



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO DE BIOLOGÍA APLICADA
ECOTOXICOLOGÍA AMBIENTAL

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS ENLAZADORAS DE
CADMIO EN *Ascidia nigra* (Savigny, 1816)

Lcda. Roseulys Del Valle Benítez Fariñas

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGIA
APLICADA, MENCIÓN ECOTOXICOLOGIA

Cumaná, 2012

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS ENLAZADORAS DE
CADMIO EN *Ascidia nigra* (Savigny, 1816)**

Aprobado por:

Dra. Mairin Lemus
Asesora

Dra. Sonia Nusetti
Jurado Principal

MSc. Edgar Zapata
Jurado Principal

INDICE GENERAL

<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>i</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>ii</u>
<u>LISTA DE TABLAS.....</u>	<u>iii</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>iv</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>vi</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>1</u>
<u>METODOLOGÍA.....</u>	<u>8</u>
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	<u>14</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>31</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>32</u>
<u>Hoja de Metadatos.....</u>	<u>38</u>

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a DIOS TODOPODEROSO, a la VIRGEN DEL VALLE, en especial a la memoria de mi madre OMAIRA DE BENITEZ, que siempre está conmigo y a mi padre PEDRO RAFAEL BENITEZ, gracias por ser el apoyo más grande de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle primeramente a Dios y a la virgen del Valle, por iluminarme y darme fuerzas para seguir adelante.

A mi familia, en especial a mi padre PEDRO RAFAEL BENITEZ y a mis hermanos RAFAEL JOSE Y JESUS EDUARDO, por su apoyo incondicional y por ser mis guías en todo momento.

Doy gracias especiales a mi tutora la Dra. MAIRIN LEMUS por su paciencia, su positivismo y ese apoyo que me brindo, este trabajo también es suyo.

Al Prof. LUIS ARREDONDO, por estar pendiente de su hija adoptiva gracias profe.

Al CENTRO DE INVESTIGACIONES DE GUAYACAN por prestarme sus instalaciones y su personal para la realización de este trabajo.

A mis niñas bellas VALERIA, OMAIRYS Y ROSMAIRYS, por ser esos rayitos de felicidad que tengo en la vida. ¡LAS AMOS MIS REINAS!

A mis amigas CAROL, ADRIANA, ALEJANDRA, HEIDY, LUZ, YDELYS, VICTOR, AHIESKA, por no dejarme caer y ser mi desahogo en momentos malos.

A mis amigos de la oficina de Misión Ribas Zona 2, DELENIN, MARILYS, MILFRED, ANGELICA, E IVONNE SU COORDINADORA y a ELIAS por prestarme su apoyo desinteresado

En especial a todos aquellos que de una u otra forma pusieron su granito de arena para que este trabajo se llevara a cabo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Concentración de cadmio en ppm, en la fracción proteica citoplasmática (µg/g de tejido) de ejemplares de <i>Ascidia nigra</i> expuestos a dosis 0,2 mg/L subletal de cadmio.....	17
Tabla 2. – Porcentaje de enlazamiento de cadmio de posibles proteínas provenientes de la FC del tejido blando de <i>Ascidia nigra</i>	27
Tabla 3.- Porcentaje de enlazamiento de cadmio de proteínas provenientes de la FC de la túnica de <i>Ascidia nigra</i>	29

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Ubicación de la zona de colecta del tunicado <i>Ascidia nigra</i>	8
Figura. 2.- Niveles de cadmio (Cd) en ppm en los tejidos de <i>Ascidia nigra</i> en condiciones ambientales. La barra indica la desviación estándar. (T: túnica, B: branquias, S.D.: sistema digestivo, H: hepatopáncreas, M: músculo).....	14
Figura 3.- Perfil cromatográfico de las proteínas y presencia de grupos sulfhidrilos presentes en la FC de la túnica de <i>Ascidia nigra</i> (280-412 nm).....	21
Figura. 4.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC de la túnica de organismos controles de <i>Ascidia nigra</i> . (361 nm).....	21
Figura. 5.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC de la túnica de organismos de <i>Ascidia nigra</i> , expuestos a 0,2 mg/l de cadmio. (361 nm).....	21
Figura. 6.- Perfil cromatográfico de las proteínas y presencia de grupos sulfhidrilos del FC del tejido blando de <i>Ascidia nigra</i> (280-412 nm).....	23
Figura 7.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC del tejido blando de organismos controles de <i>Ascidia nigra</i> . (361 nm).....	23
Figura. 8.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC del tejido blando de organismos de <i>Ascidia nigra</i> , expuestos a 0,2 mg/l de cadmio. (361 nm).....	23
Figura 9.- Curva de calibración de la columna de exclusión molecular de Sephadex G-75, para las proteínas marcadoras BSA, Anhidrasa C. y Citocromo C.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

n= Número de muestras

P= Probabilidad

S= Desviación estándar

RESUMEN

Se evaluó la presencia de proteínas enlazadoras de cadmio en tejidos del tunicado *Ascidia nigra*. Los organismos fueron colectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre y llevados al Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán (CIEG) para su aclimatación, posteriormente se determinó la presencia de cadmio en 5 ejemplares de *A. nigra* para tener una línea basal del metal, para ello se les disectó hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo túnica y branquias, para luego ser tratados con HNO₃ y ser leídos en absorción atómica, de igual manera después del periodo de aclimatación se determinó el LC₅₀, utilizando el método Probit, del cadmio para esta especie resultando ser de 0,2 mg/L. Se realizó un bioensayo agudo de 7 días para inducir la presencia de proteínas enlazadoras de metal, exponiendo los animales al LC₅₀ encontrado. Los ejemplares (4 org) a exponer, fueron colocados en acuarios de 5 l de capacidad, utilizando el mismo patrón para los ejemplares controles. El agua y el metal fueron renovados diariamente, la temperatura promedio fue de 30 ± 2 °C, salinidad 36‰, fotoperiodo 12/12. Después de haber transcurrido los 7 días de exposición fueron congelados, para posteriormente ser trasladados, al laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico de Venezuela, donde se separaron en túnica y tejido blando (constituido por hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo y branquias), se homogenizaron para la caracterización parcial de las proteínas enlazadoras del metal siguiendo la metodología propuesta por Wallace y col. (2000). 2 mg de la Fracción citoplasmática (FC) fueron colocadas en una columna G-75 previamente equilibrada y calibrada con masas moleculares conocidas. La columna fue excluida a una velocidad de 2 ml/60 min y las fracciones fueron analizadas a 280 nm y grupos sulfhidrilos a 412 nm. Las fracciones eluidas se les determinó el contenido de cadmio, cobre y zinc por espectrofotometría de absorción atómica a 361 nm y a las que contenían cadmio, se les estimó el peso molecular. Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron que *A. nigra* proveniente del ambiente natural, es capaz de bioacumular Cd en sus tejidos, tal como se observó en el tejido branquial que presentó la mayor concentración con un valor promedio de 20,5 ± 22,27 mg/L. En cuanto a la incorporación de cadmio a la fracción citoplasmática (FC) en los organismos expuestos se encontró que la túnica arrojó un valor de 0,852 µg/g, mientras que en el tejido blando fue de 1,320 µg/g a diferencia de los controles que presentaron 0,157 µg/g y 0,316 µg/g para túnica y en el tejido blando respectivamente. Se determinó que el cadmio se enlaza a una proteína con una masa molecular menor que la del Citocromo C, aproximadamente de 6 a 2 kDa en FC de tejido blando, por otra parte en la túnica se reportó una proteína similar, aproximadamente 14 kDa y otra de alta masa molecular, aproximadamente 74 kDa, que enlazó metal de igual manera. Los resultados demuestran la presencia de una proteína rica en grupos sulfhidrilos que enlaza metal y se encuentra tanto en tejido blando como en la túnica y la cual se sugiere que pueda ser una metalotionina, mientras que la otra no presenta grupos sulfhidrilos y por su alto peso molecular

podría ser otra clase de ligando. Debido al poco porcentaje de incorporación de Cd en la FC durante este estudio y la alta mortalidad que presentan los organismos bajo condiciones controladas, se puede señalar que la especie *Ascidia nigra* no es un organismos ideal para estudios en condiciones de laboratorio

INTRODUCCIÓN

La *Ascidia nigra* es un tunicado, solitario, sésil y filtrador, que se alimenta del plancton, perteneciente a la familia Ascidiidae, clase Ascidiaceae, es un organismo que se localiza ampliamente en el Mar Caribe (Fernández, 2007, Van Name, 1945), en Venezuela, particularmente en el Golfo de Cariaco (Arredondo, 2002). El tunicado solitario negro, *A. nigra* es una especie notable que se distingue de otros organismos incrustantes, como las esponjas porque su cuerpo es de color negro azulado marrón-negro con textura de cuero (Goodbody, 1962; Voss, 1980; Kaplan, 1988; Da Rocha y col., 1999). Además este grupo de organismos presentan una importancia filogenética en comparación con otros invertebrados, ya que se ubican en un grupo aparte llamado urochordata, por compartir características filogenéticas con los vertebrados, por otro lado, en algunas partes del mundo, como en China resulta ser de importancia alimenticia (Hickman y col., 1995).

