metales pesados, engloban un conjunto de elementos que, en líneas generales, se caracterizan por no ser degradables, tener una elevada persistencia en el medio, capaces de ser incorporados y acumulados por los organismos, por lo que las constantes emisiones de éstos al medio pueden causar abruptas modificaciones en los ecosistemas, poniendo en peligro cualquier forma de vida. Uno de los contaminantes que frecuentemente se encuentra en los espacios acuáticos es el Cadmio (Cd). Este metal se localiza en mayores concentraciones en las aguas costeras, producto de la interacción océano-continente (Valdés *et al.*, 2006). El Cd presenta gran interés desde el punto de vista toxicológico, debido a su gran versatilidad de usos en la fabricación de pigmentos, pinturas y colorantes, en procesos de galvanizado, fundición, producción de fertilizantes, producción de hierro y zinc, refinación de aceites, manufactura de baterías y en la industria petroquímica (Forero y Sierra, 2004). Sus efectos biológicos en organismos expuestos incluyen alteraciones hematológicas, metabólicas e inmunitarias, entre otras (Rodríguez *et al.*, 2005); todo ello como resultado de su bajo nivel de excreción y su poder de bioacumulación progresivo.

Como consecuencia de la presencia de contaminantes en las zonas costeras, particularmente de elementos inorgánicos, muchos organismos se han visto afectados fisiológica y bioquímicamente. En este sentido, se han dirigido diversas investigaciones a la selección de organismos modelos y biomarcadores, tanto bioquímicos como fisiológicos, apropiados para evaluar su condición biológica en áreas impactadas por contaminantes (Zapata-Vívenes *et al.*, 2005). Siendo los biomarcadores una herramienta valiosa para estudios y programas de manejo preventivo en los ecosistemas (Narváez *et al.*, 2005).

Entre los organismos utilizados en estudios de monitoreo de contaminación se pueden mencionar los poliquetos: *Arenicola marina* (L.), que tiene la capacidad de desintoxicación del sulfuro a distintas presiones parciales de oxígeno (Hauschild y Grieshaber, 1997); al igual que *Eurythoe complanata*, que metaboliza y acumula hidrocarburos y metales pesados durante periodos moderados o intensos de exposición a dichos contaminantes (Nuseti *et al.*, 2005; Zapata-Vívenes *et al.*, 2005, Marcano *et al.*, 2006;). Aunque los más ampliamente usados como biomonitores son los moluscos bivalvos como, por ejemplo, *Crassostrea angulata*, *Mytilus* sp. y *Perna viridis* (Rojas *et al.*, 2002, Rojas *et al.*, 2009, Lemus *et al.*, 2010).

Perna viridis es una especie nativa del Indo-Pacífico, que logró colonizar exitosamente las costas orientales de Venezuela (Prieto *et al.*, 2009) pudiendo ser utilizada como biomonitor en contaminación ambiental *in situ* en ecosistemas marinos y en áreas intervenidas (Villamar y Cruz, 2007) por su naturaleza sedentaria y filtradora (Pichaud *et al.*, 2008), capacidad de bioacumulación, abundancia, vida media larga, también porque son manejables y fácilmente aclimatables a condiciones experimentales (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los metales que se encuentran biodisponibles en el entorno de los organismos acuáticos pueden ser incorporados fácilmente mediante mecanismos de difusión pasiva, a través del epitelio branquial y subsecuentemente son transportados a través

de la hemolinfa a los diferentes compartimientos tisulares, siendo el hepatopáncrea, el manto y otros tejidos, los que generalmente incorporan mayor concentración de metales (Lemus *et al.*, 2010).

Todos los organismos disponen de un sistema de defensa que los protege, pudiendo así diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos (Costa, 2008). En el caso de los moluscos, dicho sistema de defensa está presente principalmente en la hemolinfa, constituida por células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral (Vargas y Barracco, 2001). Sin embargo, existen diferentes opiniones relacionadas con el número y tipo de hemocitos en los bivalvos, específicamente en los mejillones, así como en lo que se refiere a la clasificación celular (Soares *et al.*, 2002). Los bivalvos, han podido desarrollar distintos mecanismos de tolerancia para enfrentar el exceso de metales pesados en sus células, entre estos se pueden mencionar: unión del metal a la membrana celular impidiendo su entrada al interior de la célula, síntesis de proteínas o metabolitos de estrés que actúan como protectores o reparadores de los daños celulares producidos por el metal y formación de complejos con proteínas como metalotioneínas, las cuales son proteínas enlazadoras de metales cuya síntesis es inducida ante perturbaciones ambientales, de manera de atrapar el metal disminuyendo su concentración de forma libre en la célula (Reyes, 1999).

Existen pocos reportes de proteínas que enlazan metales de manera específica en la hemolinfa, sin embargo, se han registrado proteínas enlazadoras de zinc en *Mytilus edulis*, las cuales enlazaron el 80% del zinc total en la hemolinfa (George y Pirie, 1980). Para esta misma especie, también ha sido reportada una glicoproteína con alto contenido de histidina (13,7%) llamada glicoproteína rica en histidina (HRG) (Nair y Robinson, 1999). Por otro lado, Granadillo (2007) sugiere que la captación de cadmio en la hemolinfa de *P. viridis* se debe a que este fluido actúa como un compartimiento temporal para acumular dicho metal, encontrándose en mayor

concentración en el plasma que en hemocitos, probablemente debido a que el plasma tiene proteínas con mayor afinidad por el metal; en este mismo sentido, señala, que en *P. viridis* una molécula de baja masa molecular capaz de enlazar metales, la cual presumiblemente tiene la capacidad de incorporar el cadmio durante la acumulación y depuración; sin embargo, este péptido no ha sido señalado por otros autores. En vista de lo anteriormente planteado, este trabajo pretende determinar proteínas que enlazan metales en la hemolinfa de ejemplares de *P. viridis*, en presencia de cadmio durante exposiciones subletales.

