



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

METALOTIONEÍNAS Y METALES PESADOS EN EL GUACUCO *Tivela mactroides* (Born, 1778) (BIVALVIA), COLECTADO EN PLAYA CAICARA, ESTADO ANZOÁTEGUI, VENEZUELA  
(Modalidad: Investigación)

WLADIMIR DAVID RODRÍGUEZ MEDINA

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

CUMANÁ, 2010

METALOTIENEÍNAS Y METALES PESADOS EN EL GUACUCO *Tivela mactroides* (Born, 1778) (BIVALVIA), COLECTADO EN PLAYA CAICARA, ESTADO ANZOÁTEGUI, VENEZUELA

APROBADO POR:

---

Profa. Luisa Rojas de Astudillo  
Asesora

---

Prof. Edgar A. Zapata V.  
Co – Asesor

---

Jurado Principal

---

Jurado Principal

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>7</b>
Área de colecta de <i>Tivela mactroides</i>	7
Metales pesados	8
Cuantificación de proteínas	8
Determinación de grupos sulfhidrilos	9
Metalotioneínas	9
Tratamiento estadístico de datos	10
<b>RESULTADOS</b>	<b>11</b>
Concentración de metales pesados	11
Proteínas totales y grupos sulfhidrilos (-SH):	14
Metalotioneínas	15
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>23</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>32</b>
<b>HOJA DE METADATOS</b>	<b>40</b>

## DEDICATORIA

A la memoria de Matilde Medina y Luís Salvador Ayala por haberme dado la fuerza necesaria para culminar la carrera y se que siempre están conmigo. ¡Los quiero mucho!.

A mi mamá Gladys quien me ayudó en mis estudios.

A Carleth por compartir conmigo. Gracias.

A mi hijo Carlos David.

A mi familia, muy especialmente a mis tíos Héctor, Aura y Carmen, mis primos Freddy, Biannys, José, Brigmar, Brigcelys, Morelia, Milagros, Héctor, Freddy Luís, Marvin, Laura y Domingo que siempre estuvieron pendientes de mi. ¡Los quiero mucho!.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y la Virgen del Valle, por haberme dado la fuerza y el espíritu necesario para realizar y culminar con satisfacción este trabajo.

A los profesores Luisa Rojas de Astudillo y Edgar Zapata por su asesoramiento científico y su constante dedicación y esfuerzo, logrando solucionar todos los inconvenientes que se presentaron durante el desarrollo de esta investigación. Gracias porque sin su apoyo este trabajo no hubiese sido posible.

Al Departamento de Biología de la Universidad de Oriente y a los profesores que de alguna manera u otra contribuyeron a mi formación profesional.

Al Departamento de Química de la Universidad de Oriente por prestar sus instalaciones para el desarrollo experimental de este proyecto.

Al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) de la Universidad de Oriente por la ayuda prestada para la realización de la parte experimental.

A los T.S.U. José Luís Prin y Deudedith Hernández por su valiosa colaboración en la realización de la parte experimental de este proyecto.

Al señor Elier Díaz, por ayudarme en el traslado y recolección de las muestras.

A los profesores del laboratorio de genética María José González, María Esther Bellorín y José Imery por su ayuda y por brindarme su amistad.

Al camarada Larri Gil, por su estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A Horacio Méndez, cuya orientación me permitió dar mis primeros pasos universitarios que a la vez se convirtieron en una base sólida de hábitos de trabajo con los cuales afrontar el futuro.

A mis amigos Jesús González, Diana Duarte, Patricia Velásquez, Medardo Marcano, José Bucarito, Daniel Contreras, Enfred Rodríguez, y José Salazar, con quienes compartí durante la carrera. Gracias por su apoyo.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Análisis de correlación entre la concentración de metales pesados y el contenido de metalotioneínas, grupos sulfhidrilos y proteínas totales en el guacuco *T. mactroides* de playa Caicara, estado Anzoátegui, Venezuela (Coeficiente y  $r^2$ ) \_\_\_\_\_ 16

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Área de colecta de <i>Tivela mactroides</i> _____	7
<b>Figura 2.</b> Concentración de cobre (Cu) en el tejido blando del guacuco <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. Las letras (a,b,c) reseñan las comparaciones de acuerdo al análisis de Duncan. _____	11
<b>Figura 3.</b> Concentración de zinc (Zn) en el tejido blando del guacuco <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. Las letras (a,b) reseñan las comparaciones mensuales de acuerdo al análisis de Duncan. _____	12
<b>Figura 4.</b> Concentración de cadmio (Cd) en el tejido blando del guacuco <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. Las letras (a,b) reseñan las comparaciones mensuales de acuerdo al análisis de Duncan. _____	13
<b>Figura 5.</b> Concentración de aluminio (Al) en el tejido blando del guacuco <i>T. mactroides</i> de playa Caicara _____	13
<b>Figura 6.</b> Concentración de plomo (Pb) en el tejido blando del guacuco <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. _____	14
<b>Figura 7.</b> Cuantificación de proteínas en <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. ____	14
<b>Figura 8.</b> Concentración de grupos sulfhidrilos (-SH) en <i>T. mactroides</i> de playa Caicara _____	15
<b>Figura 9.</b> Concentración de metalotioneínas (MT) en la glándula digestiva de <i>T. mactroides</i> de playa Caicara. _____	15

## RESUMEN

Se evaluó el potencial impacto por metales pesados en la localidad de playa Caicara, estado Anzoátegui (Venezuela). Para ello se procedió a determinar la carga corporal de metales pesados (Cu, Zn, Al, Cd y Pb) y marcadores moleculares relacionados, tales como metalotioneínas (MT), grupos sulfhidrilos (-SH) y proteínas totales (PT) presentes en el guacuco *Tivela mactroides*. Se compararon estos parámetros en organismos colectados en los meses de agosto y diciembre del 2007, abril y julio del 2008. Los organismos fueron colectados manualmente a profundidades de 0 a 2 m, sexualmente maduros sin distinción de sexo, con tallas que oscilaron entre 30 y 35 mm de longitud. El tejido blando de cada ejemplar fue extraído de su concha y almacenado a – 20°C. Los niveles de metales pesados fueron cuantificados en todo el tejido blando usando el método desarrollado por Rojas *et al.* (2002). Para la valoración del contenido de MT, -SH y PT en la glándula digestiva fueron utilizadas las metodologías propuestas por Viarengo *et al.* (1997), Sedlak y Lindsay (1968) y Lowry *et al.* (1951), respectivamente. Se detectaron altas concentraciones para el mes de julio en la mayoría de los metales pesados analizados, coincidiendo con la temporada de máximos índices de pluviosidad en la zona, a excepción del Zn y Cd con concentraciones en los meses de diciembre y agosto respectivamente. Los promedios obtenidos de metales pesados son considerados elevados si se contrastan con los datos reportados por otras investigaciones, donde se usó como modelo biológico almejas provenientes de zonas costeras de distintas localidades del oriente venezolano. Los niveles de Cu y Zn se encontraron por encima de los valores establecidos por organizaciones internacionales tales como FAO, FDA y BFL. Las concentraciones de MT, -SH y PT no mostraron variación significativa entre los meses de colecta. De igual manera, no se evidenció correlación ni asociación estadística entre los niveles de metales pesados y los marcadores moleculares determinados. Los resultados no muestran indicios de alteraciones moleculares relacionadas con contaminación por metales pesados, sin embargo los niveles de Cu y Zn detectados en el tejido blando de *T. mactroides* reflejan una señal de alarma de ingreso de xenobióticos vía antropogénica en la zona.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día, uno de los problemas más graves que confronta la humanidad es la contaminación ambiental, en especial la de los cuerpos de agua. Las costas con influencia de los ríos constituyen unos de los ecosistemas más proclives a ser impactados, debido a que la mayor parte de los contaminantes, en especial los metales pesados, cuando son descargados desde asentamientos urbanos, pueden permanecer biodisponibles y acumularse de forma continua en los sedimentos y, en los organismos que los habitan. El aspecto más importante que distingue a los metales de otros contaminantes tóxicos es el hecho de ser no biodegradables, una vez en el ambiente pueden permanecer durante cientos de años, siendo fácilmente incorporados y acumulados por organismos filtradores (Allen–Gil *et al.*, 1997).

Los organismos que acumulan metales pueden experimentar modificaciones bioquímicas y fisiológicas que indican un estado de estrés químico (Acosta y Lodeiros, 2004; Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007). Uno de los efectos tóxicos, producto de la acumulación de metales, es la alteración de la conformación y actividad funcional de macromoléculas biológicamente importantes, tales como los grupos prostéticos de enzimas o metaloproteínas (Gutiérrez *et al.*, 1999).

La característica que tienen los organismos de absorber un metal pesado puede estar reflejada en la habilidad de captación, metabolización, almacenamiento y excreción del mismo. La capacidad de metabolización de algunos metales pesados puede ser similar a la de los metales esenciales, debido a que compiten por los sistemas de transporte disminuyendo la concentración efectiva del metal esencial, siendo ésta una de las razones de su carácter tóxico (Mas y Arola, 1993).

Entre los metales pesados presentes en la naturaleza, se pueden mencionar al plomo (Pb), cadmio (Cd), aluminio (Al), zinc (Zn) y cobre (Cu). El plomo es un metal carente de valor biológico que, debido a su tamaño y carga, puede competir con el calcio, principal componente del tejido óseo de vertebrados. Las principales aplicaciones de este metal son la fabricación de acumuladores, pinturas y aditivo antidetonante en la gasolina (tetraetilo de plomo). Aunque en Venezuela el plomo dejó de usarse en 1999 como aditivo de octanaje para la gasolina, de acuerdo a la norma venezolana COVENIN N° 764 – 2002, los niveles de Pb en sedimentos son significativos (Martínez y Senior, 2002; Acosta *et al.*, 2002).