Se ha demostrado que algunos miembros de la familia Ascidiidae son organismos de fácil manejo bajo condiciones de confinamiento por su capacidad de adaptación, tal es el caso de *Ciona intestinalis* que ha sido utilizada para llevar a cabo bioensayos de toxicidad bajo condiciones de controladas con bastante éxito (Bellas y col., 2001; Bellas y col., 2004). Estos autores evaluaron el efecto de diversos metales sobre el desarrollo de diferentes etapas de la especie. Erk y col. (2005), estudiaron la acumulación de cadmio en *C. intestinales* sometiendo al organismo a dosis subletales de dicho metal, obteniendo que la mayor acumulación se encontró en la túnica.

Pyura vittata también es otra especie que ha sido exitosa en ensayos de toxicidad. Arredondo (2002) determinó que la bioacumulación de cobre trae como consecuencia alteraciones celulares sugiriendo que las células hialinas presentan la mayor defensa contra la toxicidad de dicho metal. para esta misma especie también se encontraron influencias significativas en la población celular celómica al exponer dicho organismo a metales como el zinc y el cadmio, presentando cierta variación en

la proporción celular por la exposición a dichos metales (Benítez, 2007; Rodríguez, 2007).

Rodríguez (2007) estudió la bioacumulación del zinc en túnica, hepatopáncreas, músculo y branquias de *P. vittata* a una dosis subletal y demostró que la túnica presentó mayor acumulación, mientras que Benítez (2007) demostró que a diferencia del trabajo realizado por Rodríguez (2007) este metal se acumula principalmente en el tejido hepatopáncreas.

Otros miembros de esta familia no han sido utilizados para llevar a cabo ensayos de toxicidad, tal es el caso de *Ascidia nigra*, que a pesar de que se tienen amplios conocimientos sobre su biología (Bermúdez y Grimaldi, 1975; Noriega, 1982), morfología y distribución (Bermúdez y Grimaldi, 1975) y su posición filogenética, no son abundantes las investigaciones en el uso de esta especie en el área de toxicología.

Las alteraciones causadas por los metales pesados en organismos marinos dependen de la biodisponibilidad de estos elementos y la capacidad de ser incorporados en los diferentes compartimientos de los mismos. La incorporación de metales tiene como primera línea de defensa una respuesta celular, sin embargo una vez superada esta barrera es capaz de ser incorporado en los diferentes tejidos y enlazarse a proteínas de varios pesos moleculares alterando su función (Arredondo, 2002; Lemus, 2004).

Diversos estudios sobre enlazamiento de metales pesados a proteínas demuestran que existen gran variedad de ellas que enlazan de manera específica o de forma inespecífica a los metales, por lo que se han encontrado proteínas de varios masas moleculares (Marcano y col., 1996) (Bustamante y col., 2006). Existen diferentes proteínas inducidas por metales pesados en organismos acuáticos, entre ellas se encuentra la síntesis de polipéptidos de alto peso molecular. A estas proteínas se les han denominado “proteínas enlazadoras de metales” entre las cuales se incluyen las proteínas reportadas en *Mytilus edulis* (> 20-25 kDa; Roesjadi, 1986), *Saccostrea cucullata* (> 60 kDa; Web y col., 1985), *Crassostrea virginica* y *C. gigas*

(20-70 kDa; Siewicki y col., 1983), *Carcinus maenas* (27 kDa; Rainbow y Scott, 1979), *Eurythoe complanata* (60kDa; Marcano y col., 1996), y las más estudiadas son las llamadas metalotioninas proteínas de bajo peso molecular enlazadoras de metal (Reyes, 1999).-

Entre las proteínas que enlazan metal las que presentan mayor descripción en la literatura son las metalotioninas y se han considerado como un excelente biomarcador de toxicidad, particularmente a lo que se refiere a metales pesados como cadmio, cobre y mercurio. Un biomarcador no es más que respuestas biológicas a un químico o químicos que dan una medida cuantificable o no de la exposición y en algunos casos también el efecto tóxico (Walkers y col., 1996). Otra definición más reciente, es que los biomarcadores son una medida a nivel molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, indicando que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante (Cajaraville, 2003).

El término “Metalotioneina” fue introducido por Margoshes y Vallee (1957) por primera vez, para designar a proteínas ricas en azufre que contenían Cd, Zn, Cu, y provenían del córtex renal del caballo, dichas proteínas están presentes en todos los organismos vivos y constituyen una superfamilia de proteínas intracelulares capaces de unir metales de transición y metales pesados (López, 2007). La inducción de esta proteína en el organismo, es debido, a una activación transcripcional de los genes por iones metálicos los cuales se unen a un receptor y este a su vez estimula la transcripción de las metalotioninas por interacción directa con las secuencias de control contenido en el ADN nuclear (Brambila y González, 1993).

Las metalotioninas se caracterizan por tener bajo peso molecular (6 - 12 kDa), alto contenido metálico, composición característica de aminoácidos (alto contenido de cisteína, ausencia de histidina y de aminoácidos aromáticos), secuencia única de aminoácidos, con una distribución característica de los residuos de cisteína en la

forma Cys - X - Cys, y características espectroscópicas propias de uniones mercaptido (azufre - metal).

En un principio se consideró que la presencia de estas proteínas estaba relacionada con un mecanismo de detoxificación del cadmio acumulado en el tejido renal de estos animales, sin embargo más tarde se demostró su papel en la homeostasis de los metales bioesenciales (Antón, 2002; Kang, 2006). Las metalotioninas han recibido este nombre debido a su capacidad de unión de metales y su abundancia de grupos sulfhidrilos provenientes de los aminoácidos cisteína (Brambila y Lozano, 2000).

En mamíferos, se han descrito cuatro isoformas de las MTs (numeradas del I al IV). La MT-I y la MT-II se expresan en casi todos los tejidos del organismo siendo particularmente importante su presencia en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro. Estudios *in vitro* han mostrado que estas proteínas son sintetizadas en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y químicos, tales como: hormonas, citocinas, especies reactivas de oxígeno, metales y de manera importante por estrés. Recientemente se han relacionado con procesos de estrés inflamatorio, especialmente durante una respuesta de fase aguda, aunque su función en estos procesos aún está por definir (López, 2007).

La inducción de metalotioninas en condiciones de laboratorio está bien documentada (Lemus, 2004; Amiard y col., 2005; Benedicto, 2005, Erk y col., 2005; Hardiviller y col., 2006), sin embargo el incremento de esta proteína está sujeta a variaciones fisiológicas y ambientales que deben ser consideradas para que pueda representar un biomarcador (Amiard y col., 2005). Los estudios ecotóxicológicos ameritan realizar evaluaciones básicas de los niveles de esta proteína en campo para de esta manera poder establecer si la misma puede alterar su concentración durante la exposición a un tóxico.

En la mayoría de los trabajos conocidos para inducir respuestas, ya sean celulares o bioquímicas, en las ascidias se han utilizado metales como cobre y

cadmio, este último se ha caracterizado por su alta toxicidad a dosis muy bajas (Benítez, 2007).

El cadmio (Cd), es un metal no esencial y es uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial, pues posee las características más temidas de un tóxico, como los efectos adversos para el hombre y el medio que lo rodea: bioacumulación, persistencia en el ambiente, “viaja” a grandes distancias con el viento y en los cursos de agua. El cadmio se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico del zinc y del plomo, a partir de sulfuro de cadmio; en el proceso hay formación de óxido de cadmio, compuesto muy tóxico. Usos en la metalurgia y su larga vida media no permiten el reciclaje, por lo que se acumula progresivamente en el ambiente. El cadmio es un elemento relativamente raro en la litosfera. Por afinidad química, se encuentra junto al zinc, en proporción muy variable (Ramírez, 2002).

El cadmio se utiliza para evitar la corrosión, como pigmento, constituyente de baterías, y en la fabricación de algunos plásticos. El cadmio se encuentra directamente debajo del zinc en la tabla periódica y se comporta químicamente como este. El zinc es un oligoelemento esencial, el cadmio puede sustituir al zinc y causar procesos metabólicos que acarrear enfermedades y pueden causar hasta la muerte (Manahan, 2002).

El cadmio, al igual que los otros metales pesados, induce estrés oxidativo, su efecto está relacionado con la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, específicamente a nivel del complejo III en el sitio de unión de la semiubiquinona, afectando la transferencia de electrones; la semiubiquinona, es conocida porque transfiere un electrón al oxígeno molecular para formar el anión superóxido, esto explica el efecto oxidativo inducido por este metal en las células (Salazar-Lugo, 2009). El cadmio es más tóxico que el cobre, ya que el valor límite legal en organismos acuáticos es 1 ppm, valores superiores son considerados altamente tóxicos (Viarengo y Nott, 1992), y en agua el valor para los compuestos que lo contienen es de 0,02 mg/l como promedio mensual (Lu, 2000). Además, la

concentración de cadmio en el agua varía ampliamente, las más altas se han observado en ríos y zonas costeras, que reciben aguas contaminadas por industrias electrónicas y metalúrgicas (López, 1994; Rand y col., 1995).