Aunque no existen trabajos que señalen de forma categórica la participación de proteínas enlazadoras de cadmio en la hemolinfa de *P. viridis*, se han realizado algunos estudios importantes que indican la participación de diversas proteínas que se unen al cadmio en organismos marinos (Granadillo, 2007), sugiriendo que existe un mayor enlazamiento de cadmio a proteínas de la fracción de plasma durante exposiciones subletales, y aunque no se logró determinar proteínas enlazadoras de este metal en hemocitos, el metal fue detectado. Por consiguiente, en el presente trabajo se plantea realizar bioensayos de corta duración con exposiciones subletales a Cd en *Perna viridis*, con el objeto de identificar y caracterizar parcialmente proteínas enlazadoras de este metal en plasma y hemocitos.

METODOLOGÍA

Obtención de los organismos

Ejemplares adultos de *Perna viridis* se colectaron durante el mes de agosto mediante buceo libre, a profundidades entre 2 y 7m, entre las localidades de Chacopata y Taguapire, Península de Araya.

Los organismos se transportaron en contenedores de anime, al Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán (UDO), donde fueron aclimatados por un período 24 h en acuarios previamente preparados con arena, piedras y agua de mar provenientes del sitio de captura (salinidad: 36‰, pH: 7,8; temperatura: $25 \pm 1^\circ \text{C}$), con aireación constante. Terminado dicho periodo, se escogieron animales con tallas y pesos promedios aproximados de 7,0 x 3,2 cm (largo x ancho) y 13,4 g respectivamente, para realizar los análisis.

Bioensayo de exposición subletal

Los organismos se colocaron en acuarios de 3 litros de capacidad, que contenían agua de mar filtrada, 1 mg/L de cadmio (en forma de CdCl_2 SIGMA), aireación constante y fueron cubiertos para evitar evaporación (grupos expuestos A, B y C). Los individuos permanecieron durante 48 h de exposición. Los grupos controles (a, b y c) estuvieron en acuarios con agua de mar sin metal. En todos los acuarios, una vez transcurridas 24 h de exposición, se realizó recambio de agua y metal (este último solo en los grupos expuestos), también se hizo un registro de la temperatura, salinidad y pH del agua. Los acuarios se monitorearon a objeto de determinar mortalidad en alguno de ellos.

Extracción de hemolinfa

Después del periodo de exposición, los ejemplares fueron limpiados y lavados

cuidadosamente eliminando adherencias en la concha, evitando así posibles contaminantes externos.

Posteriormente, los mejillones se disectaron extrayendo la mayor cantidad posible de fluido celómico del músculo aductor y del sistema circulatorio, utilizando jeringas de 5 mL de capacidad. Dicho fluido se colocó en viales debidamente rotulados y el 70% de estas muestras se centrifugaron a 4 000 g durante 20 min. Seguidamente, se separaron las fracciones de sobrenadante y precipitado resultantes (plasma y células, respectivamente) colocando la primera de ellas en otro vial previamente rotulado, finalmente se procedió a congelar hasta su uso tanto las fracciones resultantes luego de la centrifugación como las muestras de hemolinfa que no fueron separadas.

Determinación de la incorporación de cadmio en los tejidos

Se utilizó 1mL de hemolinfa completa y en cuanto a las fracciones de plasma y células se tomaron las porciones resultantes luego de la centrifugación de 1 mL de hemolinfa. También se tomaron aproximadamente 1 g (peso húmedo) de manto y de hepatopáncreas junto con las gónadas. Se escogieron manto y hepatopáncreas como tejidos de referencia puesto que, de acuerdo a investigaciones previas (Lemus *et al.*, 2010; Franchi *et al.*, 2011 y Vasanthi *et al.*, 2012) estos son los tejidos que por excelencia acumulan metales pesados. Las muestras obtenidas se colocaron en la estufa a 60° C durante 24 h. Luego, se sometió cada muestra a digestión ácida durante 24 h colocándoles 2 mL de HNO₃ concentrado. Seguidamente, se agregaron 25 mL de agua desionizada y se filtraron usando papel de filtro Whatman 42. Finalmente, se determinó la incorporación de cadmio en cada tejido, cuantificando el metal mediante un espectrofotómetro de emisión óptica inductivamente acoplado a plasma Perkin Elmer 5300®.

Cuantificación de proteínas en plasma y células de la hemolinfa

Para la cuantificación de proteínas de los ejemplares de grupos expuestos y controles, el precipitado (células) de cada grupo fue resuspendido en 100 μ L de buffer lisis que contenía: 2 mM EDTA, 250 mM Sacarosa, 10 mM β -mercaptoetanol, 10% de Glicerol y 1% de Tritón X-100. Una vez resuspendidos, se les añadió DTT y luego se centrifugó a 4 400 g durante 20 min y 4° C. Posteriormente, se tomaron 20 μ L de las fracciones resultantes de esta centrifugación (el resto se congeló hasta su uso) y 20 μ L plasma, para la cuantificación de proteínas totales mediante el método Bradford (1976).

Separación de proteínas del plasma y células de la hemolinfa

La separación de proteínas de plasma y células de la hemolinfa se hizo mediante una cromatografía de exclusión molecular Sephadex G50 (25 x 1,5 cm), que se estabilizó con buffer de elución Tris- HCl 20 mM/L, y que contenía 10 mM NaCl, 2 mM DTT y 0,5 mM PMSF, pH 8,6. La columna se calibró con: Anhidrasa carbónica (29 KDa) y citocromo C (12,4 KDa). La velocidad de flujo fue de 1,8 mL/min.

Posteriormente, las fracciones de plasma y células (con concentraciones de proteínas totales conocidas) fueron colocadas por separado en la columna y se procedió con la corrida. Finalmente, se leyó la absorbancia de los eluatos a una longitud de onda de 245 y 280 nm en el espectro de luz UV.

Determinación del contenido de cadmio en plasma y células de la hemolinfa

Se tomaron las fracciones eluidas (correspondientes a los grupos expuestos) de la columna de Sephadex G-50, se colocaron en cápsulas de petri y se secaron en la estufa a 65 °C durante 24 h. Posteriormente, se colocaron en un portamuestras de aluminio, utilizando una cinta conductora de doble adhesión, para luego cubrir dicha cinta con pintura de carbón. Una vez que la pintura secó, las muestras fueron

colocadas en un evaporador de alto vacío (Hitachi, modelo HUS-5 GB) durante aproximadamente 1 min. Finalmente, las mismas se analizaron empleando un microscopio electrónico de barrido (Phillips, modelo XL 30) con microanálisis acoplado de espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDX), operando a 25 kiloelectrovoltios durante ciclos de 2 min.