El cadmio es un subproducto de la minería, fundición y refinación del zinc y, en menor grado, del plomo y cobre. Es uno de los contaminantes de mayor importancia toxicológica debido a su persistencia, toxicidad y potencial de bioacumulación. Ha sido detectado en más de 1 000 especies de flora y fauna, tanto acuáticas como terrestres. No existe evidencia de que sea un metal biológicamente esencial y, por el contrario, se ha comprobado que a concentraciones relativamente bajas es tóxico para todas las formas de vida (Pasquali, 2003). Los principales efectos tóxicos del Cd están relacionados con la competencia con otros iones metálicos esenciales, especialmente con zinc, hierro, cobre y calcio, produciendo alteraciones en diversos procesos metabólicos (Sadiq, 2002). Debido a su toxicidad, el Cd se encuentra sujeto a una de las legislaciones más severas en términos ambientales y de salud humana (Peakall, 1994; Olivier *et al.*, 2002; Patrick, 2003).

El aluminio es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre, de la cual forma más del 7%. Es un excelente conductor de calor y de electricidad. Su mayor ventaja es su ligereza, pues pesa casi tres veces menos que el acero ordinario. Casi todo el aluminio se obtiene de un mineral denominado bauxita, producido por la meteorización de las rocas ígneas. El

aluminio es empleado para construir utensilios de uso doméstico, y en aleación con el hierro y otros metales, se utiliza en la construcción de vehículos de transporte (aviones, trenes, automóviles) y en la edificación de puentes y edificios (Ramírez, 1997).

El zinc y el cobre son elementos esenciales que sirven como cofactores de numerosas enzimas, aunque también son tóxicos a altas concentraciones. El zinc es un metal maleable, dúctil, resistente a los agentes atmosféricos y de color gris. La ingestión de cantidades excesivas de zinc pueden perjudicar la salud de los seres vivos, por encima de 15 mg resulta ser tóxico (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1990). Es utilizado en numerosas industrias para la elaboración de productos farmacéuticos, colorantes y formulación de fungicidas. El cobre es un metal de color rojizo, dúctil, maleable, excelente conductor del calor y de la electricidad, se disuelve en ácido nítrico formando óxido cúprico y no desplaza el hidrógeno de los ácidos. Se presenta en la corteza terrestre como metal libre o en forma de compuestos (sulfuros, óxidos). Este metal es usado en la industria metalúrgica, eléctrica y electrónica (Forstner y Prosi, 1978; Ramírez, 1997).

En los estudios de monitoreo y detección temprana de efectos tóxicos de contaminantes se han desarrollado bioensayos que utilizan como modelo a los moluscos bivalvos, por su extensa distribución en ambientes marino – costeros, tanto bajo condiciones experimentales controladas en laboratorio como en evaluaciones de campo, debido a su alta tasa de incorporación de distintos xenobióticos u otros componentes químicos, los cuales suministran una cantidad promedio de la abundancia de contaminantes en hábitats locales acuáticos (Krishnakumar *et al.*, 1994; Weeks *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1999; García *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2009).

Los metales pesados llegan a los tejidos de los invertebrados marinos,

incluyendo a los bivalvos, a través de las superficies expuestas al medio y del alimento. Las branquias y el tracto digestivo son las principales superficies que permiten el paso de los metales. El transporte desde la superficie permeable hasta los distintos órganos tiene lugar por medio del líquido circulante (sangre o hemolinfa). Los metales se unen de forma inespecífica a las proteínas presentes en este líquido y son transportados a todos los tejidos. Los órganos en los que se suele producir una mayor acumulación son la glándula digestiva, hepatopáncreas, las branquias y el tejido muscular (Méndez *et al.*, 2009). Los principales factores que afectan la entrada del metal son su forma química, la presencia de otros metales, el pH, la salinidad, la especie animal y la fase del ciclo de vida (Díaz-Mayans *et al.*, 1993). Además, los bivalvos manifiestan diversas respuestas bioquímicas inducibles o inhibitorias bajo estrés, provocadas por metales pesados, las cuales son consideradas como marcadores biológicos importantes y altamente sensibles que permiten predecir riesgos de impactos negativos de xenobióticos sobre la salud del ambiente y la biota residente (Sánchez y Vera, 2001).

Una de las principales respuestas moleculares inducidas por metales pesados en invertebrados marinos, es el incremento en la síntesis de las metalotioneínas (MT), proteínas ricas en azufre que enlazan con facilidad metales pesados. Estas moléculas representan una familia de proteínas termoestables de baja masa molar (6 000 - 12 000 g/mol), que se combinan ávidamente con metales de transición de los grupos IB y IIB (Cu, Zn, Cd, Hg), a través de enlaces trimercáptidos (Kojima, 1991). Su composición está caracterizada por la presencia de un alto contenido de cisteína y ausencia de histidina y aminoácidos aromáticos.

Las MT han sido aisladas y caracterizadas a partir de numerosos tejidos de animales, plantas y en varios procariontes. Estas proteínas usualmente contienen 61 aminoácidos (Searle *et al.*, 1984; Kagi y Kojima 1987); aunque en

ciertos invertebrados y hongos se han encontrado formas más pequeñas de metalotioneínas (Butt *et al.*, 1986). Las MT generalmente enlazan átomos de cadmio, zinc, mercurio o cobre (Hamer, 1986). Experimentos de reconstitución con metalotioneínas aisladas de humanos y metales puros muestran que por cada molécula de proteína se unen 7 átomos de Zn, Cd o Hg ó 12 átomos de Cu (Kojima, 1991).

En diversos grupos taxonómicos se ha evidenciado la función de las MT en el metabolismo de los metales esenciales y en el control de la toxicidad de los metales pesados, en parte asociado a la inducción de la síntesis de proteínas (Karin, 1998). Aunque las metalotioneínas no están confinadas solamente al metabolismo de metales, dado que éstas pueden ser inducidas por otros factores biológicos internos y/o ambientales, tales como el cortisol, glucocorticoides, anoxia, congelamiento y modulación del estrés oxidativo (Muto *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2001; Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007).

Es importante mencionar que el proceso de acumulación de un xenobiótico, ya sea metálico o no, en un organismo está mediado por una serie de variables biológicas, tales como talla, sexo, posición del organismo en la cadena trófica, y relaciones genéticas entre poblaciones; y las condiciones del hábitat, entre ellas el período estacional, la calidad del agua y la cantidad de alimento (Borchardt *et al.*, 1998).

Una de las especies representativas de las costas venezolanas usadas en estudios ecotoxicológicos recientes es el guacuco *Tivela mactroides*, con una amplia distribución en playas de alta energía del Caribe (García *et al.*, 2002). *T. mactroides* es un bivalvo de importancia económica en la región, con una producción entre 50 a 100 toneladas/año exclusivamente para la elaboración de conservas de tipo artesanal e industrial. Resiste amplios intervalos de temperatura y de salinidad, es fácilmente colectable, y

temporalmente disponible por su reproducción continua, características que destacan su potencial como modelo biológico, para ser empleado en programas de biomonitoreo ambiental (Jaffé *et al.*, 1995; Acosta, 2001). En Venezuela se han realizado diferentes estudios relacionados con los aspectos ecológicos y poblacionales, reproductivos y fisiológicos de *T. mactroides* (Prieto, 1977; Ruíz, 1983; Ramírez, 1993; Godoy *et al.*, 1997; Mendoza y Marcano, 2000), los cuales han establecido una información importante sobre esta especie.

Debido al acelerado aumento de la actividad industrial y el desarrollo urbanístico presente en la región nororiental del país se ha incrementado la contaminación en el ambiente marino, por lo que surge la necesidad de buscar organismos que permitan evaluar la calidad de ese ambiente. Sin embargo, como las aguas residuales caen en ríos y mares sin ser tratadas, es necesario realizar un eficiente biomonitorero para detectar posibles focos de contaminación. El litoral costero del estado Anzoátegui es base del asentamiento petrolero y petroquímico de la región nororiental, y sus costas mantienen una intensa actividad pesquera. Esta zona es un punto interesante de estudio debido al gran potencial productivo biológico y orgánico de sus aguas y sedimentos, y su posible contaminación originada por escorrentías límnicas del río Neverí, industrial y agrícola hacia las costas anzoatiguenses (Rivera, 2004).

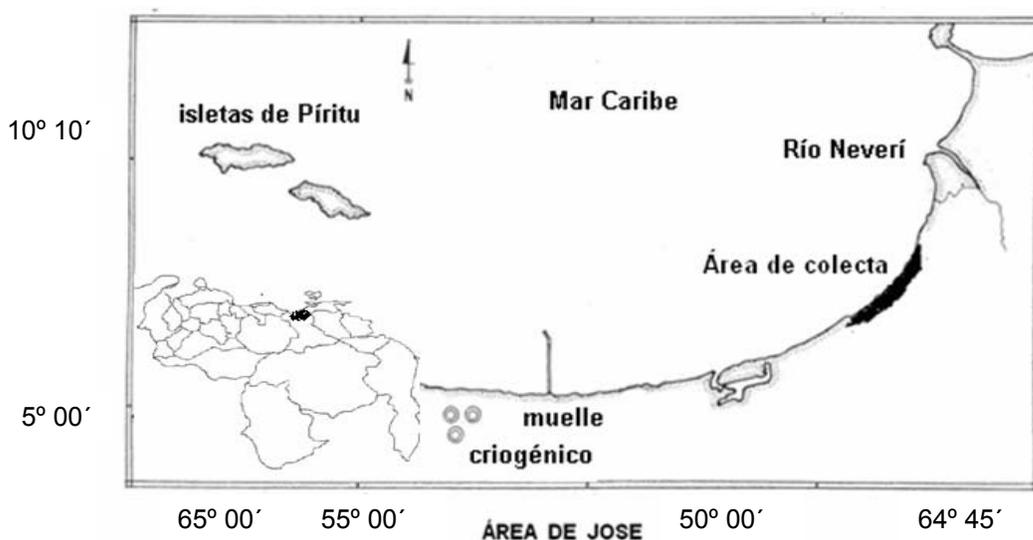
En esta investigación se evaluó el contenido de metalotioneínas y metales pesados en el bivalvo *T. mactroides* proveniente de playa Caicara, una zona costera probablemente impactada por su cercanía a la planta de fraccionamiento del Complejo Criogénico de Oriente (Anzoátegui, Venezuela). Se discute sobre la posible variación del contenido de metales pesados en esta especie colectada durante distintas temporadas del año 2007 y 2008, y su relación con las respuestas moleculares afines, tales como metalotioneínas,

grupos sulfhidrilos y proteínas totales, con el fin de detectar alteraciones bioquímicas en el organismo en estudio e inferir sobre la asociación con las condiciones del ambiente marino-costero.