El cadmio es absorbido por el tracto gastrointestinal. Uno de los mecanismos que existe para su absorción activa en el intestino delgado es a través de la acción de proteínas de de calcio baja masa molecular, designadas como CaBP. El cadmio se excreta del cuerpo tanto por la orina como por las heces. Los mecanismos de excreción de cadmio no son muy conocidos. El cadmio es un veneno acumulativo biológico con una vida media estimada en cerca de 20 a 30 años en los seres humanos. Alrededor de la mitad de la carga corporal de cadmio se encuentra en el hígado y los riñones (Manahan, 2002).

Una de las vías principales por las cuales entra este metal al organismo en los mamíferos es por la inhalación. En Venezuela se cuenta actualmente con empresas tales como talleres de mecánica, latonería y pintura, recuperación de chatarras, entre otras. Estas generalmente se encuentran en zonas con alta densidad poblacional y sin ningún control de higiene y seguridad laboral, siendo esto un peligro de contaminación. En Maracaibo estado Zulia se conoce de un caso de contaminación por cadmio en madres y niños recién nacidos en el 2005, en donde los niveles estaban por encima de los legales y sugerían regular la exposición a fuentes antropogénicas por este metal (Marcano y col., 2005), ya que el riesgo de que estas personas presentaran enfermedades graves es muy grande.

Los estudios de las proteínas enlazadoras de metal en invertebrados son muy numerosos y se han asociado a una gran cantidad de funciones fisiológicas, como barredores de radicales libres (Kang, 2006) y enlazamiento de metales tóxicos en ambientes contaminados. Sin embargo, la caracterización total de estas proteínas está restringida a un menor número de organismos. En el caso de la especie *A. nigra* los estudios sobre estas proteínas son pocos o nulos. Por lo que es necesario el conocimiento sobre proteínas enlazadoras de cadmio en el tunicado *A. nigra* y si estas pertenecen al grupo de las metalotioninas o si existen otras proteínas que enlazan el

metal. Para ello se realizaron ensayos agudos con *A. nigra* en condiciones de laboratorio, así como también se estudió su capacidad de acumular el Cd, además de darle respaldo a su importancia como bioindicador.

METODOLOGÍA

Material Biológico

Los ejemplares de *A. nigra* se colectaron en la localidad de Guayacán, Península de Araya, Estado, Sucre, Venezuela (Fig. 1), por buceo autónomo a una profundidad comprendida entre 4 y 8 metros. Luego los ejemplares fueron trasladados al laboratorio del Centro de Investigación Ecológicas de Guayacán (CIEG) en cavas de anime con agua de mar y aireación; se aclimataron por una semana en acuarios de 30 L de capacidad debidamente aireados, y una vez culminado este período, fueron llevados al laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico de Venezuela para la realización de los análisis de toxicidad y caracterización de proteínas.

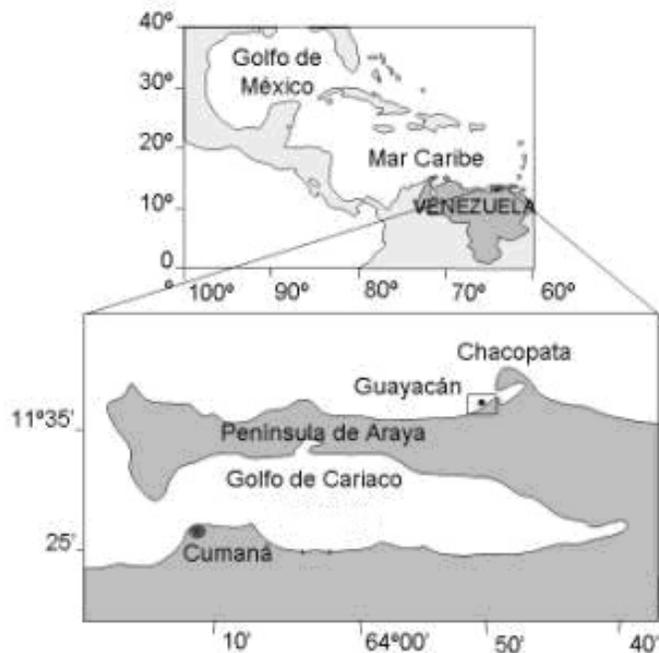


Figura. 1. Ubicación de la zona de colecta del tunicado *Ascidia nigra*

Determinación de cadmio en tejidos blandos *A. nigra* en ambiente natural

Para determinar la distribución de cadmio en los tejidos de *A. nigra* obtenidos del ambiente natural, se tomaron 5 organismos, a los cuales se les disectó túnica, hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo y branquias.

Los tejidos fueron colocados en envases plásticos con HNO₃ al 30% marca Merck por 24 h, a temperatura ambiente durante la noche, posteriormente se colocaron a 60°C durante 3 h la túnica y el resto de las muestras en 40 min para completar la digestión. Posteriormente las muestras fueron filtradas con papel Wharman No 42 hasta un volumen total de 25 ml con agua desionizada con 10-18 mΩ.cm. y seguidamente fue determinada la concentración de cadmio como se describe posteriormente.

Todas las muestras orgánicas fueron tratadas de acuerdo al procedimiento EPA (1976). El cadmio fue cuantificado en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Optima (modelo 5300 DV) a 351 nm, con una sensibilidad de 165-782 nm, con un límite de detección para Cd entre 0,1 a 1 ppb, que va desde luz UV hasta luz visible, calibrado con estándares marca Accustandard del metal con rango desde 0,25 a 4,00 ppm. La concentración fue referida en base al peso húmedo y cada muestra fue leída por duplicado.

Bioensayo de toxicidad

Determinación de la concentración letal media (LC₅₀)

Para llevar a cabo la determinación del límite de tolerancia media a 96 h, se siguió la metodología APHA (1985). Para ello se utilizaron cinco dosis de cadmio 0,075 mg/L a 750 mg/L (Reish, 1980), preparadas a partir de cloruro de cadmio CdCl₂ en acuarios de 5 L de capacidad y colocando 6 organismos; estos ensayos se realizaron por duplicado. El metal se mezcló con el agua de mar filtrada durante 20 min, para luego colocar los organismos.

Durante el tiempo de exposición se evaluó la conducta y sobrevivencia, tomándose como muertas aquellas ascidias que no respondían a la estimulación mecánica de los sifones.

Para el cálculo de la concentración letal media (LC_{50}) se empleó el programa desarrollado por Stephan (1971) Método Probit. De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba, se realizó la selección de la dosis subletal media, considerando la máxima concentración que garantice la sobrevivencia de los organismos durante el período de exposición y al mismo tiempo garantice la expresión o inducción de proteínas tal como lo sugiere Lemus (2005) para el invertebrado *Emerita portoricensis*.

Ensayo Agudo:

Este bioensayo consistió en exponer a los individuos de *A. nigra* a la dosis subletal de 0,2 mg/L de cadmio, en acuarios de 3 L por un período de 7 días, con renovación de agua y metal cada 24 horas, período en el cual se realizaron los registros de temperatura, pH, salinidad y el fotoperíodo fue mantenido en 12/12. La dosis utilizada fue la máxima tolerable por los organismos y garantizó la sobrevivencia hasta el último día de exposición, con mínima mortalidad menor que 5%.

Caracterización de proteínas enlazadoras de cadmio

Para la caracterización de las proteínas enlazadoras de cadmio se seleccionó el tejido blando (constituido por branquias, hepatopáncreas, sistema digestivo, músculo) y la túnica. Una vez separados los tejidos fueron congelados a -8°C hasta el momento del análisis.

1.-Extracción de las proteínas del extracto crudo

La extracción de las metaloproteínas se llevó a cabo homogenizando los tejidos, en una proporción de 1:5 en Tris-HCl 20 mmol, pH 8,6, que contenía 10 mmol/L de NaCl (Cloruro de Sodio), 2 mmol/L de DDT (Dithiothreitol) y 0,5 mmol/L de PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo) en frío. El homogenizado fue centrifugado a 40 000

g por una hora a 4°C en una centrifuga refrigerada Chermle 2360K. El sobrenadante fue transferido a envases de ependorf. Se tomó 50 µl del sobrenadante para la cuantificación de las proteínas según el método de Bradford (1976), usando un kit sigma 610-A, utilizando un patrón de Albúmina de Suero de Bovino (BSA) de 300 mg/dl. 100 mg de proteínas fueron aplicados a una columna de exclusión molecular que contenía Sephadex G-75 previamente calibrada con marcadores de masas moleculares.

Otra alícuota del sobrenadante, que en lo sucesivo representara la fracción citoplasmática (FC), fue utilizada para determinar los niveles de cadmio, tomándose 10 ml de cada muestra y mezclándola con 100 µl de HNO₃, al 30 % por 10 min., para luego enrasarlos a 25 ml con agua deshionizada (Lemus, 2005). Los resultados fueron expresados en µg de Cd enlazado a la FC por gramo de tejido húmedo.