Masa molecular aparente de las proteínas enlazadoras de cadmio

La estimación de la masa molecular aparente de las fracciones proteicas del plasma y células de la hemolinfa, en las que se determinó presencia de cadmio, se realizó mediante la comparación con los marcadores de peso molecular anhidrasa carbónica (29 KDa) y citocromo C (12,4 KDa), los cuales eluyeron en las fracciones 7 y 10 respectivamente.

Análisis estadísticos

Debido al no cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el programa estadístico SPSS, versión 11, con el objeto de determinar si existen diferencias respecto a las concentraciones de cadmio entre los grupos controles y expuestos para cada tejido (hemolinfa, hepatopáncreas-gónadas y manto).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incorporación de cadmio en los tejidos analizados

Respecto a las concentraciones de cadmio (Cd) encontradas en la hemolinfa de *P. viridis*, se observaron diferencias significativas entre los ejemplares expuestos a 1 mg/L de Cd durante 48 horas y los organismos no expuestos ($p = 0,027$; Tabla 1). En dicho tejido se registraron concentraciones medias en los grupos controles de 0,00 y de 0,19 $\mu\text{g Cd / mL}$ para los grupos expuestos (Figura 1). La incorporación de Cd en la hemolinfa se debe a que no sólo está constituida por células circulantes o hemocitos sino también posee proteínas plasmáticas, muchas de ellas con capacidad de enlazamiento de metales (Vargas y Barracco, 2001); lo cual permite transportar el metal hacia otros tejidos encargados de acumularlos, funcionando así como un reservorio temporal de dicho contaminante y otros metales pesados (Granadillo, 2007). Lo antes señalado se ratifica en el hecho de que en organismos previamente expuestos, sometidos a un periodo de depuración, las concentraciones del metal han sido significativamente menores (Lemus *et al.*, 2010).

Tabla 1. Resultados de las pruebas Mann-Whitney (Wilcoxon) para evaluar diferencias entre grupos controles y expuestos (a 1 mg/L de Cd x 48 h) para cada tejido de *Perna viridis* estudiado.

| | Hemolinfa | | Hepatopáncreas-gónadas | | Manto | |
|---------------|-----------|----------|------------------------|----------|---------|----------|
| | Control | Expuesto | Control | Expuesto | Control | Expuesto |
| Mediana | 0,000 | 0,188 | 0,036 | 17,989 | 0,000 | 10,721 |
| Valor P | 0,027* | | 0,002* | | 0,002* | |
| Estadígrafo W | 0,0 | | 0,0 | | 0,0 | |

*Diferencia significativa $p < 0,05$

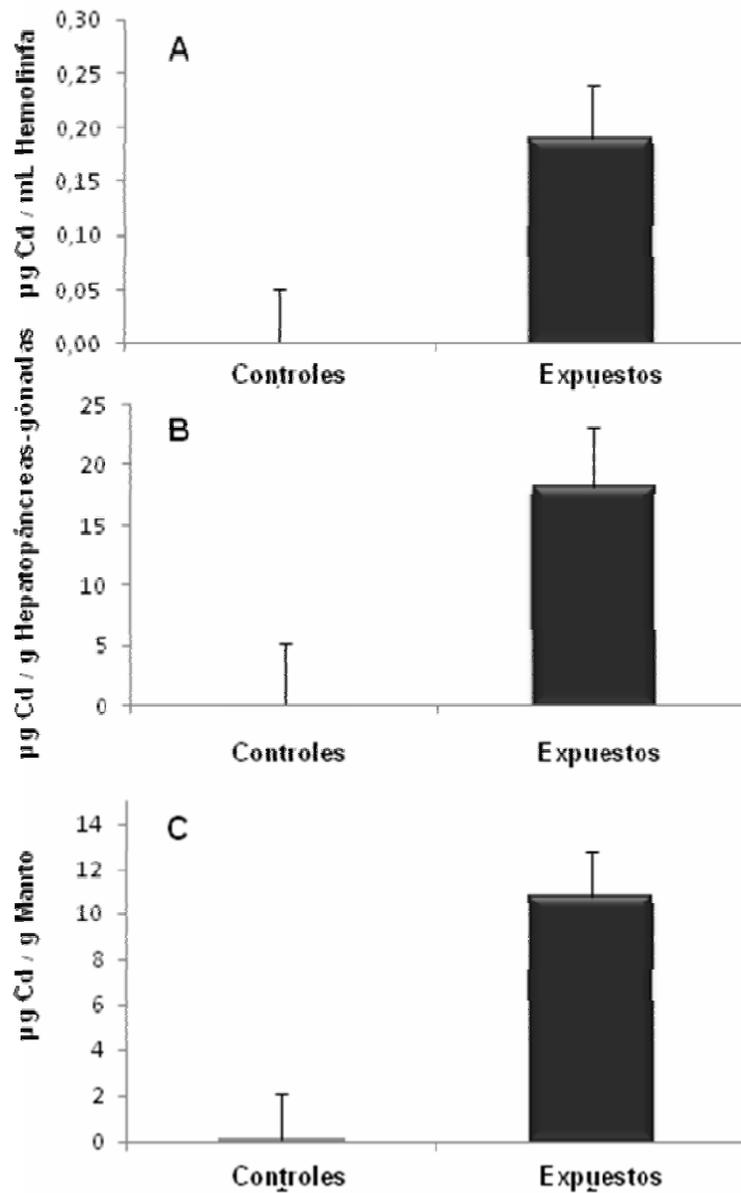


Figura 1. Concentraciones medias de cadmio registradas en la hemolinfa (A), hepatopáncreas-gónadas (B) y manto (C) del mejillón verde *P. viridis* después de 48 horas de exposición a 1 mg/L de cadmio.