## METODOLOGÍA

### Área de colecta de *Tivela mactroides*

Playa Caicara se encuentra entre el área costera cercana a la Planta de Fraccionamiento del Complejo Criogénico de Oriente ( $10^{\circ} 09' 06''$ -  $10^{\circ} 09' 00''$  N), y la desembocadura del río Neverí ( $64^{\circ} 43' 06''$ -  $64^{\circ} 55' 00''$  O) (Figura. 1).



**Figura 1.** Área de colecta de *Tivela mactroides*

La colección de ejemplares de *T. mactroides* fue realizada en los meses de agosto y diciembre del 2007, coincidiendo con la época de lluvias moderadas y de mayor intensidad, respectivamente. Y en los meses de abril y julio del 2008 correspondiendo a las épocas de sequía y máximos índices de pluviosidad registrados en el año, respectivamente (Apéndice 1). Se seleccionaron por cada muestreo entre 40 a 60 ejemplares, sexualmente maduros, sin distinción de sexo, con tallas entre 30 y 35 mm. Los guacucos colectados fueron transportados al laboratorio de química de suelos, en cavas con agua suficientemente aireada, y colocados en acuarios contentivos de agua de mar, arena y con aireación constante, a temperatura del ambiente de colecta

(27-28°C). El tejido blando fue separado de la concha y las glándulas digestivas fueron separadas para análisis de biomarcadores moleculares específicos, y almacenadas a -20°C, por un periodo no mayor a una semana.

### **Metales pesados**

Los tejidos blandos fueron colocados en fiolas de 50 ml y secados en un horno a 60°C durante 3 días o hasta obtener una masa constante. Subsecuentemente, el tejido fue predigerido en 10 ml de ácido nítrico concentrado durante 24 horas. La digestión total fue realizada por 3 horas a 80°C, seguida por 2 horas a 120°C. A las soluciones digeridas y posteriormente enfriadas se les agregaron 5 ml de agua desionizada y se procedió a filtrar la muestra usando un papel Whatman N° 42. El filtrado fue aforado con agua desionizada hasta 25 ml. Las soluciones fueron analizadas en un espectrómetro de emisión óptica inductivamente acoplado a un plasma (ICP-OES), marca Perkin Elmer, modelo Óptima 5300 DV. Los metales cuantificados fueron Cu, Zn, Cd, Al y Pb. Las concentraciones de cada metal fueron expresadas como  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tejido seco (Rojas *et al.*, 2002). De manera similar fueron tratados materiales certificados de referencia de ostras (Oyster 1566a) y determinados los límites de detección del ICP-OES (Apéndice 2) y dos soluciones blancos para evaluar la calidad del método de análisis.

### **Cuantificación de proteínas**

La determinación de proteínas fue realizada por el método Lowry *et al.* (1951), usando como cromógeno al reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu. El método es adecuado para la determinación de proteínas en el rango de concentración de 5 a 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Para tal fin se procedió a preparar dos soluciones, A y B. La solución A contentiva de 10 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) disueltos en 500 ml de hidróxido de sodio al 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  en agua

destilada; la solución B compuesta de 0,5 g de tartrato de sodio-potasio ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) disueltos en 30 ml de agua destilada en una matraz aforado de 50 ml de capacidad. Adicionalmente, se añadió 0,25 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) y posteriormente fue enrasado con agua destilada. La solución alcalina de cobre (reactivo 1) consistió en mezclar 50 ml del reactivo A con 1 ml de reactivo B, y el reactivo Folin (reactivo 2) fue preparado diluyendo 50 ml de reactivo Folin-Ciocalteu fenol (densidad de  $1,22 \text{ g l}^{-1}$ ). Se usó albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  como estándar. Esta solución es estable durante 3 días a  $5^\circ\text{C}$ . La absorbancia fue medida a 750 nm (BioLab Applic21, alta densidad).

### **Determinación de grupos sulfhidrilos**

De la glándula digestiva fue tomado 0,5 g y se homogeneizó en 8 ml de un buffer de extracción, Tris- $Na_2EDTA$  a  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ , a pH 8,2. El homogeneizado se dejó por 5 horas a temperatura ambiente y luego, se le adicionaron 0,5 ml ácido ditionitrobenzoico (DTNB)  $0,016 \text{ mol l}^{-1}$  y 3,1 ml de metanol absoluto. La mezcla fue dejada a temperatura ambiente por 15 minutos y filtrada con papel de Whatman N° 4. La absorbancia se midió a 415 nm y los valores obtenidos fueron expresados en milimoles de sulfhidrilos por gramo de masa húmeda (mMoles de  $-SH/gmh$ ) (Sedlak y Lindsay, 1968).

### **Metalotioneínas**

El contenido de las metalotioneínas (MT) fue determinado usando el método espectrofotométrico, planteado por Viarengo *et al.* (1997) con pequeñas modificaciones técnicas. Un gramo de masa húmeda de la glándula digestiva del guacuco *T. mactroides* fue homogeneizado en 4 ml de un buffer de extracción Tris-HCl  $20 \text{ mol l}^{-1}$  a pH 8,6 que contenía  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  de sacarosa,  $6 \mu\text{mol l}^{-1}$  de leupeptina,  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF),  $2 \text{ mol}$

$\text{l}^{-1}$  de ditionitrobenzoato (DTNB) y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%. Las MT estuvieron protegidas de oxidación y de proteasas bajo estas condiciones, durante el proceso de homogeneización. El homogeneizado fue centrifugado a 4 400 rpm por 1 hora a 0-4°C, para separar el sobrenadante, en una centrífuga Eppendorf modelo 5702R.

A cada mililitro de sobrenadante le fue añadido 1,05 ml de etanol más 80  $\mu\text{l}$  de cloroformo en frío (-20°C). Luego fue centrifugado a 4 000 rpm por 10 minutos, a 0-4°C. El sobrenadante fue combinado con 1 mg de ARN, 40  $\mu\text{l}$  de HCl 37% y 3 ml de etanol absoluto frío. La solución extraída fue mantenida a -20°C por dos horas y centrifugadas nuevamente a 4 000 rpm por 10 minutos. El precipitado contenido de la fracción de MT fue lavado con etanol 87% y cloroformo 1% en un buffer de homogeneización y, posteriormente, fue centrifugado a 4 000 rpm por 10 minutos. El precipitado fue secado bajo una atmósfera de nitrógeno y luego resuspendido en 150  $\mu\text{l}$  de NaCl a 0,25 mol  $\text{l}^{-1}$ , 150  $\mu\text{l}$  de HCl 1 mol  $\text{l}^{-1}$  y EDTA 4 mol  $\text{l}^{-1}$ . Luego se le añadió una solución preparada con 4,2 ml de NaCl 2 mol  $\text{l}^{-1}$ , ácido ditionitrobenzoico (DTNB) 0,43 mol  $\text{l}^{-1}$  en buffer Na-fosfato 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  a pH 8, a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue centrifugada por 5 minutos a 3 000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para determinar la absorbancia a 412 nm, usando glutatióna reducida como estándar.

La cantidad de MT fue definida con base en un contenido de cisteína del 29% por cada mol de MT (tomando arbitrariamente los valores de MT correspondiente a especies afines). Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  de MT/gmh.

### **Tratamiento estadístico de datos**

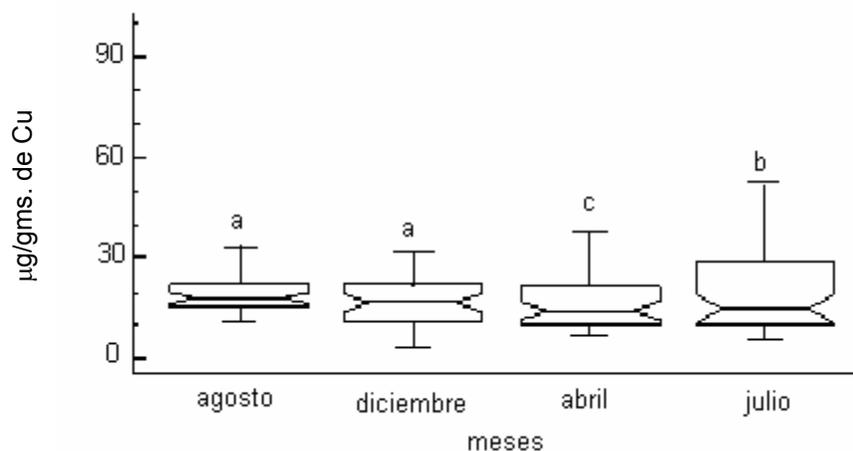
Para establecer diferencias entre los niveles de metales pesados y

biomarcadores moleculares en el tejido de *T. mactroides* en los distintos meses muestreados se aplicó un análisis de varianza (ANOVA I), previo cumplimiento de todos los supuestos. En los casos donde existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se aplicó la prueba *a posteriori* de Duncan (Sokal y Rohlf, 1979). De igual forma se aplicó un análisis de correlación entre el contenido de MT, -SH, PT totales versus las concentraciones de cada metal. Para tal fin se usó como herramienta estadística el programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