2.-Separación parcial de proteínas

Las alícuotas de la FC de controles y expuestos fueron colocados en la columna de Sephadex G-75 de tamaño 25 x 1,5 cm, previamente estabilizada con 20 mmol/L de Tris-HCl, pH 8,6 y calibrada con marcadores de masas moleculares conocidas (Sigma MV GF-70) anhidrasa carbónica 29 kDa; citocromo C 12 kDa y albúmina 67 kDa. El buffer de elusión contenía 10 mmol/l de DTT y 170 µl de PMSF, 0,5 mmol/100 ml de buffer, a una velocidad de flujo de 2 ml/60 seg. La presencia de proteínas se determinó por espectrofotometría de luz UV a una longitud de onda de 280 nm, en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21 D, ya que el objetivo principal era la presencia de proteínas enlazadoras de cadmio con presencia o ausencia de enlaces sulfhidrilos en su estructura.

3.-Determinación de metales asociada a proteínas

En cada uno de los eluatos de la FC de los grupos controles y los expuestos, se midieron las absorbancias de cadmio, cobre y zinc, ya que es muy conocida en la literatura la competencia y similaridad que tiene el cadmio con estos metales esenciales (Salazar-Lugo, 2009), mediante lectura directa por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro Perkin Elmer Optima 5300 DV (Beaty,

1978), con un rango de detección de Zn < 0,1 ppb y para los metales Cu y Cd entre 0,1 a 1 ppb, a una longitud de onda de 226 nm, 213 nm y 327 nm para Cd, Zn y Cu respectivamente. El porcentaje de enlazamiento de cadmio a las fracciones fue calculado considerando el metal total enlazado a todas las fracciones eluidas, estimado por la sumatoria total de las concentraciones parciales obtenidas (Lemus, 2005).

4.-Presencia de grupos sulfhidrilos

Para la determinación de los grupos sulfhidrilos (SH) se utilizó el método Ellman (1959). A 300 μ l de cada fracción eluida de la columna de Sephadex G-75 se le adicionaron 700 μ l de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (3,96 mg DTNB en 10 ml de tampón fosfato 120 mmol pH 8), después de mezclar se dejó reposar por 10 min., para luego ser leída la absorbancia a 412 nm. Estas determinaciones se hicieron en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D.

Estimación de los pesos moleculares de las proteínas

La estimación de los pesos moleculares aparentes de las proteínas eluidas de las muestras, se hizo por comparación de los volúmenes de elución relativos (V_e/V_o) de estas proteínas y los de las proteínas patrones de pesos moleculares conocidos. V_e , representa el volumen de elución de la proteína y V_o , constituye el volumen muerto de la columna; el cual estuvo determinado por el volumen de elución del azul de dextrano (200 kDa). Como proteínas marcadores se utilizaron albumina de suero bovino (67 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo c (12 kDa).

Análisis estadísticos

Los métodos empleados en este estudio fueron: una prueba estadística no paramétrica llamada Kruskal Wallis (KW), para los datos obtenidos de la bioacumulación del cadmio en los tejidos, ya que estos datos no cumplen con los supuestos del ANOVA. A los resultados obtenidos de la incorporación del metal en la

FC se les aplicó un t-student, pruebas que permitieron describir si había o no diferencias entre las variables estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Niveles de cadmio en tejidos de *Ascidia nigra* en condiciones ambientales provenientes de la localidad de Guayacán, estado Sucre.

El análisis del metal en los tejidos de *A. nigra* obtenido del ambiente natural no demostró diferencias significativas ($KW= 7$; $P=0,127175$) en el contenido de cadmio en los tejidos. Sin embargo, a pesar de que no hubo diferencias, por la gran dispersión de datos, el tejido branquial arrojó los más altos valores, con una concentración promedio de $20,52 \text{ ppm} \pm 22,28$, seguido del músculo ($11,8 \text{ ppm} \pm 2,80$), hepatopáncreas ($1,88 \text{ ppm} \pm 2,60$), sistema digestivo ($1,70 \text{ ppm} \pm 2,65$), y por último la túnica ($0,36 \text{ ppm} \pm 0,51$) con una concentración muy baja. (Figura 2).

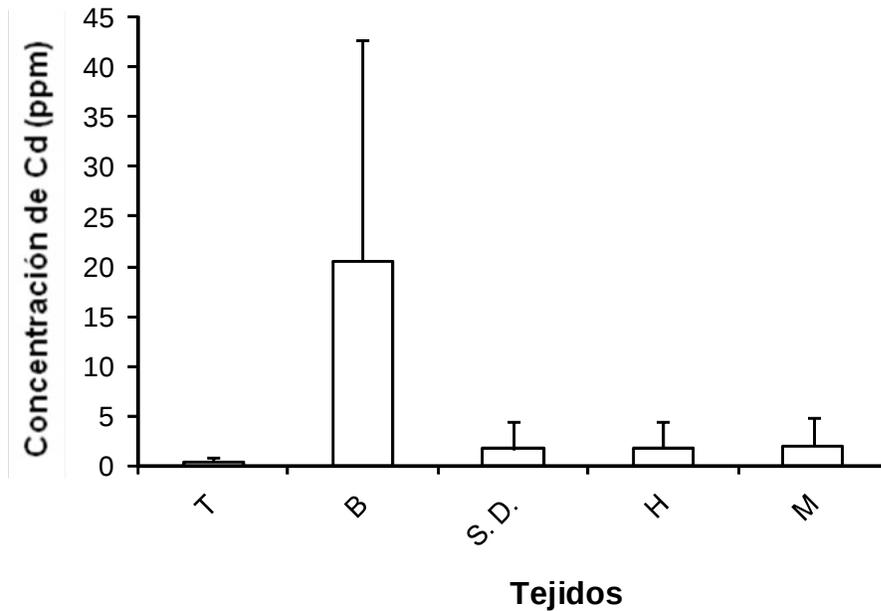


Figura. 2.- Niveles de cadmio (Cd) en ppm en los tejidos de *Ascidia nigra* en condiciones ambientales. La barra indica la desviación estándar. (T: túnica, B: branquias, S.D.: sistema digestivo, H: hepatopáncreas, M: músculo)

Algunos autores señalan, que el tejido branquial en los organismos acuáticos actúa como un filtro de toda aquella sustancia que entra al mismo, y además, es capaz de acumular metal proveniente del agua de mar, como lo reportó White y Rainbow en 1986 para crustáceos decápodos como *Palaemon elegans*. En esta especie se reportaron concentraciones altas de cadmio en branquias, indicando probablemente su función acumuladora de metal.

Hardivillier y col. (2006), afirmaron que en los estudios de las variaciones de las MT y síntesis de ARNm, en las branquias y el manto del mejillón *Bathymodiolus thermophilus* después de una corta exposición a metales, las branquias presentaron una gran importancia en la bioacumulación de dichos metales en Mytilidae, ya que en el organismo control, las branquias de *B. thermophilus* mostraron niveles más altos de metal que el observado para el manto de dicho organismo.

De igual manera Roméo y col. (2005), ratificaron la afirmación anterior, al estudiar el biomonitoreo de metales trazas en *Mytilus galloprovincialis*, provenientes del mar negro y encontrar que las más altas concentraciones se encontraban en las branquias.

Sin embargo, estos resultados se contraponen a los encontrados por Benítez (2007), el cual exponiendo *Pyura vittata* a exposiciones subletales de cadmio la mayor acumulación de metal fue encontrada en el hepatopáncreas, debido a que este órgano cuenta con una mayor capacidad de metabolización de xenobióticos en estos organismos. De igual manera, Erk y col. (2005), estudiaron la acumulación subcelular de cadmio en tejidos de tres invertebrados marinos (mejillón *Mytilus edulis*, el tunicado *Ciona intestinalis* y la estrella de mar *Asterias rubens*) utilizando dosis de Cd radiactivos como trazadores, encontrando diferencias entre especies en la acumulación de Cd, así como diferencias entre los tejidos de las tres especies. Las mayores concentraciones de cadmio en todos los tratamientos de la exposición se encontraron en el hepatopáncreas de *M. edulis* y la pared del cuerpo de *A. rubens*, demostrando que dichos organismos presentan mecanismos particulares que les permiten la bioacumulación de metales en diferentes compartimientos.

La presencia de cadmio encontrado en el tejido digestivo, es respaldado por el trabajo realizado por Cullaj y col. (2007), los cuales estudiaron concentraciones de metales pesados y niveles de metalotioninas en muestras de mejillones de la costa de Albania y demostraron que la glándula digestiva del organismo es una buena acumuladora de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, y Zn, ya que reportó mayor concentración que el resto del tejido blando.

El músculo de *A. nigra*, fue el segundo tejido reportado con mayor cantidad de cadmio, resultado contrario al reportado por Liebrich y col. (1995), quienes observaron que en el tejido muscular de *P. vittata* expuesto a una dosis subletal de cadmio presentó la menor concentración, de igual manera Ray y col. (1981) y White y Raimbow (1986) le atribuyeron la presencia de cadmio en el tejido muscular al transporte de una proteína respiratoria llamada hemocianina, que se encarga de transportar cobre, pero que algunas veces el cadmio puede competir con este metal y ser transportado por dicha proteína.