Se ha demostrado que en la hemolinfa no permanecen este tipo de contaminantes por tiempo prolongado, por ejemplo, en organismos expuestos a Cd,

como el crustáceo decápodo *Carcinus maeans*, la presión osmótica de los hemocitos se eleva significativamente, lo cual conlleva a una alteración en los procesos relacionados con la osmorregulación (Livingstone *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el hepatopáncreas-gónadas también se observó un incremento significativo ($p = 0,002$, Tabla 1) en las concentraciones de Cd registradas para los grupos expuestos (18,20 $\mu\text{g Cd / g tejido}$) respecto a la de grupos no expuestos (0,10 $\mu\text{g Cd / g tejido}$) (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Franchi *et al.* (2011) quienes, luego de someter a ejemplares del cangrejo de río *Trichodactylus fluviatilis* a 200 $\mu\text{g Cd / L}$, por 7 días de exposición, encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos y los no expuestos, observando una concentración de cadmio de 10,52 $\mu\text{g Cd / g tejido}$.

De los tejidos evaluados en la presente investigación el hepatopáncreas-gónadas fue el que acumuló mayor concentración de Cd. Esto corresponde con lo encontrado por Vasanthi *et al.* (2012) también en *P. viridis*, quienes registraron una de las mayores concentraciones del metal en el hepatopáncreas de esta especie. Dicho órgano posee una maquinaria para la síntesis de metabolitos de estrés y proteínas enlazadoras de metales. La incorporación del metal en el hepatopáncreas se debe principalmente a que su presencia induce un incremento de poros en la membrana subcelular del hepatopáncreas, con la finalidad de permitir la entrada de dicho metal, puesto que en el interior de este órgano se encuentran enzimas capaces de quelar una porción del cadmio total enlazado para que pueda ser incorporado a los productos de desecho y posteriormente excretado, reduciéndose su bioacumulación (Knigge *et al.*, 2002). Dichos agentes quelantes han sido descritos como proteínas de elevado peso molecular con afinidad por iones metálicos. En el bivalvo *Macoma balthica* se ha demostrado que la quelación del cadmio reduce su bioacumulación hasta en un 45%.

Al evaluar las concentraciones de Cd en el manto, se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0,002$; Tabla 1) entre los organismos expuestos (10,77 $\mu\text{g Cd / g}$

manto) y los organismos controles (0,069 $\mu\text{g Cd / g manto}$) (Figura 1). La acumulación del metal en este tejido ha sido reportada por otros autores (Lemus *et al.*, 2010), quienes señalan que cuando los organismos se encuentran en condiciones en las que existe biodisponibilidad de metales pesados, estos pueden ser incorporados fácilmente mediante mecanismos de difusión pasiva a través del epitelio branquial y subsecuentemente ser transportados en la hemolinfa a diferentes compartimientos tisulares, entre ellos el manto (uno de los tejidos que generalmente incorpora mayor concentración de metales). Esto se debe a que, al igual que el hepatopáncreas-gónadas, el manto posee agentes quelantes capaces de disminuir la concentración y toxicidad de metales pesados en estos invertebrados marinos.

De esta manera, los resultados confirman que los tejidos evaluados juegan un importante rol en la incorporación y posterior acumulación de contaminantes inorgánicos como el cadmio, lo cual es esencial para el mantenimiento del equilibrio fisiológico de los organismos expuestos a este tipo de contaminantes. Tal acumulación es menor y temporal en la hemolinfa, concentrándose los mayores niveles del metal en el manto y en el hepatopáncreas-gónadas, para su quelación y posterior eliminación.

Proteínas enlazadoras de cadmio en la fracción plasmática y celular de la hemolinfa

En la cromatografía de exclusión molecular Sephadex-G50, realizada a la fracción plasmática de la hemolinfa, se observaron perfiles cromatográficos similares a 245 nm y 280 nm, tanto en los organismos controles como expuestos. En ambos casos, tal como se muestra en los cromatogramas, se detectaron dos grupos proteicos claramente distinguibles, uno con proteínas de elevado peso molecular y otro con proteínas de bajo peso molecular (Figura 2. A). Para los controles, los máximos picos de absorción correspondientes a proteínas de elevado peso molecular estuvieron comprendidos en la fracción eluida 6, a 280 nm y 245 nm (> 29 KDa), y

en la fracción 9 a 245 nm (12,4 KDa y 29 KDa), mientras que los correspondientes a proteínas de bajo peso molecular se ubicaron entre las fracciones 16-18, a 245 nm y, en menor grado, a 280 nm (12,4 KDa). En el caso de los grupos expuestos (Figura 2. B), los mayores valores de absorbancia se registraron en la fracción 6, a ambas longitudes de onda, para proteínas de elevado peso molecular (> 29 KDa) y en las fracciones 16-18, también en las dos longitudes de onda medidas, para proteínas de bajo peso molecular ($< 12,4$ KDa). Así mismo, tanto en los grupos controles como en los expuestos, también se evidenció la presencia de pequeñas proteínas en la fracción 20, a 245 nm. En cuanto al % de cadmio en la porción plasmática de la hemolinfa de los organismos expuestos, la presencia del metal se detectó entre las fracciones 7-9 (7,9%), 19-21 (18,4%) y 26-28 (18,3%) (Figura 2. C).

Por otra parte, en los perfiles cromatográficos correspondientes a la fracción celular de la hemolinfa de *P. viridis*, se detectó que en los grupos controles (Figura 3. A), tanto a 280 como a 245 nm, está presente un grupo de proteínas de elevado peso molecular. Este grupo se encuentra constituido por proteínas con una masa molecular aparente 29 KDa, detectadas en la fracción 6 para la longitud de onda 280 nm, en la fracción 5 para 245 nm, y también proteínas con una masa molecular aparente 29 KDa y 12,4 KDa en la fracción 9 a ambas longitudes de onda. Igualmente, se observaron proteínas de bajo peso molecular 12,4 KDa, a 245 nm, en las fracciones 13-15 y 24. En cuanto a los perfiles cromatográficos de la porción celular de la hemolinfa de los grupos expuestos (Figura 3. B), sólo se observaron proteínas de elevado peso molecular (29 KDa) en las fracciones 4-6, a ambas longitudes de onda, mientras que los máximos picos absorción que indican la presencia de proteínas de bajo peso molecular (12,4 KDa) se encontraron en las fracciones 11, 15-17 y 20, a 280 nm, y en las fracciones 14-16, 22 y 29, a 245 nm. Con respecto al contenido de cadmio en esta porción (Figura 3. C) las máximas concentraciones se registraron en las fracciones 4-6 (25 %), 10-12 (14,87 %), 16-18 (13 %) y 25- 27 (14,5 %).