## RESULTADOS

### Concentración de metales pesados

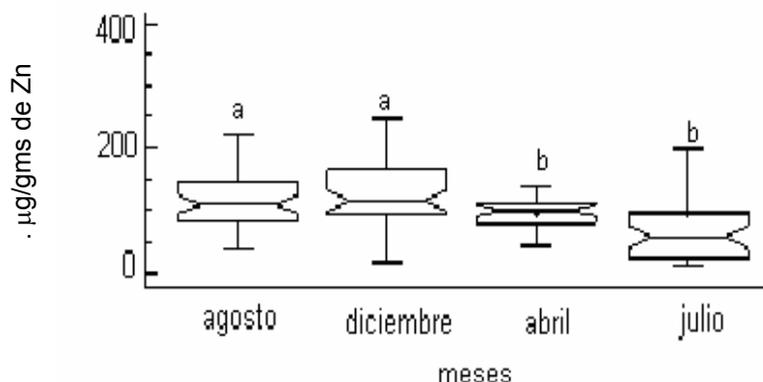
En la figura 2 se muestra la concentración de cobre en el tejido blando de *T. mactroides*. Existen diferencias altamente significativas en el contenido de este metal entre los meses ( $F_s=7,19$ ;  $p<0,001$ ) (Apéndice 3). El análisis *a posteriori* (Apéndice 4) demostró que hay similitud sólo entre los meses de agosto y diciembre (a), siendo julio el mes con el mayor promedio ( $29,44 \pm 21,68 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (b) y abril con el menor promedio ( $12,39 \pm 9,89 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (c).



**Figura 2.** Concentración de cobre (Cu) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de playa Caicara. Las letras (a,b,c) reseñan las comparaciones de acuerdo al análisis de Duncan.

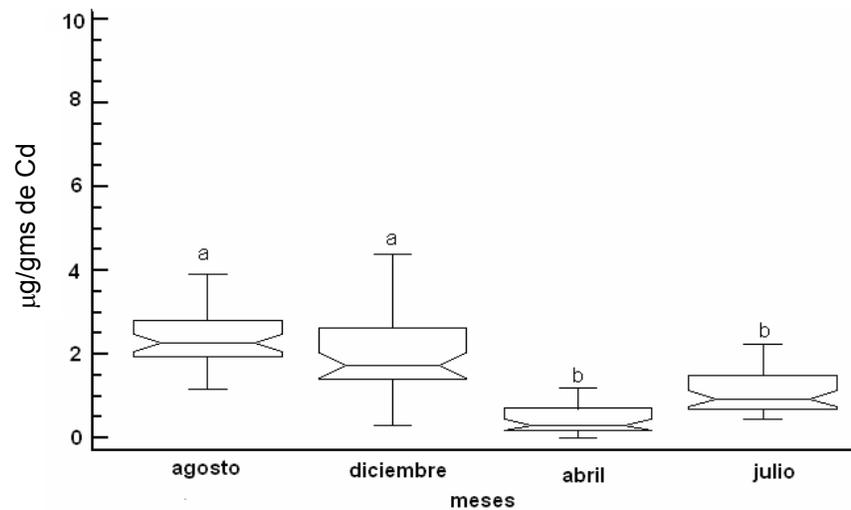
En la figura 3 se muestra la concentración de zinc en el tejido blando de *T. mactroides*, durante los meses de colecta. El Zn fue uno de los metales que presentó las mayores concentraciones durante el periodo estudiado, con diferencias mensuales altamente significativas ( $F_s= 10,29$ ;  $p< 0,001$ ) (Apéndice 5). La prueba *a posteriori* de Duncan muestra la formación de dos grupos, uno formado por agosto y diciembre con promedios elevados de Zn (a) y el otro

conformado por los meses de abril y julio, con los niveles más bajos del metal (b) (Apéndice 6). Los mayores registros de concentración fueron observados durante el mes de diciembre ( $145,86 \pm 65,43 \mu\text{g g}^{-1}$ ).



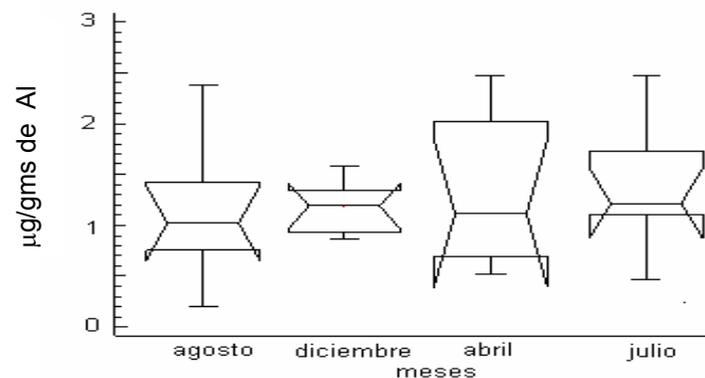
**Figura 3.** Concentración de zinc (Zn) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de playa Caicara. Las letras (a,b) reseñan las comparaciones mensuales de acuerdo al análisis de Duncan.

En la figura 4 se muestra la concentración de cadmio en *T. mactroides*, durante los distintos meses. Para este metal se encontraron diferencias altamente significativas entre los meses ( $F_s = 25,24$ ;  $p < 0,001$ ) (Apéndice 7). Los niveles de Cd presentaron una distribución estadísticamente similar para los meses de agosto y diciembre (a) y otra para los meses de julio y abril (b), registrándose en el mes de agosto la más alta concentración promedio de  $2,9 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$  (Apéndice 8).



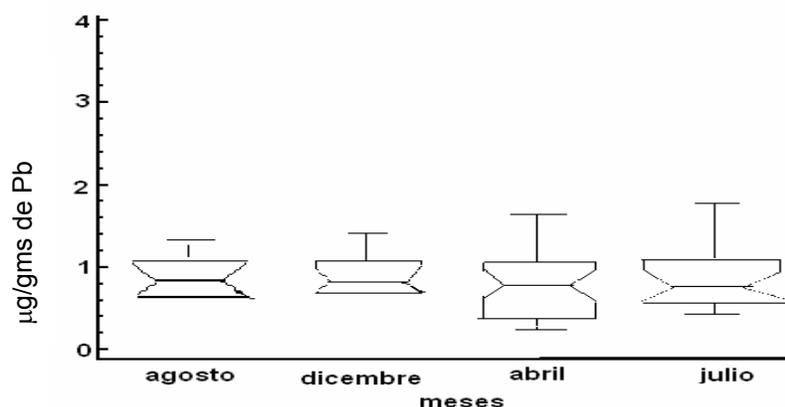
**Figura 4.** Concentración de cadmio (Cd) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de playa Caicara. Las letras (a,b) reseñan las comparaciones mensuales de acuerdo al análisis de Duncan.

En la figura 5 se muestran las concentraciones de aluminio, donde no se encontraron diferencias significativas ( $F_s=0,75$ ;  $p>0,05$ ) (Apéndice 9).



**Figura 5.** Concentración de aluminio (Al) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de playa Caicara

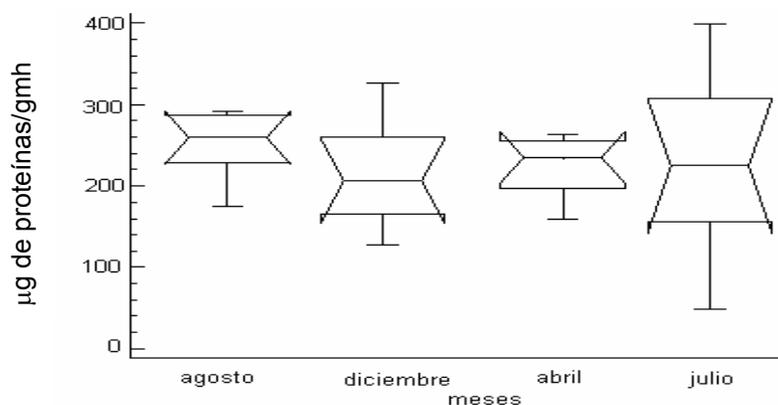
En la figura 6 se muestran las concentraciones de plomo, donde no se encontraron diferencias significativas ( $F_s=2,34$ ;  $p>0,05$ ) (Apéndice 10).



**Figura 6.** Concentración de plomo (Pb) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de playa Caicara.

### Proteínas totales y grupos sulfhidrilos (-SH):

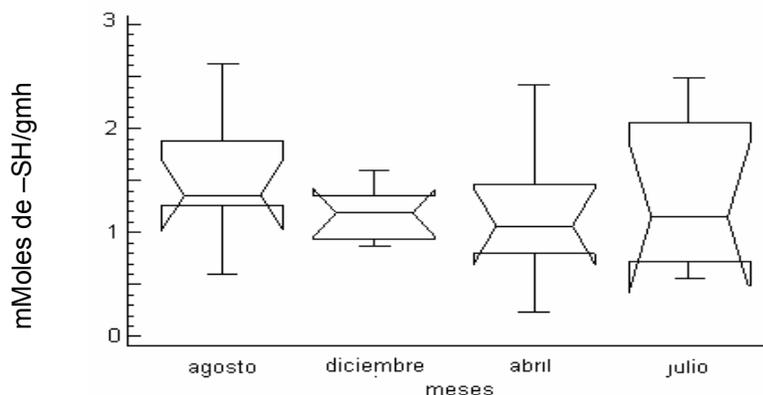
Las proteínas totales contenidas en la glándula digestiva de *T. mactroides* no mostraron diferencias significativas durante los distintos meses de muestreo ( $F_s = 0,39$ ;  $p > 0,05$ ) (Apéndice 11). El menor y mayor promedio de estas proteínas fueron encontrados en diciembre ( $214,7 \mu\text{g gmh}^{-1}$ ) y agosto ( $252,3 \mu\text{g gmh}^{-1}$ ), respectivamente (Fig. 7).