La menor concentración de cadmio encontrada en la túnica del organismo en la investigación es contraria a lo encontrado por Erk y col. (2005), donde la acumulación de Cd en la túnica de *C. intestinalis* fue alto en comparación a otros tejidos de esta especie, y en el mismo orden de ideas Rodríguez (2007) reportó a la túnica como el tejido de mayor acumulación de zinc, luego de haber expuesto a individuos de *P. vittata* a dosis subletales de dicho metal.

Determinación de la dosis letal media (LC₅₀) en organismo de *Ascidia nigra* expuestos a diferentes concentraciones de cadmio

El valor del LC₅₀ para este especie resultó ser de 0,2 mg/L a 95% de confiabilidad, este valor indica que la especie estudiada resultó ser mucho más tolerante que *Pyura vittata*, para la cual los estudios de LC₅₀ con el mismo metal revelaron una dosis media de 0,02 mg/L (Benítez, 2007), sin embargo, la dosis media encontrada resultó ser mucho más tóxica que para las especies marinas expuestas a cadmio reportadas por Reish (1984), como moluscos (2,2-35 mg/L), crustáceos (0,01-

47 mg/L) y poliquetos (0,2-12 mg/L). Por otro lado, la dosis letal media en *Pyura vittata* expuesta a cobre resultó ser muy sensible ya que fue de 0,01 mg/L (Arredondo, 2002). Todas las conclusiones anteriores acerca del LC₅₀ en organismos marinos, indicaron que la dosis encontrada podría ser muy bien utilizada para la expresión de las proteínas enlazadoras de metal en *A. nigra*, ya que fue 10 veces mayor que la encontrada en especies de la misma clase.

Niveles de cadmio (ppm) en la fracción citoplasmática (FC) de los tejidos de *Ascidia nigra* expuestos a 0,2 mg/L de cadmio

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente se demostró que el organismo incorpora cadmio en todos sus tejidos, con mayor concentración en el tejido branquial.

Tabla 1.- Concentración de cadmio en ppm, en la fracción proteica citoplasmática (µg/g de tejido) de ejemplares de *Ascidia nigra* expuestos a dosis 0,2 mg/L subletal de cadmio.

	Control	Expuestos	Porcentaje de incorporación
Túnica	0,16 ± 0,16 (10)	0,85 ± 0,69 (10)	542%
Tejido blando (Hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo y branquias)	0,32 ± 0,3 (9)	1,32 ± 0,89 (8)	417%

Tejido blando Ts: 19,86; p< 0,05
Túnica Ts: 6,89; p<0,05

La determinación de metales enlazados a la fracción citoplasmática (FC), demostró incorporación del metal en los tejidos analizados (Tabla 2). Los tejidos controles revelaron menores concentraciones con respecto a los organismos expuestos, señalando una mayor incorporación del metal en el tejido blando (1,32 ± 0,89 mg/L) que en el tejido de la túnica (0,85±0,69 mg/L), lo que sugiere que

aproximadamente el 50% del metal se puede encontrar enlazado a proteínas citoplasmáticas y el resto a membranas u orgánulos. Sin embargo, en la túnica la incorporación logró alcanzar 5,42 veces más que la concentración de cadmio encontrada en los tejidos blandos, la cual fue de 4,17 veces, esto puede ser explicado debido a que pueden existir mecanismos diferentes en cuanto a la incorporación de los órganos internos y la túnica. Particularmente cuando los metales son incorporados en cualquier organismo marino, este pone en funcionamiento mecanismos fisiológicos y bioquímicos que le permiten expulsar parte del metal incorporado llamados mecanismos de homeostasis (Viarengo y Nott , 1992)

En 1982 Bialko y col. estudiaron las características histológicas e histoquímicas de la túnica de *A. nigra* y encontraron que la misma está formada por células parecidas a fibroblastos y células pigmentarias, las cuales están formadas a su vez posiblemente por unas proteínas que contienen grupos sulfhidrilos (en membranas u otros organelos) que pueden estar implicadas en la unión de metales. La incorporación de metales en este tejido se demuestra en trabajos como el de Rodríguez (2007) en el cual, después de haber expuesto a dosis subletales de zinc a ejemplares de *Pyura vittata* encontró que la túnica fue el tejido que más acumuló el metal y le atribuyó este alto valor a que dicho tejido tiene función protectora y de recubrimiento del individuo, por ende es la parte que tiene el primer contacto con cualquier xenobiótico.

Por otro lado, los mecanismos de homeostasis en organismos marinos están respaldados por trabajos como los reportados por Viarengo y Nott (1992), en el que describen un grupo particular de células como lisosomas, las cuales actúan como vesículas que acumulan altas concentraciones de metales en forma no tóxicas, por lo que representa un mecanismo de detoxificación que opera en las células de los invertebrados marinos, además de los gránulos a los que también se les atribuye la función de secuestro de los metales para limitar su daño dentro de las células y por último se habla de las proteínas de bajo peso molecular metalotioninas, las cuales son

sintetizadas en la células por exposición de metales para ayudar en el proceso de detoxificación.

Las respuestas celulares que presentan la mayoría de las ascidias, por efecto de exposición a metales, está bien documentada como es el caso del trabajo realizado por Arredondo (2002), en el cual señaló la presencia de varios tipos de células en los ejemplares de *Pyura vittata* después de haber sido expuestos a una dosis subletal de cobre, tales como células en anillos, células mórulas, células amebocíticas hialinas y granulares, siendo estas últimas las que se encontraron en mayor cantidad, sugiriendo que presentan mayor afinidad en cuanto a la defensa del organismo ante este tipo de metal.

En relación a esto, Rodríguez (2007) también reportó este tipo de células para los ejemplares de *P. vittata* expuestos a una dosis subletal de zinc, sin embargo, Benítez (2007) después de haber expuesto organismos de *P. vittata* a dosis de cadmio reportó que el grupo de células que demostraron tener más afinidad por el metal fueron las células en anillo. Por otro lado, Fernández (2007) en su estudio de los sistemas corporales de ascidias señaló que las células mórulas están encargadas de almacenar metales como tantalio, niobio y vanadio. Respaldando así la importancia de estas células en la homeostasis de metales en este tipo de individuos.

Simmkiss y col. (1982) estudiaron la detoxificación y la bioacumulación de metales en moluscos como *Helix aspersa* donde resultó que el cadmio es selectivamente removido de la membrana basal de las células basófilas del hepatopáncreas del individuo y es incorporado dentro de gránulos de pirofosfato que pueden ser excretados subsecuentemente.

Otras respuestas humorales son las que se han estudiados en anélidos y poliquetos, como lo es la participación de células llamadas celomocitos, las cuales realizan procesos como la fagocitosis para ayudar a la homeostasis de metales pesados en *Lumbriscus terrestres*, *Eisenia fetida*, *Eurythoe complanata* (Dhainaut y Scaps, 2001).

Presencia de proteínas enlazadoras de cadmio (Cd) en la túnica y en el tejido blando de *Ascidia nigra*

El cromatograma de la columna de exclusión molecular G- 75, muestra las lecturas de las absorbancias de la FC de la túnica en organismos controles y expuestos a la concentración subletal de Cd, observándose que en los ejemplares controles las absorbancias de las proteínas (280 nm), arrojaron valores superiores con respecto a las encontradas en los organismos expuestos. En relación a las lecturas de grupos sulfhidrilos (412 nm), se puede notar que a partir de la fracción 10 hasta la 12 los eluatos mostraron valores de SH (grupos sulfhidrilos) mayores que los no expuestos (Fig. 3).

La determinación de Cd enlazado a los eluatos, demostró que los controles presentaron pequeños enlazamientos de metales posiblemente a proteínas, con un mayor pico en la fracción 5, sin embargo también se notó en el cromatograma la presencia de un pico en la fracción 14 (Fig. 4). Por otro lado, en los eluatos de la túnica de los organismos expuestos (Fig. 5), en cuanto a los eluatos de cadmio, se pueden observar dos valores de absorbancias importantes, el primer valor (fracción 5) que representa a proteínas que superan el peso molecular de la proteína BSA (67000 kDa), de aproximadamente 74 kDa y el segundo (fracción 9) por debajo del peso molecular del Citocromo C (12500 kDa), aproximadamente 14 kDa, este último coincidió con los mayores valores tomados del cromatograma de los grupos sulfhidrilos, lo que permite inferir la presencia de proteínas parecidas a metalotioninas. En cuanto al cobre se observó un comportamiento parecido entre los organismos controles como en expuestos y para el zinc los valores en los organismos expuestos fueron casi nulos con respecto a los controles.