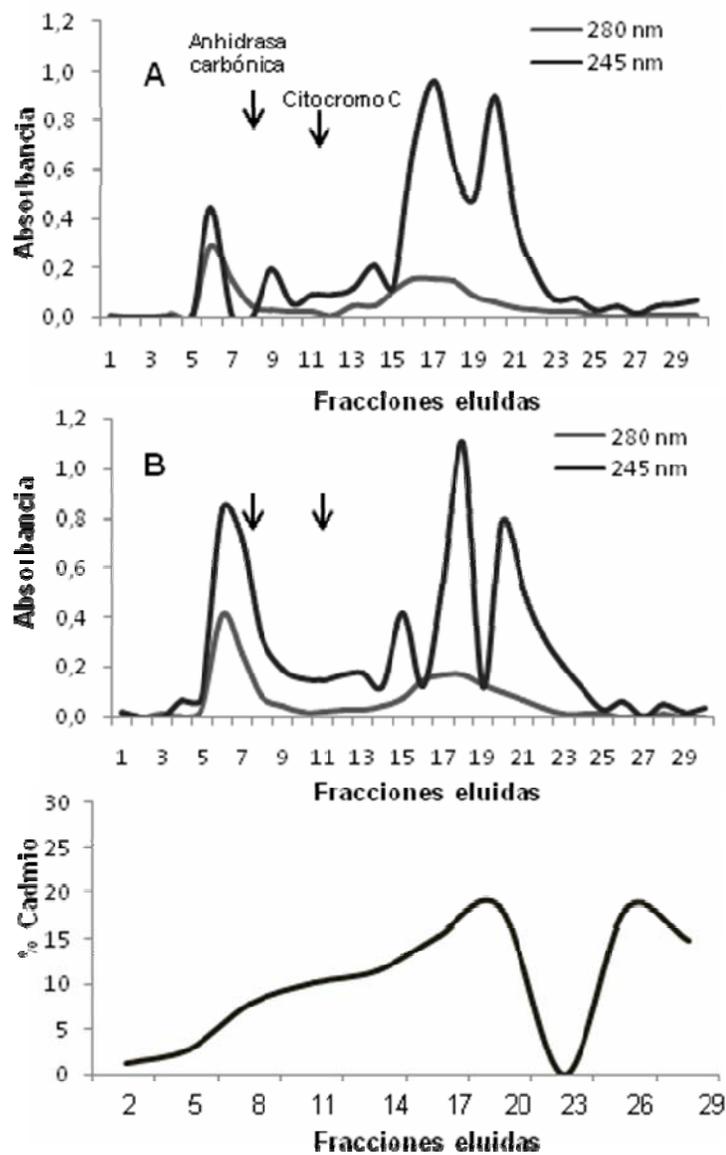


Figura 2. Perfiles cromatográficos de proteínas en la fracción plasmática de la hemolinfa para los grupos controles (A) y expuestos (B) del mejillón verde *P. viridis*, después de 48 h de exposición a 1 mg/L de Cd, y porcentaje de cadmio (C) en esta fracción.

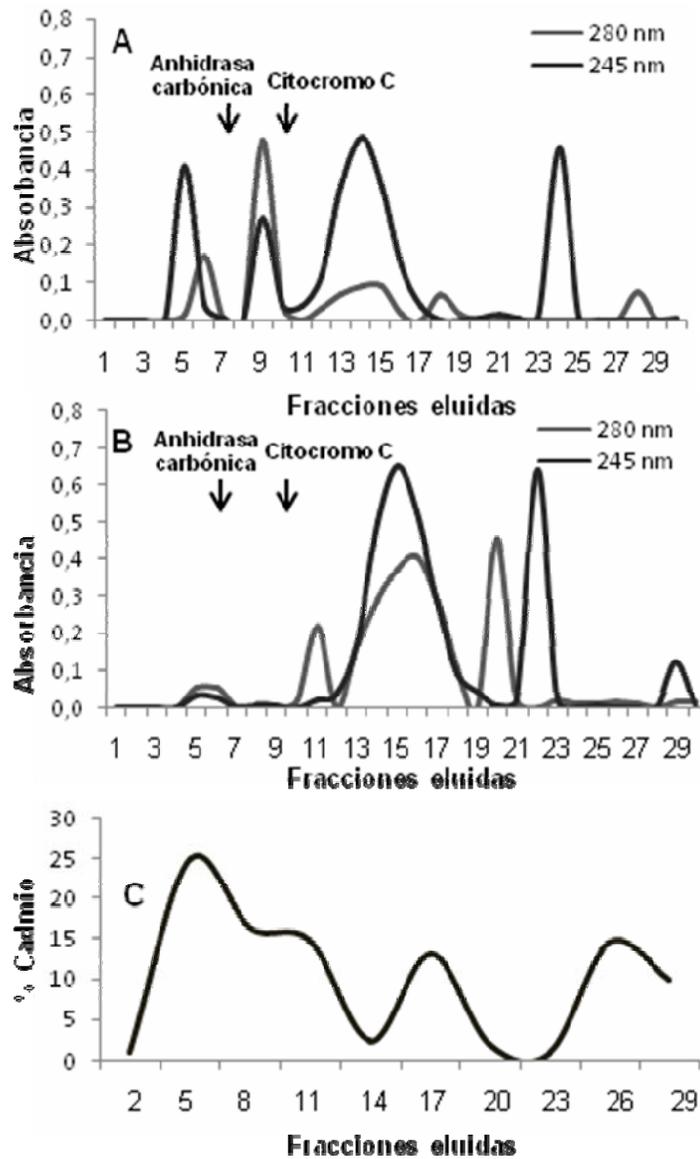


Figura 3. Perfiles cromatográficos de proteínas en la fracción celular de la hemolinfa para los grupos controles (A) y expuestos (B) del mejillón verde *P. viridis*, después de 48 h de exposición a 1 mg/L de Cd, y porcentaje de cadmio (C) en esta fracción.