**Figura 7.** Cuantificación de proteínas en *T. mactroides* de playa Caicara.

Los grupos -SH contenidos en la glándula digestiva de *T. mactroides* no mostraron diferencias significativas durante los distintos meses de muestreos

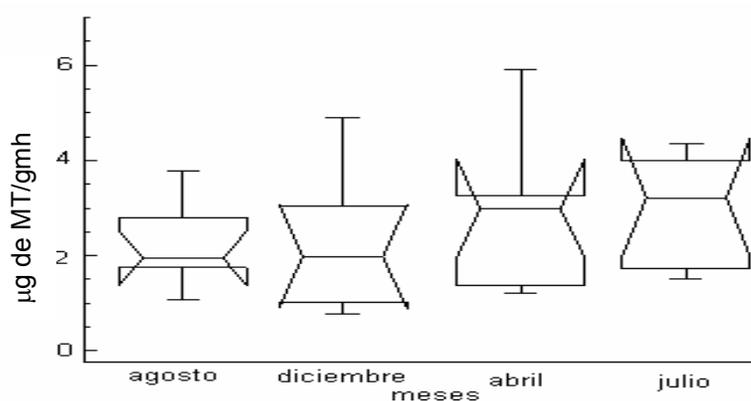
( $F_s = 0,75$ ;  $p > 0,05$ ) (Fig. 8) (Apéndice 12).



**Figura 8.** Concentración de grupos sulfhidrilos (-SH) en *T. mactroides* de playa Caicara

### Metalotioneínas

Aunque los niveles de MT contenidos en la glándula digestiva de *T. mactroides* presentan variación, no mostraron diferencias significativas durante los distintos meses de muestreo ( $F_s = 1,96$ ;  $p > 0,05$ ) (Apéndice 13). El menor y mayor valor de concentración estas proteínas de bajas masas moleculares fueron encontrados en agosto ( $40,36 \mu\text{g gmh}^{-1}$ ) y julio ( $64,47 \mu\text{g gmh}^{-1}$ ), respectivamente.



**Figura 9.** Concentración de metalotioneínas (MT) en la glándula digestiva de *T. mactroides* de playa Caicara.

En la tabla 1 se muestra el análisis de correlación entre las concentraciones de metales y los biomarcadores moleculares asociados en la glándula digestiva del guacuco *T. mactroides*. En la misma se puede apreciar que no se encontró ninguna relación entre los parámetros en estudio.

**Tabla 1.** Análisis de correlación entre la concentración de metales pesados y el contenido de metalotioneínas, grupos sulfhidrilos y proteínas totales en el guacuco *T. mactroides* de playa Caicara, estado Anzoátegui, Venezuela (Coeficiente y  $r^2$ )

Metales	Cu	Zn	Cd	Pb	Al
MT	0,31 (0,37)	0,19 (0,28)	0,28 (0,60)	0,41 (0,68)	0,27 (0,51)
-SH	- 0,13 (0,46)	- 0,05 (0,75)	0,13 (0,71)	0,15 (0,69)	0,21 (0,30)
Proteínas	0,10 (0,57)	0,05 (0,77)	0,38 (0,77)	0,01 (0,91)	0,01 (0,91)

## DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que el guacuco *T. mactroides* de playa Caicara se encuentra en un ambiente que le permite acumular significativas concentraciones de metales pesados, particularmente Cu, Zn, Pb y Cd, los cuales en el tejido blando de *T. mactroides* presentaron valores por encima a lo establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), administración de drogas y fármacos (FDA) y legislación brasileña de alimentación (BFL) (Apéndice 14) (Méndez *et al.*, 2009). Estas concentraciones indican la biodisponibilidad de tales elementos químicos en el ambiente y la capacidad de acumulación de los mismos por parte de los organismos que habitan tales ecosistemas.

De igual forma, los resultados demuestran que los niveles de metales pesados en *T. mactroides* pueden variar dependiendo de la estacionalidad. Por ejemplo, los más altos niveles de Cu fueron registrados en el mes de julio; Cd en agosto y Zn en agosto y diciembre. El máximo valor de Cu encontrado fue  $29,44 \pm 21,68 \mu\text{g g}^{-1}$ . El mes de julio fue caracterizado por temperaturas ligeramente altas  $\sim 27 - 28^\circ\text{C}$  y abundantes precipitaciones. Rajkumar *et al.* (1992) reportaron que un aumento significativo de la temperatura generalmente favorece la tasa metabólica de los organismos, ayudando así al proceso de acumulación de metales como el Cu presente en el medio. Se ha considerado que los elevados niveles de Cu en *T. mactroides* pueden ocasionar daños fisiológicos en el organismo, disminuyendo el índice ARN/ADN o inclusive producir letalidad en presencia de concentraciones en el orden de  $1-2 \text{ mg l}^{-1}$  (Acosta y Lodeiros, 2004). Sin embargo, en la localidad de playa Caicara, Rivera (2004), reporta valores máximos de Cu de  $14,4 \pm 3,2 \mu\text{g g}^{-1}$  en la misma especie. Acosta y Lodeiros (2004), en las costas de Río Chico y Boca de Paparo en el estado Miranda, dos zonas contaminadas biológica y

químicamente, encontraron rangos de Cu que oscilaban entre 71,51 a 189,89  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Es por esto que los anteriores autores consideran a *T. mactroides* como una especie indicadora de contaminación por Cu.

Los valores corporales de Zn tienden a ser elevados en estos organismos, encontrándose el valor más elevado en diciembre ( $145,86 \pm 65,43 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Rivera (2004), en el tejido blando de *T. mactroides* colectado en la misma zona estudiada, encontró valores de  $1072 \pm 27,9 \mu\text{g g}^{-1}$ . El Zn en pequeñas cantidades actúa como componente catalítico indispensable para el crecimiento y tiende a incrementarse con el tiempo de exposición y la talla del cuerpo (Usero *et al.*, 1996). Por otro lado, metales como el Zn y el Cu juegan un papel importante a nivel molecular como cofactores enzimáticos, y las correlaciones significativas entre metales y variables biológicas pueden ser debidas a las necesidades bioquímicas y/o al secuestro pasivo de los metales debido a la unión intracelular del elemento (Raimbow *et al.*, 1990). A pesar de su importancia fisiológica es bien conocido que a altas concentraciones el Zn puede ser sumamente tóxico (Pasquali, 2003).

Gamboa *et al.* (1986) y Rivera (2004) comentan que existe una marcada influencia del Zn por el río Neverí, la cual parece ser la causa principal de aporte del metal, ya que por este río concurren una gama de sustancias antropogénicas de origen industrial, doméstico y agrícola. Esta sugerencia está fundamentado por los datos reportados por Bonilla *et al.* (1998) donde se muestran altos niveles de Zn en los sedimentos del área en estudio.

Las concentraciones de Cd obtenidas en los tejidos de la población estudiada variaron entre meses, observándose valores de  $2,9 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ , comparados con los registrados por Rivera (2004) en la misma especie ( $0,88 \pm 0,36 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Existen evidencias de que un alto porcentaje de Cd que penetra al organismo se acumula y sólo una pequeña parte es excretada; lo que

posiblemente origina una competencia, entre el Cd y metales esenciales como el Zn y Cu, e inhibir la actividad de enzimas antioxidantes, que incluyen catalasa y manganeso-superoxido dismutasa. (Onosaka *et al.*, 1984; Gallant y Cherian, 1987; Casalino *et al.*, 2002). El Cd puede inducir daño molecular al unirse a grupos sulfhidrilos de proteínas u otros tioles de bajas masas moleculares. Las moléculas tioladas son compuestos que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno. Dado que es el grupo funcional del aminoácido cisteína, el grupo tiol desempeña un papel importante en los sistemas biológicos, por lo tanto, la determinación de tioles podría considerarse un importante parámetro auxiliar, en el diagnóstico y monitoreo de organismos marinos expuestos a ambientes contaminados por cadmio (Salazar-Lugo *et al.*, 2009).

Para el aluminio no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones y los valores encontrados fueron muy bajos en comparación con los de Rivera (2004), que encontró una alta concentración de  $73,3 \pm 54,5 \mu\text{g g}^{-1}$  en *T. mactroides*.

El Pb no presentó diferencias significativas entre las concentraciones de los metales pesados en el área de estudio. Los valores fueron bajos a lo reportado por Rivera (2004) que encontró la concentración más alta de este metal en  $4,12 \pm 1,91 \mu\text{g g}^{-1}$  en la misma área de estudio, la presencia de Pb en el tejido blando del guacuco puede ser debido a que su ingreso está restringido por los cambios de factores ambientales, como la salinidad, temperatura, surgencia, pluviosidad, entre otros (Laurent, 2008).