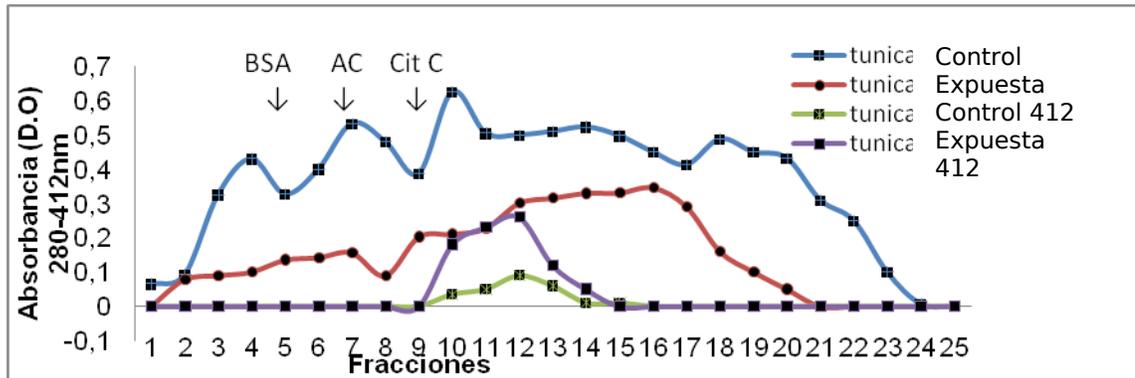


Figura 3.- Perfil cromatográfico de las proteínas y presencia de grupos sulfhidrilos presentes en la FC de la túnica de *Ascidia nigra* (280-412 nm).

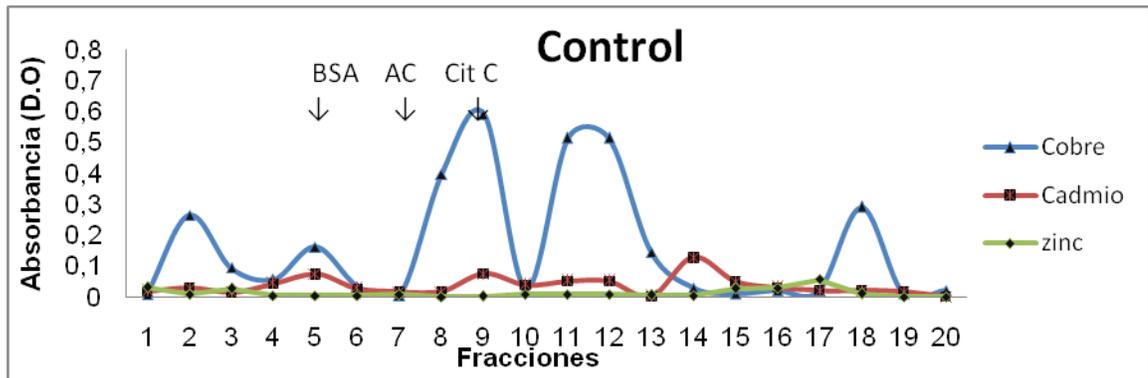


Figura. 4.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC de la túnica de organismos controles de *Ascidia nigra*. (361 nm)

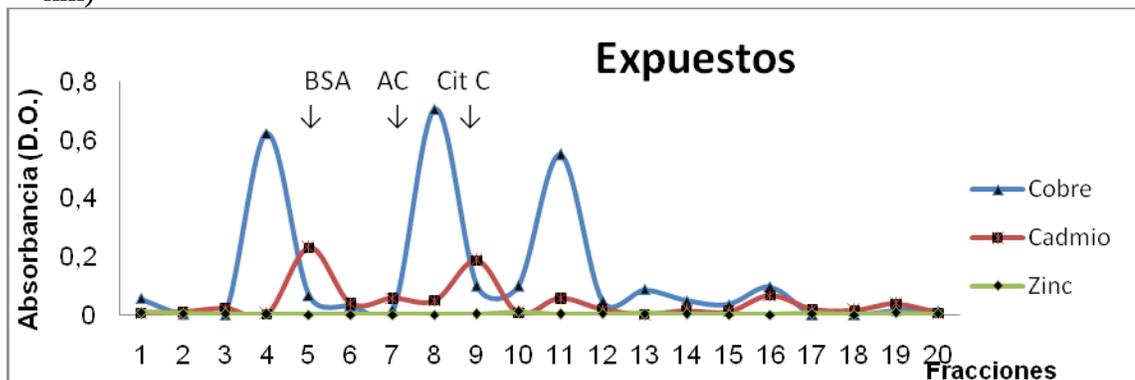


Figura. 5.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC de la túnica de organismos de *Ascidia nigra*, expuestos a 0,2 mg/l de cadmio. (361 nm)

La figura 6 muestra las lecturas de las absorbancias a 280 nm de la FC del tejido blando en organismos controles y expuestos a concentraciones subletales de Cd, observándose un comportamiento de elución similar, sin embargo, las absorbancias de las proteínas de los tejidos expuestos, en algunos casos mostraron valores superiores que los tejidos controles. En relación a las lecturas de grupos sulfhidrilos (412 nm) se puede notar que a partir de la fracción 10 hasta la 16 los eluatos mostraron valores de SH mayores que los no expuestos.

Para el caso de la FC del tejido blando en organismos expuestos y controles (Fig. 7 y 8), con respecto a los eluatos de los organismo expuestos al cadmio, eluyó una proteína por debajo del peso molecular del Citocromo c en las fracciones del 11 al 13, con un peso molecular aproximado de 6 a 2 kDa, dichas fracciones coincidieron con los mayores valores de grupos sulfhidrilos, lo cual podría sugerir la presencia de un grupo de metalotionina o proteínas similares rica en grupos SH.

Por otro lado, en cuanto al cobre, se pudo observar que en los organismos expuestos a Cd las mayores absorbancias fueron en las fracciones 9, 13 y 16, lo que indica la presencia de proteínas ligadas a este metal. Mas y Azcue (1993) indicaron que el cadmio y el zinc podrían sustituir al cobre en su unión con la proteína respiratoria hemocianina en crustáceos decápodos y en poliquetos con la proteína respiratoria hemeritrina, por lo que se infiere en cuanto al metal estudiado (Cd), que este tipo de proteínas podría estar asociado al enlazamiento del metal, y que este a su vez se puede estar ligando tanto a péptidos de bajo y de alto peso molecular como se observó para el caso de la túnica.

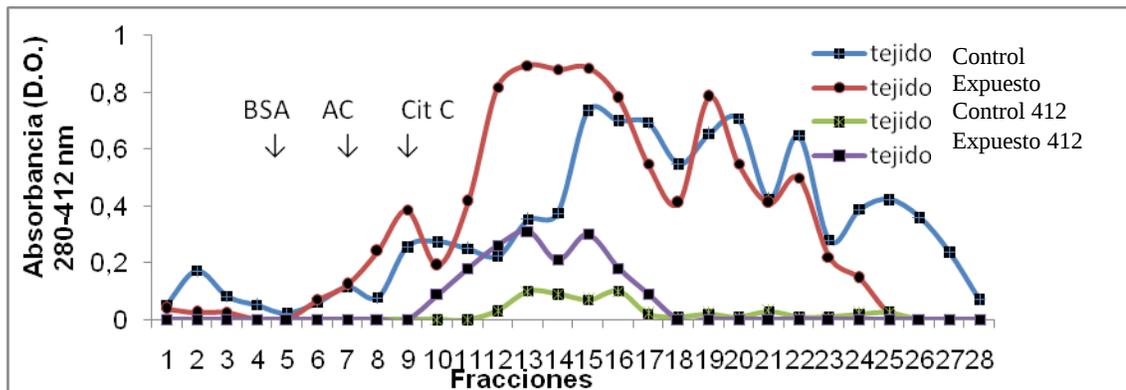


Figura. 6.- Perfil cromatográfico de las proteínas y presencia de grupos sulfhidrilos del FC del tejido blando de *Ascidia nigra* (280-412 nm).

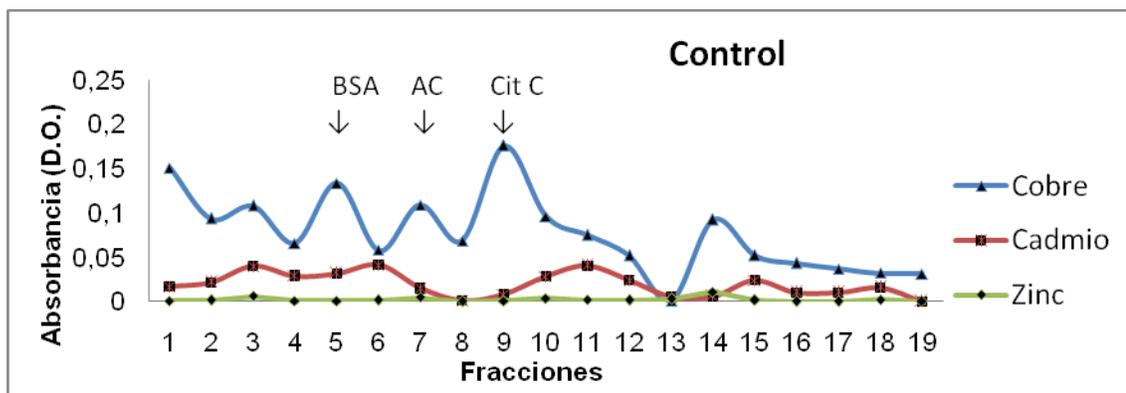


Figura 7.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC del tejido blando de organismos controles de *Ascidia nigra*. (361 nm)