El mayor porcentaje metal (25 %) en este trabajo, se encontró en las fracciones eluidas 4-5 de la porción celular de la hemolinfa, a diferencia de lo obtenido por Granadillo (2007) quien evaluó proteínas enlazadoras de cadmio en plasma y células de la hemolinfa de *P.viridis*, expuesto a dosis subletales de cadmio. Los mencionados autores obtuvieron mayor capacidad de enlazamiento en el plasma mediante un péptido que no presentó grupos sulfhidrilos, con una masa molecular aparente 13 KDa. Sin embargo, en la presente investigación se evidenció la presencia de proteínas enlazadoras de cadmio de alto y bajo peso molecular en ambas porciones (plasmática y celular). Probablemente, la diferencia con lo hallado por Granadillo (2007) se deba al empleo ejemplares juveniles, mientras que en el presente trabajo se utilizaron sólo ejemplares adultos. En los adultos, el sistema inmunológico se encuentra más desarrollado y las células que lo componen son más especializadas. Aparte de ello, Granadillo (2007) empleó una mayor dosis y un mayor tiempo de exposición, un elemento que también pudiera haber influido en las diferencias planteadas.

En las primeras fracciones eluidas de la porción plasmática de los organismos controles y expuestos, se observaron proteínas de elevado peso molecular (29 KDa) tal y como se ha registrado en los bivalvos *Mercenaria stimpsoni*, *Mizuhopecten yessoensis* y *Mytilus trossulus* (Slobodenyuk *et al.*, 2007), con proteínas de una masa molecular aparente alcanzando los 60 KDa. En células de la glándula digestiva de *Pecten maximus* también se evidenciaron proteínas pesadas (55 KDa) enlazando aproximadamente el 60 % del cadmio 1citoplasmático (Stone *et al.*, 1986).

El otro grupo de proteínas de alto peso molecular (12,4 KDa y 29 KDa), registrado tanto en plasma como en células, también ha sido reportado en *M. trossulus* (22 KDa) (Slobodenyuk *et al.*, 2007). Un grupo similar fue observado en los bivalvos *Mytilus edulis* (13-21 KDa), asociado aproximadamente al 50 % del cadmio citoplasmático (Frazier *et al.* 1985), y en *Agropecten irradians* (21 KDa) (Carmichael y Fowler, 1981). Del mismo modo, Castillo y Maita (1991) aislaron proteínas del hígado de calamar *Ommastrephes bartrami* encontrando unas proteínas

de unión al Cd (que contenían 21-29 % Cd), de aproximadamente 16 KDa.

Con respecto a las proteínas de bajo peso molecular (12,4 KDa) registradas entre las fracciones 14-16 tanto en la porción plasmática como en la celular (a ambas longitudes de onda) en grupos controles y expuestos, coinciden con las proteínas citosólicas de aproximadamente 10 KDa con fuerte afinidad para unirse a cadmio, mercurio y cobre, reportadas para los gasterópodos *Buccinum tenuissimum* y *Batillus cornutus*, y para el cefalópodo *Todarodes pacificus* (Dohi *et al.*, 1986) así como para el caracol *Cepaea hortensis* (Dallinger *et al.*, 1989). También en los gasterópodos *Helix pomatia* y *Arianta arbustorum*, en presencia de Cd, se observaron proteínas enlazadoras del metal con una masa molecular aparente 12 KDa.

En el bivalvo *Perondia venulosa* se reportaron proteínas de 7-10 KDa que presumiblemente son metalotioneínas (Slobodenyuk *et al* 2007). Las metalotioneínas (MT) son proteínas citosólicas de bajo peso molecular, con altos porcentajes de cisteína (-SH). Aunque están involucradas en la homeostasis y detoxificación de metales, pudiendo ser su síntesis inducida por el exceso tanto de metales esenciales (Zn y Cu) como por metales sin funciones fisiológicas conocidas (Cd y Hg), English y Storey (2003) reportaron que para el caracol *Littorina littorea*, su expresión también puede aumentar bajo condiciones de anoxia y congelación, logrando identificar para esta especie una proteína de 100 aminoácidos que da un 56 % de identidad con una isoforma de MT de unión al Cd que ya había sido identificada para *H. pontia* y con un 43-47 % de identidad para una MT de otros bivalvos marinos.

En las porciones celulares de la hemolinfa de los ejemplares de *P. viridis* expuestos, también se observaron proteínas de muy bajo peso molecular entre las fracciones 21-29 con presencia de cadmio, comportamiento similar al de las fracciones proteicas de aproximadamente 3 KDa observadas en *M. stimpsoni*, *M. yessoensis* y *M. trossulus* (Slobodenyuk *et al.*, 2007). Los autores señalan que probablemente se trate de glutatión, el cual es un péptido que también constituye la

primera línea de defensa celular contra la toxicidad de xenobióticos. Sus funciones dentro de la célula van desde captar metales pesados, como por ejemplo el cadmio, hasta posteriormente ayudar a su detoxificación (Tausz *et al.*, 2004).

El hallazgo de estas proteínas bajo peso molecular y de pequeños péptidos, representa un aporte significativo al conocimiento de las rutas de incorporación, transporte y detoxificación de metales pesados en bivalvos. Por mucho tiempo se tuvo la concepción de que las metalotioneínas eran las proteínas encargadas del transporte y la detoxificación de metales pesados, pero las evidencias recientes, al igual que lo encontrado en este trabajo, apuntan a la existencia de otras proteínas (distintas a las metalotioneínas) de bajo peso molecular que también participan en tales procesos. Sería interesante realizar estudios posteriores que permitan determinar si estas proteínas son específicas para cadmio o actúan en general sobre metales.

CONCLUSIONES

De los tres tejidos analizados en *Perna viridis*, el sistema hepatopáncreas-gónadas, fue quien acumulo mayores niveles de cadmio, mientras que los menores valores fueron obtenidos en la hemolinfa.