Los resultados revelan que los organismos colectados en época de lluvias (principalmente en julio) presentaron una mayor concentración de metales pesados, asociado probablemente a una alta ocurrencia de fenómenos de escurrimiento y mezcla por resuspensión del material del sedimento hacia la

columna de agua. Es evidente que la zona de estudio recibe los afluentes del río Neverí que se combinan con colectores de aguas residuales y aguas servidas en la zona baja del río. De igual forma, también recibe los desechos industriales provenientes del complejo petrolero-petroquímico, evidenciándose su impacto por la presencia en el tejido blando de la almeja de metales pesados, de alta significancia ecotoxicológica. En los estudios de impacto ambiental es importante la selección del organismo biomonitor y de los biomarcadores a determinar. García *et al.* (2009) demostraron, realizando una evaluación de riesgo ecológico en una área influenciada por hidrocarburos provenientes del centro refinador de Paraguaná en Venezuela, la utilidad de algunos biomarcadores moleculares en *T. mactroides* que habitaban en la línea de costa, usando ensayos de toxicidad, durante la estación seca (marzo) y lluviosa (julio). La evaluación reveló un gradiente de contaminación en el área, junto a un incremento concomitante en las enzimas del citocromo P<sub>450</sub> en los organismos expuestos a sedimentos con altas concentraciones de hidrocarburos. De igual manera fueron observados algunos cambios estacionales en las respuestas enzimáticas.

Queda la expectativa si en *T. mactroides* existen mecanismos alternativos suficientemente efectivos para contrarrestar el ingreso y toxicidad de metales pesados en su cuerpo, permitiendo la adaptabilidad y sobrevivencia al área estudiada; un área en la cual es conocida la elevada presencia de metales pesados en el sedimento (Bonilla *et al.*, 1998). Diferencialmente, Sardi *et al.* (2009) encontraron significativas respuestas en marcadores enzimáticos en *T. mactroides* expuestos a sedimentos con distintos niveles de contaminación. Estos autores determinaron las actividades de las enzimas relacionadas con la biotransformación de xenobióticos orgánicos e hidrocarburos (MFO), y algunas enzimas antioxidantes, encontrando incrementos de las actividades del P<sub>450</sub>, b<sub>5</sub>, NADPH c reductasa, glutathione-S-transferasa y una inhibición en superóxido dismutasa.

A pesar de los elevados aportes metálicos de origen antropogénico al medio, los biomarcadores (metalotioneínas, proteínas totales y grupos sulfhidrilos) no manifestaron ningún tipo de perturbación a nivel molecular, lo que sugiere que *T. mactroides* posee mecanismos de defensa relevantes ante la toxicidad de tales concentraciones. No obstante, los niveles en los biomarcadores moleculares determinados en *T. mactroides* y la homogeneidad de los mismos en los meses de colecta revelan, en comparación con los rangos reportados en organismos afines que habitan zonas impactadas, que su entorno presumiblemente no afecta su fisiología. Se ha demostrado que los valores de MT por encima de los reportados por estos organismos son considerados como indicio de contaminación y de estrés químico en especies afines, por ejemplo Petrovich *et al.* (2001) encontró valores de MT que oscilaban entre 50 -100  $\mu\text{g g}^{-1}$  en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* en un área con baja concentración de metales. Zapata – Vivenes y Nusetti (2007) reportan promedios de MT de 500 – 600  $\mu\text{g/gmh}$  en *Perna viridis* expuestos a Cd.

En presencia de altas concentraciones de metales pesados (Cu, Zn, Cd, Pb) en la glándula digestiva son estimulados para incrementar la biosíntesis de compuestos ricos en grupos tioles, tales como metalotioneínas, proteínas enlazadoras de metales, y tioles de bajas masas molares como la glutatióna y cisteína elementos fundamentales en la defensa molecular-antioxidante en el organismo. En moluscos bivalvos, los sistemas antioxidantes incluyen compuestos de bajas masas molares como la glutatióna reducida y otras como ácido ascórbico, vitamina A, E. Adicionalmente existen las enzimas glutatióna – S – transferasa (GST), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Winston, 1991). Tales compuestos antioxidantes juegan un rol crucial en el mantenimiento de estado de óxido – reducción de las células. La actividad del sistema antioxidante puede aumentar o inhibirse bajo una condición de estrés químico (Winston y Di Giulio, 1991). La inducción de los compuestos antioxidantes puede aumentar la tolerancia del organismo a un medio

impactado por agentes prooxidantes, por el contrario la deficiencia en el sistema antioxidante resulta en un precario estado fisiológico para enfrentar las variaciones ambientales (Cossu *et al.*, 2000).

Aunque estadísticamente no se encontró relación directa entre las concentraciones de los diferentes metales medidos y el contenido de metalotioneínas, proteínas totales y grupos sulfhidrilos en la glándula digestiva, se recomienda evaluar en *T. mactroides* otros biomarcadores, donde se consideren las influencias de factores abióticos y bióticos, actividad basal enzimática y respuesta a contaminantes específicos.

Se podría recomendar el uso de *T. mactroides* como un organismo ideal para monitorear ecosistemas contaminados por metales pesados, a pesar de no encontrar correspondencia con la determinación de los biomarcadores moleculares afines a este tipo de contaminación. Al parecer, este organismo posee una gran capacidad de acumular metales, aun en mayor concentración que el entorno, sin manifestar una respuesta molecular específica.

## **CONCLUSIONES**

Las altas concentraciones de algunos metales (Zn, Cu) registradas en la zona pueden ser debido a la contaminación originada por la planta de fraccionamiento y por los aportes del río Neverí.

Se confirma que la variación en la concentración de los metales pesados (Zn, Cu, Al, Cd y Pb) puede ser estacional, influenciado el ingreso de metal principalmente por periodos de lluvias.

Los niveles de metalotioneínas, grupos sulfhidrilos y proteínas totales no mostraron indicios de alteraciones moleculares, relacionadas con contaminación por metales pesados; sin embargo, las concentraciones corporales de Cd, Pb, Cu, Zn y Al evaluados dejan ver una señal de alarma sobre el ingreso de xenobióticos al área vía antropogénica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, V. 2001. Estado fisiológico de poblaciones del guacuco *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en ambiente con diferentes grados de contaminación. Trabajo de postgrado. Departamento de Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Acosta, V. y Lodeiros, C. 2004. Metales pesados en la almeja *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en localidades costeras con diferentes grados de contaminación en Venezuela. *Ciencias Marinas*, 30: 1-11.
- Acosta, V.; Lodeiros, C.; Senior, W. y Martínez, G. 2002. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela. *Interciencia*, 27: 686-690.
- Allen–Gil, S.; Gubala, C.; Dixon, H. y Lasorsa, B. 1997. Heavy metals accumulation in sediment and freshwater fish in US arctic lakes. *Environment Toxicology Chemical*, 16: 733-741.
- Alfonso, J.; Azocar, J.; LaBrecque, J.; García, B.; y Palacios, D. 2008. Trace metals in bivalves and seagrass collected from Venezuelan coastal sites. *Journal Tropical Biology*, 56: 215-222
- Bonilla, J.; Fermín, J. y González, C. 1998. Análisis estadístico multivariante aplicado al grado textural y a los aspectos geoquímicos de los sedimentos del ecosistema marino costero de Jose, estado Anzoátegui, Venezuela. *Boletín Instituto Oceanográfico de Venezuela Universidad de Oriente*, 37: 53-62.

- Borchardt, T.; Burchert, H.; Hablizel, P.; Karbe, L. y Zeitnert, R. 1998. Trace metal concentration in mussels: Comparison between estuarine, coastal and offshore regions in the southeastern North Sea from 1993 to 1996. *Marine Ecology*, 42:17-31.
- Butt, T.; Sternberg, E.; Mirabelli, C. y Crooke, S. 1986. Regulation of metallothionein gene expression in mammalian cells by gold compounds. *Molecular Pharmacology*, 29: 204-210.
- Casalino, E.; Calzaretti, G.; Sblano, C. y Landriscina, C. 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179: 37-50.
- Cossu, C.; Doyotte, A.; Jacquin, M.; Babut, M.; Exinger, A. y Vasseur, P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Environment Ecotoxicology*, 45: 106-121.
- Dang, C.; Berntssen, M.; Lundebye, A.; Flik, G. y Lock, R. 2001. Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of atlantic salmon *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium. *Aquatic Toxicology*, 53: 91-101.
- Díaz-Mayans, J.; Torreblanca, A. y Del Ramo, J. 1993. Presencia de metales en medio acuático. En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A. y Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona.
- Forstner, U. y Prosi, F. 1978. *Heavy metal pollution in freshwater ecosystem*. Institut für Sediment Forshung, Universität Heidelberg, Germany.

- Gallant, K. y Cherian, M. 1987. Changes in dietary zinc result in specific alterations of metallothionein concentrations in newborn rat liver. *Journal Nutrimet*, 117: 709-716.
- Gamboa, B.; Bonilla, J. y Cedeño, G. 1986. Concentración de algunos metales pesados en sedimentos superficiales de la Bahía de Pozuelos y áreas adyacentes, estado Anzoátegui, Venezuela. *Boletín Instituto Oceanográfico de Venezuela Universidad de Oriente*, 25: 233-240.
- García, Y.; Severeyn, H.; Grant, W. y Reverol, Y. 2002. Effect of water temperature on larval development of the bivalve mollusk *Tivela mactroides*: evaluation in the laboratory and via simulation. *Ecology Models*, 129: 143-151.
- García, M.; Ramos, R.; Manuitt, P. y Guerra, E. 2009. Ecological risk assessment in the influence area of an oil refining complex (Centro Refinador Paraguaná) in Venezuela: An evaluative approach using toxicity bioassays and biomarkers expressed in the organisms present in this marine coastal axis. 15<sup>th</sup> Interanational Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 15). Bordeaux, Francia.
- Godoy, A.; Severeyn, H. y Delgado, J. 1997. Estudio comparativo de la densidad y biomasa de la almeja *Tivela mactroides* en tres playas arenosas de alta energía del estado Zulia, Venezuela. *Acta Científica Venezolana*, 48: 58-66.
- Gutiérrez-Galindo, E.; Flores, G.; Olgún, G. y Villaescusa, J. 1990. Biodisponibilidad de metales traza en almejas y mejillón del valle agrícola de Mexicali y Alto Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 6: 1-28.