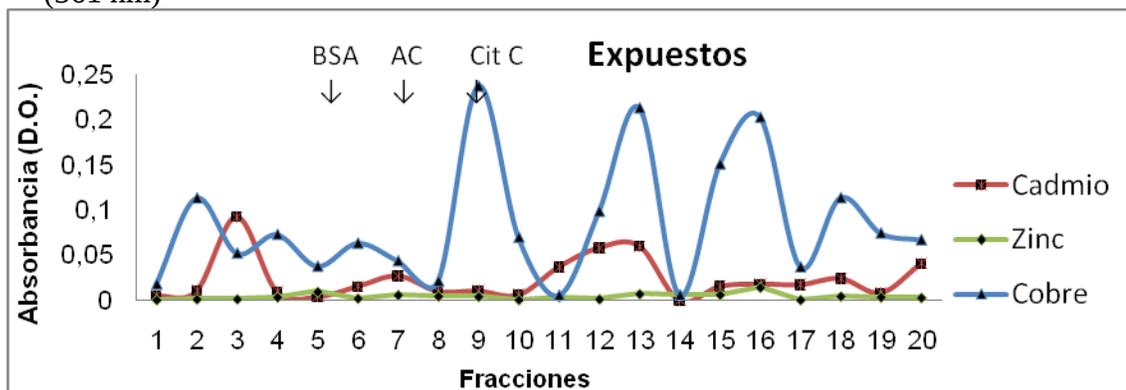


Figura. 8.- Perfil cromatográfico de los metales enlazados posiblemente a proteínas provenientes de la FC del tejido blando de organismos de *Ascidia nigra*, expuestos a 0,2 mg/l de cadmio. (361 nm)

Un caso parecido encontró Frazier (1985), el cual, estimuló un tipo de proteínas (BP-Cd) en el mejillón *Mytillus edulis* y se dió cuenta que las proteínas más grandes Cd-BP20 enlazaron 60% del cadmio citosólico, y sólo un 25% se asoció a Cd-BP10, las cuales eran las más pequeñas, sin embargo el cadmio citosólico restante fue enlazado a proteínas de alto peso molecular (PM>50000). Por otro lado, Marcano y col. (1996), encontraron en el poliqueto *Eurythoe complanata* que además de proteínas de bajo peso molecular asociadas a la toma y depuración de cobre y zinc, también están asociadas proteínas de alto peso molecular (>60kDa), las cuales presentaron mayor afinidad por el cobre, sugiriendo diferentes mecanismos bioquímicos que emplea el organismo para el control de zinc y el metabolismo del cobre a través de la actividad de bajo y alto peso molecular de unión a metal-proteínas.

Otro caso parecido fue reportado por Martins (2004), el cual indicó después de haber expuesto a organismos de *Lima scabra* a altas concentraciones de cadmio que este metal se enlaza en mayor proporción a proteínas muy parecidas a metalotioninas por su bajo peso molecular y presencia de grupos sulfhidrilos.

Por otro lado, en *Emerita portoricensis* se encontraron diferentes tipos de proteínas enlazadoras de mercurio en las fracciones citoplasmáticas de banquias y hepatopáncreas, mientras que en el tejido gonadal no hubo un enlazamiento significativo, representando esto un proceso dinámico donde participan más de una proteína (Lemus, 2004)

Roesjadi (2003) demostró que existen proteínas parecidas estructuralmente a la metalotioninas que aparecen en varios invertebrados marinos unidos a metales trazas de cadmio, zinc, cobre y mercurio, y que tiene una gran influencia en el proceso de detoxificación y acumulación de dichos metales.

Franchi en el 2008, estudió las metalotioninas en el urocordado *Ciona intestinalis*, afirmando que no hay referencias de estas proteínas en estas especies y que para la conclusión de su trabajo se basó en la similaridad de la secuencia de la proteína encontrada con las reportadas en trabajos de moluscos.

La literatura señala la importancia que tiene el cobre en la función de procesos metabólicos, tales como formar parte de numerosos complejos enzimáticos, está involucrado en el metabolismo del hierro, en invertebrados marinos se le asocia a proteínas respiratorias, entre otras. (www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S04.htm).

En investigaciones anteriores se demostró que en altas concentraciones el cobre puede ser mucho más tóxico que el cadmio e incluso pueden llegar a tener una especie de competencia por posiciones de ingreso en los organismos (Baqueiro-Cardenas y col., 2007) e induce a una especie de sustitución de los metales esenciales como cobre y zinc por el cadmio, debido a su valencia y su radio iónico los cuales son muy parecidos (Raimundo y col., 2005), posiblemente en este trabajo también pudo ocurrir esta competencia, entre el cadmio al que el organismo fue expuesto y el cobre que posiblemente ya tenía acumulado el individuo, lo que podría explicar los valores tan altos encontrados para posibles proteínas ligadas a este metal.

Finalmente, los resultados encontrados muestran la capacidad que tienen metales como el cadmio de inducir proteínas parecidas a metalotioninas o de alto peso molecular en organismos de la especie *A. nigra* expuestos para contrarrestar los efectos tóxicos de dicho metal.

Perfiles de elución de las proteínas presentes en los tejidos de *Ascidia nigra*

En el mismo orden de ideas, los perfiles de elución cromatográficos de las proteínas marcadoras y las proteínas eluidas de los organismos controles y de los organismos expuestos a cadmio de túnica y tejido blando de *A. nigra*, reflejaron una caracterización parcial de los pesos moleculares de las fracciones proteicas de la siguiente manera, Para las fracciones eluidas de los controles de la túnica se registraron picos grandes, en la fracción 5 (10 ml), la cual equivale a 74 kDa, proteína de alto peso molecular que puede intervenir en el enlazamiento de cadmio, como lo describió Frazier (1985), el cual estimuló la presencia de una proteína de alto peso molecular que resultó ser la que mayor acumuló cadmio en el citosol, un segundo

pico en la fracción 14 (28 ml) de aproximadamente 1 kDa de peso molecular, en los eluatos de los organismos expuestos se reportaron picos tales como, en la fracción 9 (18 ml) de 14 kDa, en la fracción 16 (32 ml) de 794 Da, sugiriendo la presencia de proteínas de bajo peso molecular, característica importante del grupo de metalotioninas, como lo señala Reyes (1999) en su publicación sobre las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos, en la cual describe las características y la relación de las metalotioninas con los metales pesados (Fig. 4; Fig. 5).

En las fracciones eluídas de los controles del tejido blando se presentaron 2 picos importantes, el primero, en la fracción 3 (6 ml) correspondiente a un peso molecular de 169 kDa, lo cual sugiere la presencia de una proteína de alto peso molecular que enlaza metal, tal como lo describe Marcano (1993) en su trabajo de acumulación y depuración de cobre y zinc en relación con el perfil de metaloproteínas en el poliqueto *Eurythoe complanata* y el segundo en las fracciones de 10 a la 12 (20-24 ml), las cuales corresponden a pesos moleculares que van desde 8 a 4 kDa respectivamente (Fig. 7).

De la misma forma para las fracciones eluídas de los expuestos se encontraron picos similares a los controles, tales como en la fracción 3 y en las fracciones 11 a la 13 (22-26 ml) que equivale de 6 a 2 kDa respectivamente, indicando que en esta especie también se presentan proteínas de bajo peso molecular en presencia de cadmio las cuales pueden estar vinculadas al grupo de las metalotioninas, como lo refiere Martins (2004) para *Lima scabra* exponiendo los organismos a concentraciones altas de cadmio encontró proteínas parecidas, de bajo peso molecular agrupándolas en las proteínas llamadas metalotioninas. (Fig. 8).

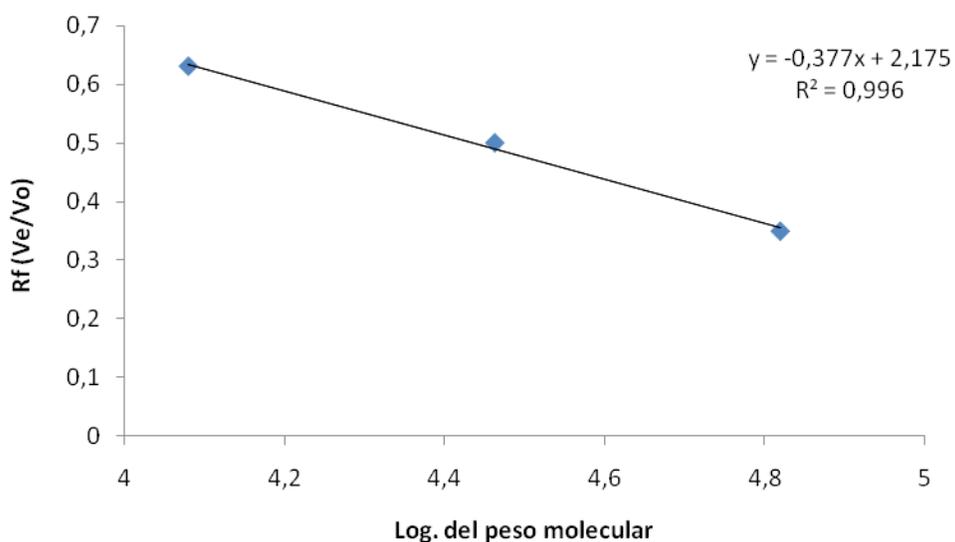


Figura 9.- Curva de calibración de la columna de exclusión molecular de Sephadex G-75, para las proteínas marcadoras BSA, Anhidrasa C. y Citocromo C.