Se observó la presencia de dos grupos de proteínas enlazadoras de cadmio en las fracciones plasmática y celular de la hemolinfa evaluada, dichos grupos corresponden a uno de bajo peso molecular ($< 12,4$ KDa) y otro de mayor peso molecular ($> 12,4$ KDa e incluso mayores a 29 KDa).

Entre las fracciones de plasma y células de la hemolinfa, se detectó un mayor porcentaje de enlazamiento del metal en la fracción celular.

BIBLIOGRAFÍA

Araúz, D.; García, A.; Broce, K.; Rodríguez, F. y Aparicio, R. 2009. Proyecto contaminación por metales pesados en sedimentos en la Bahía de Parita, Herrera (Determinación de Metales Pesados en Sedimentos Marinos, Bahía de Parita, Panamá).

Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 236: 302-308.

Carmichael, N. y Fowler, B. 1981. Cadmium accumulation and toxicity in the kidney of bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Biology*, 65: 35-43.

Castillo, L. y Maita, Y. 1991. Isolation and partial characterization of cadmium binding protein from the Oceanic Squic *Ommastrephes bartrami*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 42(1): 26-34.

Costa, M. 2008. Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis*. Trabajo para optar al grado de Doctora en Biología. Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología; Universidad de Vigo, Galicia.

Dallinger, R.; Berger, B. y Bauer, A. 1989. Purification of cadmium-binding proteins from related species of terrestrial helicidae (Gastropoda, Mollusca): A comparative study. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 85: 135-145.

Dohi, Y.; Kosak, K.; Ohba, K. y Yoyeyama, Y. 1986. Cadmium-binding proteins of three marine mollusk and characterization of two cadmium-binding glycoproteins from the hepatopancreas of whelk, *Buccinum tenuissimum*. *Environmental Health Perspectives*, 65: 49-55.

Ellman, G. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74: 443-450.

English, T. y Storey, K. 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 2517-2524.

Forero, L. y Sierra, J. 2004. Efecto de dos metales pesados, cadmio y níquel, sobre la eficiencia de la remoción de carga orgánica de un reactor UASB a escala de laboratorio. *Revista Facultad de Ingeniería*, 31: 23-37.

Franchi, M.; Menegário, A.; Brossi, A.; Chagas, G.; Silva, M.; Pião, C. y Govone, J. 2011. Bioconcentration of Cd and Pb by the river crab *Trichodactylus fluviatilis* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22 (2): 230-2380.

- Frazier, J.; George, S.; Overnell, J.; Coomb, T. y Kagi, J. 1985. Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80: 257-262.
- George, S. y Pierie, B. 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis*. A combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60: 575-590.
- Granadillo, M. 2007. Respuestas celulares y proteínas enlazadoras de cadmio en plasma y hemocitos de la hemolinfa de *Perna viridis* (Linne, 1785) expuesto a dos dosis subletales del metal. Trabajo de grado, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Hauschild, K. y Grieshaber, M. 1997. Oxygen consumption and sulfide detoxication in the lugworm *Arenicola marina*(L.) at different ambient oxygen partial pressures and sulfide concentrations. *Journal of Experimental Biology*, 167: 378-388.
- Knigge, T.; Mann, N.; Parveen, Z.; Perry, C.; Gernhofer, M.; Triebkorn, R.; Kohler, H. y Connock, M. 2002. Mannosomes: A molluscan intracellular tubular membrane system related to heavy metal stress?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131: 259-269.
- Lemus, M.; Laurent, C; Acagua, A.; Cabrera, M.; Aponte, A. y Chung, K. 2010. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, península de Araya, estado sucre, Venezuela. *The Biologist (Lima)*, 8: 126-138.
- Livingstone, D. 2001. Contaminants stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666.
- Marcano, L.; Nusetti, O.; Zapata, E.; Nusetti, S. y Esclapés, M. 2006. No 6 Fuel oil effects on antioxidant enzymes and immunological responses in the fish *Thalassophry maculosa* (Pisces:Batrachoididae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 281:237-246.
- Nair, P y Robinson, W. 1999. Purification and characterization of histidine-rich glycoprotein that binds cadmium from the blood plasma of bivalve *Mytilus edulis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336: 8-14.
- Narváez, N.; Lodeiros, C.; Nusetti, O.; Lemus, M. y Maeda, A. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ciencias Marinas*, 31: 91-102.
- Nusetti, O.; Zapata, E.; Esclapés, M. y Rojas, A. 2005. Antioxidant enzymes and

tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48:509-514.

Perkin, E. 1972. <<http://www.perkinelmer.com/search/Search.aspx?Ntt=calibration+curve+for+measuring+heavy+metals+in+the+ICP&N=0>> (30/05/11).

Pichaud, N.; Pellerin, J.; Fournier, M.; Gauthier, S.; Rioux, P. y Pelletier, E. 2008. Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*. *Chemistry Central Journal*, 2: 1-11.

Prieto, A.; Arrieché, D. y García, Y. 2009. Aspectos de la dinámica poblacional del mejillón verde *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) en el Morro de Guarapo, península de Araya, Venezuela. *Interciencia*, 34: 202-208.

Reyes, R. 1999. Las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia*, 24: 366-371.

Rodríguez, A.; Arellano, J.; González, M.; Blasco, J. y Sarasquete, C. 2005. Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas*, 31: 455-466.

Rojas, N.; Lemus, M.; Rojas, L.; Martínez, G.; Ramos, Y. y Chung, K. 2009. Contenido de mercurio en *Perna viridis* al norte del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 25: 91-99.

Rojas, L.; Chang, L.; Agarrad, J.; Bekele, I. y Hubbard, R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oyster (*Crassostrea* sp.) from Trinidad and Venezuela. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 410-415.

Slobodenyuk, A.; Belcheva, N. y Chelomin V. 2007. Comparative study of Cd-Binding proteins of different species of bivalves. *Journal of International Research Publication: Ecology & Safety*, 2: 35-49.

Soares, I.; Ribeiro, J.; Valongo, C.; Pinto, R.; Vilanova, M.; Bleher, R. y Machado, J. 2002. Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132: 541-553.