- Gutiérrez, E.; Villaescusa, J. y Arreola, A. 1999. Bioacumulación de metales de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Ciencias Marinas*, 25: 557-578.
- Hamer D. 1986. Metallothionein. *Annual Journal of Biochemistry*, 55: 913-951.
- Jaffé, R.; Leal, I.; Alvarado, J.; Gardinali, P. y Sericanos, J. 1995. Pollution effects of the Tuy River on the central Venezuelan Coast: Anthropogenic organic compounds and heavy metal in *Tivela mactroides*. *Marine Pollution Bulletin*, 30: 290-300.
- Kagi, J. y Kojima, Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Supplement*, 52: 25-61.
- Karin, M. 1998. Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell*, 41: 9-10.
- Kojima, Y. 1991. Definitions and nomenclature of metallothionein. *Metal Enzyme*, 205: 8-10.
- Krishnakumar, P.; Casilla, E. y Varanasi, U. 1994. Effects of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washintong, USA. I. Cytochemical of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 106: 249-261.
- LaBrecque, J.; Benzo, Z.; Alfonso, J.; Cordoves, P.; Quintal; M.; Gomez, C. y Marcano, E. 2004. The concentrations of select trace elements in clams, *Trivela mactroidea* along the Venezuelan coast in the state of Miranda. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 659- 667.

- Laurent, C. 2008. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Lowe, D.; Fossato, V. y Depledge, M. 1999. Contaminant – induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon: an *in vitro* study. *Marine Ecology Progress Series*, 129: 189-196.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biological Chemical*, 193: 265-275.
- Mas, A. y Arola, L. 1993. Conceptos generales del metabolismo de metales. En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A. y Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona.
- Martínez, G. y Senior, W. 2002. Especiación de Cd, Zn, Cr y Pb en núcleos de sedimentos de la bahía de Bergantín, estado Anzoátegui, Venezuela. *Interciencia*, 27: 342-351.
- Méndez, J.; González, C.; Ramírez, A.; Gutiérrez, R. y Prieto, F. 2009. Contaminación por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 29-44
- Mendoza, J. y Marcano, J. 2000. Abundancia y evaluación del guacuco *Tivela mactroides* en la ensenada de la Guardia, Isla de Margarita, Venezuela. *Boletín Instituto Oceanográfico de Venezuela Universidad de Oriente*, 39: 79-91.

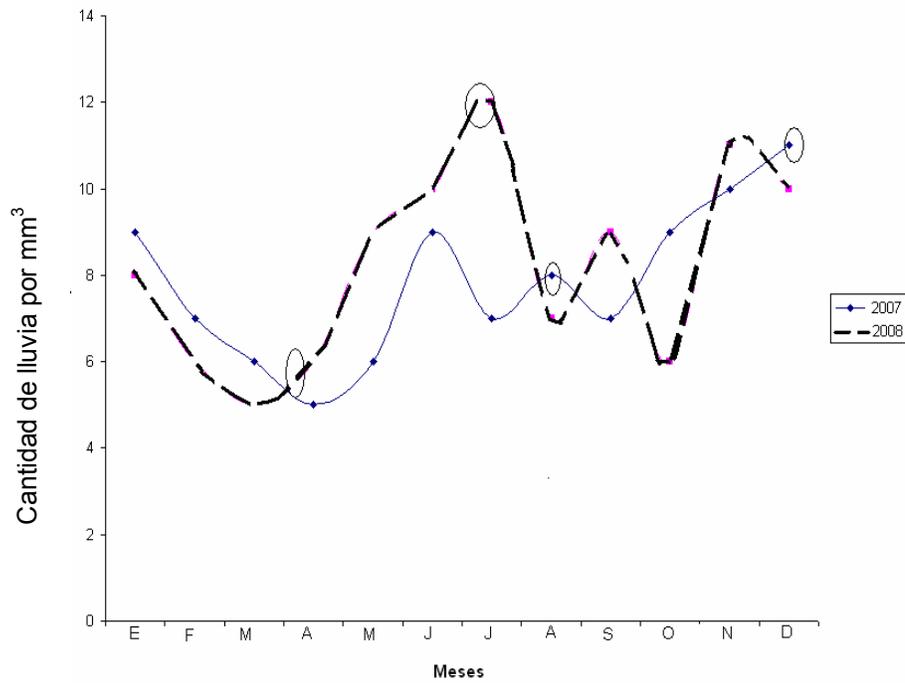
- Muto, N.; Ren, W.; Hwang, G.; Tominaga, S.; Itoh, N. y Tanka, K. 1999. Induction of two isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals. *Compositio Biochemistry Physiology*, 122: 75-82.
- Nusetti, O.; Tovar, M. y Zapata-Vívenes, E. 2010. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subjected to anoxic and aerobic conditions. *Journal of Shellfish Research* (en prensa).
- Olivier, F.; Ridd, M. y Klumpp, D. 2002. The use of transplanted cultured tropical oyster (*Saccostrea commercialis*) to monitor Cd levels in North Queensland coastal waters (Australia). *Marine Pollution Bulletin*, 44: 1051-1062.
- Onosaka, S.; Tanka, K. y Cherian, M. 1984. Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein. *Environment Health*, 54: 67-72.
- Pasquali, R. 2003. *Química ambiental*. Akadia Editorial, Buenos Aires.
- Patrick, L. 2003. Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Alternative Medicine Journal*, 8:1-18.
- Petrovich, S.; Ozretic, B.; Krajnovic, M. y Bobinac, D. 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels *Mytilus galloprovincialis* how biomarker in a field study. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 1373-1378.
- Peakall, D. 1994. The role of biomarkers in assessment. *Introduction to Ecotoxicology*, 3: 157-160.

- Prieto, A. 1977. Contribución a la ecología de *Tivela mactroides* Born, 1778 (Mollusca: Bivalvia). Aspectos reproductivos y distribución de tallas. Trabajo de Postgrado. Departamento de Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Raimbow, P.; Phillips, D. y Depledge, M. 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates: A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Marine Pollution Bulletin*, 12: 321-324.
- Rajkumar, W.; Mungal, R. y Bahadoorsingh, E. 1992. Heavy metal concentration in sea water, sediment and biota (*Donax striatus*) along the east coast of Trinidad. *Caribbean Marine Study*, 3: 26-32.
- Ramírez, R. 1997. *Gran guía de minerales y cristales*. Editorial Everest. Madrid, España.
- Ramírez, T. 1993. Dinámica poblacional y explotación del Guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia: Veneridae) en la Bahía de Güiría, Edo. Sucre. Trabajo de Postgrado. Departamento de Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Rivera, L. 2004. Efectos de metales pesados en lisosomas de células sanguíneas del guacuco, *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en el área de Jose, estado Anzoátegui, Venezuela. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Rojas, L.; Chang, I.; Agard, J.; Bekele, I. y Hubbard, R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oysters (*Crassostrea* sp.) from Trinidad and Venezuela. *Archive Environment Contaminant Toxicology*, 42: 410-415.

- Rojas, L.; Lemus, M.; Rojas, N.; Martínez, G., Ramos, Y. y Chung, K. 2009. Mercury levels in *Perna viridis* from the north coast of Sucre state, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 35: 91-99.
- Ruiz, C. 1983. Procesos fisiológicos asociados a fluctuaciones en el hábitat de *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae). Trabajo Especial de Grado. Dpto. de Biología, Universidad Simón Bolívar, Caracas.
- Sadiq, M. 2002. *Toxic metals in marine environments*. Marcel Dekker Inc, New York.
- Salazar-Lugo, R.; Pérez, R.; León, A.; Lemus, M. y Rojas de Astudillo, L. 2009. Determinación de tioles totales y tioles solubles en ácido en el pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) expuesto a cadmio. *Revista Científica Universidad del Zulia*, 19: 414-420.
- Sánchez, R. y Vera, D. 2001. Manual introductorio de ecotoxicología acuática. *Informe Instituto del Mar del Perú*, 161:1-40.
- Sardi, A.; Ramos, R. y García E. 2009. Hydrocarbons biomarkers in the mollusk *Tivela mactroides* exposed to polluted sediments. 15<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 15). Bordeaux, Francia.
- Searle, P.; Davison, B.; Stuart, G.; Wilkie, T.; Norstedt, G. y Palmiter, R. 1984. Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molecular Cellular Biology*, 4: 1221-1230.
- Sedlak, J., y Lindsay, R. 1968. Estimation of total, protein-bound, and

- nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analysis Biochemistry*, 25: 192-205.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. *Biometría*. Ed. H. Blume. Madrid, España.
- Usero, J.; González, E. y García, I. 1996. Trace metals in the bivalve mollusc *Chamelea gallina* from the Atlantic coast of southern Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 305-310 .
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F. y Fabbri, M. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environment Magazine*, 44: 69-84.
- Weeks, J.; Sharp, V. y Williams, T. 1997. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of green mussel *Perna viridis* (Mytilidae) a field transplant studie. *Marine Pollution Bulletin*, 2: 4-17.
- Winston, G. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Composition Biochemistry Physiology*, 100: 173-176.
- Winston, G. y Di Giulio, R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism. *Aquatic Toxicology*, 19: 137-161.
- Zapata-Vívenes, E. y Nusetti, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *Journal of Shellfish Research*, 26: 1-10.

## APÉNDICE



Apéndice 1. Índice de pluviosidad ( $\text{mm}^3$ ) en la zona norte del estado Anzoátegui. Años 2007 – 2008. Los meses de colecta se resaltan con círculos punteados. Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH).

Apéndice 2. Comparación de los valores experimentales del material de referencia (Oyster 1566a) con valores certificados y sus límites de detección ( $\text{mg l}^{-1}$ ) para cada metal del espectrómetro de emisión atómica acoplado inductivamente a un plasma (ICP) marca Perkin Elmer, modelo optima 5300 DV.