Stone, H.; Wilson, S.; Overnell, J. y Ponzano, E. 1986. Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: Role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85: 259-263.

Tausz, M.; Sircelj, H. y Grill, D. 2004 The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?. *Journal of Experimental*

Botany, 55: 1955-1962

Valdés, J.; Román, D.; Dávila, P.; Ortlieb, L. y Guiñes, M. 2006. Variabilidad estacional de cadmio en un sistema de surgencia costera del norte de Chile (Bahía Mejillones del Sur, 23° S). *Revista Chilena de Historia Natural*, 79: 517-535.

Vargas, F. y Barracco, M. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Maeda, A. (ed). Págs. 127-146.

Vasanthi, A.; Revathi, P.; Arulvasu, C. y Munuswamy, N. 2012. Biomarkers of metal toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, south east coast of India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84: 92-108.

Villamar, F. y Cruz, M. 2007. Macrofauna bentónica de la zona intermareal y submareal en caleta Aeolian, Isla Baltra (Galápagos, Ecuador). *Acta Oceanográfica del Pacífico*, 14: 139-145.

Zapata-Vivenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Esclapés, M. y Arredondo L. 2005. Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas*, 31:1-10.

HOJA DE METADATOS

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

| | |
|---------------|--|
| Título | Proteínas enlazadoras de cadmio en hemolinfa del mejillón verde <i>Perna Viridis</i> (Mollusca: Bivalvia). |
|---------------|--|

Autor:

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail | |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Fernández S., Ana T. | CVLAC | 18228514 |
| | e-mail | anatfs_87@hotmail.com |

Palabras o frases claves:

| |
|----------------------------------|
| Cadmio |
| Bioacumulación |
| Proteínas enlazadoras de metales |

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

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Subárea |
|---------|----------|
| Ciencia | Biología |

Resumen (abstrac):

El problema de la contaminación es múltiple, se presenta en formas diversas y las principales consecuencias biológicas derivan de sus devastadores efectos sobre la vida. En el presente trabajo se evaluó la incorporación de cadmio (Cd) en diferentes tejidos (hemolinfa, hepatopáncreas y manto) y las proteínas enlazadora de Cd en las fracciones plasmáticas y celular de la hemolinfa, de ejemplares de *Perna viridis* recolectados en el corredor comprendido entre Chacopata y Taguapire, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Los organismos se expusieron a una concentración de 1ppm de Cd durante 48 horas (grupos experimentales). En la hemolinfa, se registraron concentraciones medias en los grupos controles de 0,00 $\mu\text{g Cd / mL}$ de hemolinfa y para los grupos expuestos de 0,19 $\mu\text{g Cd / mL}$ de hemolinfa, denotando diferencias significativas ($p = 0,027$). En el hepatopáncreas-gónadas, para los grupos no expuestos, las concentraciones del metal fueron 0,10 $\mu\text{g Cd / g}$ hepatopáncreas y para los grupos expuestos 18,20 $\mu\text{g Cd / g}$ hepatopáncreas, también significativamente diferentes ($p = 0,002$). En el manto, igualmente se observaron diferencias significativas ($p = 0,002$) en cuanto al contenido de cadmio entre los organismos controles (0,069 $\mu\text{g Cd / g}$ manto) y los organismos expuestos (10,77 $\mu\text{g Cd / g}$ manto). La acumulación de cadmio es menor y temporal en la hemolinfa, concentrándose los mayores niveles del metal en el manto y en el hepatopáncreas-gónadas, para su quelación y posterior eliminación. Con respecto a las proteínas evaluadas, en ambas fracciones de la hemolinfa (plasma y células) se observó un comportamiento similar entre los perfiles cromatográficos, a 280 nm y 245 nm, tanto en los organismos controles como expuestos, pudiéndose notar dos grupos proteicos enlazadores del Cd, uno de bajo peso molecular ($< 12,4$ KDa) y otro de mayor peso molecular ($> 12,4$ KDa e incluso mayores a 29 KDa); sin embargo, la fracción celular fue la que tuvo mayor capacidad de enlazamiento con el metal (con un máximo de 25% Cd).

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

Contribuidores:

| Apellido y Nombre | ROL / Código CVLAC / e-mail | | | | |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|-----------------------------|
| Lemus Mairin | ROL | CA <input type="checkbox"/> | AS <input checked="" type="checkbox"/> | JU <input type="checkbox"/> | TU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 6429405 | | | |
| | e-mail | mlemus88@gmail.com | | | |
| Acosta Vanessa | ROL | CA <input type="checkbox"/> | AS <input type="checkbox"/> | JU <input checked="" type="checkbox"/> | TU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 11376304 | | | |
| | e-mail | vanessaacosta@yahoo.com | | | |
| Zapata Edgar | ROL | CA <input type="checkbox"/> | AS <input type="checkbox"/> | JU <input checked="" type="checkbox"/> | TU <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 12269219 | | | |
| | e-mail | edzapata2002@yahoo.com | | | |

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

| | | |
|------|----|----|
| 2012 | 11 | 15 |
|------|----|----|

Lenguaje: spa

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

Archivo:

| Nombre del archivo | Tipo MIME |
|------------------------|-----------------|
| TESIS-FernandezAna.doc | Aplication/Word |

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Biología

Nivel asociado con el trabajo:

Licenciado

Área de estudio:

Biología

Institución que garantiza el título o grado:

Universidad de Oriente, núcleo de Sucre



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°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.

RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Cordialmente,
Juan A. Bolanos Cunele
JUAN A. BOLANOS CUNELE
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.

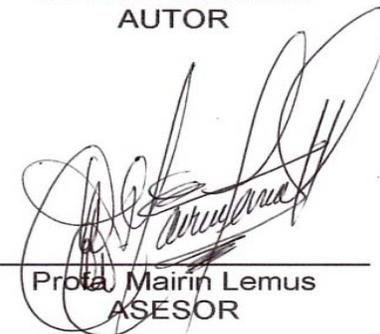
JABC/YGC/maruja

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 Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Br. Ana Fernández
AUTOR



Profa. Mairin Lemus
ASESOR