Elemento	Material de referencia ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Valores experimentales ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Límite de detección (ICP)
Cu	66,3 ± 4,3	60,05	0,004
Zn	137 ± 13	117,95	0,002
Cd	4,15 ± 0,38	2,42	0,009
Al	202,5 ± 12,5	186,5	0,005
Pb	38,3 ± 11,8	25,31	0,007

Apéndice 3. Análisis de varianza para la concentración de Cu en *T. mactroides* de playa Caicara.

Fuente de Variación	Suma De Cuadrados	Gl	Media Cuadrada	Razón F	P
Entre Meses	5859,24	3	1953,08	7,19	0,0001*
Error	42383,3	156	271,69		
Total	48242,6	159			

gl: grados de libertad, \* significativo  $p < 0,001$

Apéndice 4. Comparación (Duncan) de los parámetros mensuales de la concentración de Cu ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Muestreo</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Abril	40	12,39	X
Agosto	40	20,31	X
Diciembre	40	21,71	X
Julio	40	29,44	X

Apéndice 5. Análisis de varianza para la concentración de Zn en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	193897,0	3	64632,4	10,29	0,0001*
<b>Error</b>	979652,0	156	6279,82		
<b>Total</b>	1,17	159			

gl: grados de libertad, \* Significativo  $p < 0,001$

Apéndice 6. Comparación (Duncan) de los parámetros mensuales de la concentración de Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Muestreo</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Abril	40	50,11	X
Julio	40	88,33	X
Agosto	40	115,06	X
Diciembre	40	144,68	X

Apéndice 7. Análisis de varianza para la concentración de Cd en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma De Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	102,6	3	34,2	25,2	0,0000*
<b>Error</b>	211,5	156	1,4		
<b>Total</b>	314,2	159			

gl: grados de libertad, \* significativo  $p < 0,001$

Apéndice 8. Comparación (Duncan) de los parámetros mensuales de la concentración de Cd ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) en *T. mactroides* de playa Caicara, estado Anzoátegui, Venezuela.

<b>Muestreo</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Agosto	40	2,4	X
Diciembre	40	2,3	X
Abril	40	0,6	X
Julio	40	1,1	X

Apéndice 9. Análisis de varianza para la concentración de Al en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	0,82	3	0,27	0,75	0,52 NS
<b>Error</b>	10,22	28	0,36		
<b>Total</b>	11,05	31			

gl: grados de libertad, NS: no significativo  $p>0,05$

Apéndice 10. Análisis de varianza para la concentración de Pb en *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	640,74	3	213,6	2,34	0,07NS
<b>Error</b>	14255,1	156	91,4		
<b>Total</b>	14895,9	159			

gl: grados de libertad, NS: no significativo  $p > 0,05$

Apéndice 11. Análisis de varianza para la cuantificación de proteínas en  $\mu\text{g gmh}^{-1}$  de *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma De Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	6375,83	3	2125,28	0,39	0,76 NS
<b>Error</b>	153511,0	28	5482,52		
<b>Total</b>	159886,0	31			

gl: grados de libertad, NS: no significativo  $p > 0,05$

Apéndice 12. Análisis de varianza para la determinación de grupos –SH gmh<sup>-1</sup> de *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma De Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	0,83	3	0,28	0,75	0,53 NS
<b>Error</b>	10,23	28	0,37		
<b>Total</b>	11,05	31			

gl: grados de libertad, NS: no significativo  $p > 0,05$

Apéndice 13. Análisis de varianza para la concentración de MT en  $\mu\text{g gmh}^{-1}$  en la glándula digestiva de *T. mactroides* de playa Caicara.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Media Cuadrada</b>	<b>Razón F</b>	<b>P</b>
<b>Entre Meses</b>	9,62	3	3,21	1,96	0,14 NS
<b>Error</b>	45,88	28	1,64		
<b>Total</b>	55,50	31			

gl: grados de libertad, NS: no significativo  $p > 0,05$

Apéndice 14. Valores máximos permitido  $\mu\text{g g}^{-1}$  por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), administración de drogas y fármacos (FDA) y legislación brasileña de alimentación (BFL).

	Cu	Zn	Cd	Pb
FAO	10,00	50	1,00	2,00
FDA	-----	-----	4,00	1,70
BFL	0,2	1	0,03	0,015

Apéndice 15. Comparación de las concentraciones de algunos metales pesados ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en el tejido blando del guacuco *T. mactroides* de diferentes localidades.

Localidad	Cu	Zn	Cd	Pb	Ref.
Edo. Miranda	11-49	55-166	<1-1,9	<1,5-4,9	LaBrecque <i>et al.</i> (2004)
Edo. Miranda	60,7-152	226-266	2,2-3,3	2-3,1	Jaffé <i>et al.</i> (1995)
Boca de Paparo	71-189	210-390	1,23-6,31	nr	Acosta y Lodeiros, (2004)
Río Chico	40-20	25-130	2,60- 5,64	0,02-1,80	“
Playa Guiria	10-20	50-100	0,7-6,52	nr	“
Boca de Aroa	26,3-1,3	78,1-9,7	3,6-0,1	nr	Alfonso <i>et al.</i> (2008)
Playa Caicara	29,4-12,3	145- 60	2,9 -1.2	1,2 -1,5	Este estudio

nr: no reportado

## HOJA DE METADATOS

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

<b>Título</b>	METALOTIONEÍNAS Y METALES PESADOS EN EL GUACUCO <i>Tivela mactroides</i> (Born, 1778) (BIVALVIA), COLECTADO EN PLAYA CAICARA, ESTADO ANZOÁTEGUI, VENEZUELA (Modalidad: Investigación)
---------------	---

### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Rodríguez M., Wladimir D	CVLAC	V-14885299
	e-mail	wladirodrig@hotmail.com
	e-mail	

### Palabras o frases claves:

metalotioneínas
metales pesados
playa Caicara

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

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencia	Bioquímica
	Ecotoxicología

### Resumen (abstract):

Se evaluó el potencial impacto por metales pesados en la localidad de playa Caicara, estado Anzoátegui (Venezuela). Para ello se procedió a determinar la carga corporal de metales pesados (Cu, Zn, Al, Cd y Pb) y marcadores moleculares relacionados, tales como metalotioneínas (MT), grupos sulfhidrilos (-SH) y proteínas totales (PT) presentes en el guacuco *Tivela mactroides*. Se compararon estos parámetros en organismos colectados en los meses de agosto y diciembre del 2007, abril y julio del 2008. Los organismos fueron colectados manualmente a profundidades de 0 a 2 m, sexualmente maduros sin distinción de sexo, con tallas que oscilaron entre 30 y 35 mm de longitud. El tejido blando de cada ejemplar fue extraído de su concha y almacenado a – 20°C. Los niveles de metales pesados fueron cuantificados en todo el tejido blando usando el método desarrollado por Rojas *et al.* (2002). Para la valoración del contenido de MT, -SH y PT en la glándula digestiva fueron utilizadas las metodologías propuestas por Viarengo *et al.* (1997), Sedlak y Lindsay (1968) y Lowry *et al.* (1951), respectivamente. Se detectaron altas concentraciones para el mes de julio en la mayoría de los metales pesados analizados, coincidiendo con la temporada de máximos índices de pluviosidad en la zona, a excepción del Zn y Cd con concentraciones en los meses de diciembre y agosto respectivamente. Los promedios obtenidos de metales pesados son considerados elevados si se contrastan con los datos reportados por otras investigaciones, donde se usó como modelo biológico almejas provenientes de zonas costeras de distintas localidades del oriente venezolano. Los niveles de Cu y Zn se encontraron por encima de los valores establecidos por organizaciones internacionales tales como FAO, FDA y BFL. Las concentraciones de MT, -SH y PT no mostraron variación significativa entre los meses de colecta. De igual manera, no se evidenció correlación ni asociación estadística entre los niveles de metales pesados y los marcadores moleculares determinados. Los resultados no muestran indicios de alteraciones moleculares relacionadas con contaminación por metales pesados, sin embargo los niveles de Cu y Zn detectados en el tejido blando de *T. mactroides* reflejan una señal de alarma de ingreso de xenobióticos vía antropogénica en la zona.



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

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Prof. Luisa Rojas de Astudillo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	lrojas40@yahoo.com
Prof. Edgar A. Zapata V	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	edzapata2002@yahoo.com

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	11	15

Lenguaje: spa

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

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-WladimirRodriguez.doc	Aplication/Word

### Alcance:

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

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

**Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Biología**

**Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado**

**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, Wladimir David Rodríguez Medina, portador de la C.I.- 14.885.299, autorizo a la biblioteca central de la UDO-SUCRE la utilización de mi trabajo de grado para ser publicado en su totalidad.**

---

---

---

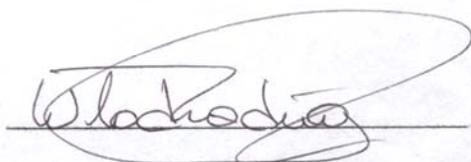
---

---

---

---

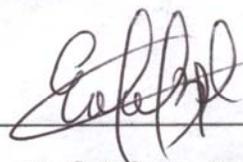
---



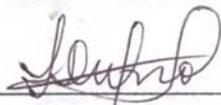
**Wladimir David Rodríguez Medina**



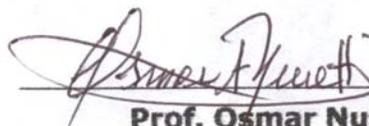
**Profa. Luisa Rojas de Astudillo**  
Asesora Académica



**Prof. Edgar A. Zapata V.**  
Co - Asesor



**Profa. Leida Marciano**  
Jurado Principal



**Prof. Osmar Nusetti**  
Jurado Principal

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS**