**Porcentajes de enlazamiento de cadmio por parte de posibles proteínas
provenientes de la FC de túnica y tejido blando de la especie *Ascidia nigra***

Tabla 2. – Porcentaje de enlazamiento de cadmio de posibles proteínas provenientes de la FC del tejido blando de *Ascidia nigra*

	Total	Eluatos	Abs.	% de enlazamiento
Tejido Control	0,368	Eluato 3	0,039	10
		Eluatos del 10 al 12	0,091	24
Tejido Expuesto	0,471	Eluato 3	0,0292	6
		Eluatos del 11 al 13	0,155	33

En relación al enlazamiento de cadmio a posibles proteínas de la fracción citoplasmática del tejido blando se puede observar que el grupo expuesto mostró un incremento de los niveles de cadmio en relación a los valores presentados en el grupo

control. El metal estuvo enlazado a las fracciones que eluyen entre la 10 y la 12 para los organismos, donde el 24% del metal estuvo enlazado a esta fracción para el control y 33% para el expuesto. También es importante señalar la presencia de un pequeño pico que eluye en la fracción 3 que presenta el 6% de cadmio. Los enlazamientos que se presentaron en las fracciones 10 y 12 y del 11 al 13, coincidieron con un incremento de grupos sulfhidrilos, mientras que en la fracción 3 no coincidió con los grupos sulfhidrilos, lo que podría indicar que en la fracción de mayor enlazamiento puede deberse a la presencia de proteínas de tipo metalotioneinas por la presencia de los grupos sulfhidrilos.

Este resultado es comparable con los obtenidos por Podgurskaya (2006), el cual estudiando la concentración y la distribución subcelular de cadmio en el mejillón *Crenomytilus grayanus* en regiones de Japón encontró que la mayor concentración estaba asociada a la fracción proteica correspondiente a metalotioninas.

Por otro lado Dohi y col. (1986) determinaron altas concentraciones de cadmio en el hepatopáncreas de 3 moluscos *Buccinum tenuissimum*, *Batillus cornutus* y *Todarodes pacificus*, y luego demostraron que este cadmio estaban unido a proteínas con alto contenido de cisteína y bajo peso molecular, características muy parecidas a metalotioneinas.

De igual forma Berthet y col. (2005) estudiaron las concentraciones de metalotioninas en especies de esponjas *Spongia officinalis* encontrándose con proteínas con características como: citosólica, estable al calor, con una masa molecular aparente de 4 a 15 kDa y de unión de Ag, Cu y Zn. Así mismo, Bustamante y col. (2006) reportaron que el cadmio se une a proteínas de alto y bajo peso molecular después de haber estudiado la distribución subcelular de varios metales (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, AND Zn) en el cefalópodo *Sepia officinalis*

Tabla 3.- Porcentaje de enlazamiento de cadmio de proteínas provenientes de la FC de la túnica de *Ascidia nigra*

	Total	Eluatos	Abs.	% de Enlazamiento
Túnica Control	0,368	Eluato 5	0,073	20
		Eluatos 14	0,027	7
Túnica Expuesto	0,471	Eluato 5	0,231	49
		Eluatos 16	0,067	14
		Eluato 9	0,187	40

Con respecto al cadmio en la túnica se pudo observar el enlazamiento del metal en las fracciones 5 y 14 de los ejemplares controles, en los cuales 20% y 7% estuvieron enlazados al metal, mientras que para los expuestos se obtuvo un 49 % y 14% respectivamente para las mismas fracciones, es preciso indicar que el pico 14 en los controles es representado por el pico 16 en los experimentales. De manera relevante es necesario señalar la presencia de un pico que eluye en la fracción 9 de los ejemplares expuestos el cual representa un 40 % de enlazamiento del metal. El enlazamiento de las fracciones en los ejemplares de la túnica no coincide con los altos valores de grupos sulfhidrilos, lo que indica que las proteínas que enlazan el metal son un tipo que difieren de las metalotioninas o que estas proteínas pueden estar cediendo el metal a otro tipo de ligandos (lisosomas, gránulos entre otros) actuando como un método de detoxificación.

Como lo describe Ahearn y col (2010) uno de los métodos de detoxificación son los lisosomas, los cuales son orgánulos de múltiples funciones que ayudan en el desmontaje de las grandes moléculas orgánicas y almacenan una variedad de xenobióticos. También existe evidencia de que contienen compuestos tioles tales como glutatión y metalotioneína, que se unen a los metales en el citoplasma con alta afinidad, para ser trasladadas a través de membranas lisosómicas para el almacenamiento del metal.

Al igual que Heeseon y col. (2006) quienes describen el papel regulador de las metalotioninas en especies del bivalvo *Laternula elliptica* expuestas a cadmio, atribuyéndole el principal papel desintoxicante en la fracción soluble de células de las glándulas digestivas y branquias.

De esta misma forma Viarengo y Nott (1993) realizaron estudios de mecanismos de homeostasis de cationes de metales pesados en diferentes invertebrados marinos señalando que los principales mecanismos de regulación son: la unión a ligandos solubles como las metalotioninas, la compartimentalización dentro de vesículas membranosas más reconocidas como lisosomas y por último la formación de precipitados insolubles tales como gránulos de concentración de Ca/Mg o Ca/S.

Durante el estudio se pudo notar uniones inespecíficas que se dieron en los tejidos de la túnica y tejido blando, sugiriendo que la especie *Ascidia nigra* incorporó muy poco metal, por lo que dicha especie no resulta buena para estos estudios de laboratorio.

Al principio de la investigación se tenía planteado realizar un proceso de depuración, pero en el transcurso del desarrollo de dicho proyecto se pudo notar que la ascidia *Ascidia nigra* incorpora muy poca cantidad de este metal, por lo que no se consideró necesario llevarlo a cabo.

CONCLUSIONES

Los ejemplares de *Ascidia nigra* obtenidas del ambiente natural mostraron presencia de cadmio en los tejidos en el siguiente orden de incorporación branquias > músculo> sistema digestivo>hepatopáncreas>túnica.

Los ejemplares de *A. nigra* expuestos a cadmio mostraron incorporación del metal en la fracción proteica citoplasmática de la túnica y el tejido blando. La túnica incorporó 5,4 veces más que la concentración del control, mientras que el tejido blando lo hizo en una proporción de 4,17 veces.

Los cromatogramas de la FC del tejido blando y de la túnica de *A. nigra*, indican la presencia de una proteína con presencia de grupos sulfhidrilos que enlaza cadmio y de acuerdo al Rf su peso molecular es menor de 12 kDa. También en la túnica se evidenció una proteína de masa molecular superior a 66 kDa que enlaza el metal.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la especie *Ascidia nigra* no es un buen organismo modelo para llevar a cabo estudios de toxicidad bajo condiciones de laboratorio, debido a que la mortalidad es muy elevada durante el periodo de aclimatación, por otro lado no toleran concentraciones significativas de cadmio y finalmente la dosis utilizada no permitió determinar una concentración de Cd significativa en la fracción proteica,

El metal enlazado a proteínas de la FC demuestra ligeros incrementos del metal en proteínas de baja masa molecular, particularmente las que eluyen entre la fracción 10 al 13 para el tejido y 14 y 16 para la túnica, las cuales pudieran ser la misma proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- [Ahearn](#), G.; [Sterling](#), K.; [Mandal](#), K. y [Roggenbeck](#), B. 2010. Heavy Metal Transport and Detoxification by Crustacean Epithelial Lysosomes. *Epit. Trans. Physiol.* 2 : 49-70.
- American Public Health Association. 1985. Standard methods for examination of water and wastewater, 15th. Ed. APHA, AWWA, WPCF. Washington D.C., USA.
- Amiard, J.; Amiard, C.; Barka, S.; Pellerin, J. y Rainbow, P. 2005. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aqua. Toxicol.* 76 (2): 160-202.
- Antón, Y. 2002. Metabolismo de metales bioesenciales y metalotioninas durante el ciclo de muda de *Emerita portoricensis* (Crustácea: Decapada). Trabajo de grado. Magíster Scientarum. Biología Aplicada mención Ecotoxicología Ambiental. 80 pp. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumana – Venezuela.
- Arredondo, L. 2002. Efectos del cobre sobre la población celular celómica y su bioacumulación en la especie *P. vittata*. Trabajo de Ascenso. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Baqueiro–Cárdenas, E.; Borabe, L.; Goldaracena–Islas, C. y Rodríguez–Navarro, J. 2007. Los moluscos y la contaminación. Una revisión. *Rev. Mex. Biodiv.* 78: 135-138.
- Beaty, R. 1978. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometric. The Perkin Elmer Corporation, USA. 49 pp.
- Bellas, J.; Vázquez, E. y Beiras, R. 2001. Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. *Water Res.* 35(12): 2905-2912.
- Bellas, J.; Beiras, R. y Vázquez, E. 2004. Sublethal effects of trace metals (Cd, Cr, Cu, Hg) on embryogenesis and larval settlement of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 46(1): 61-66.

- Benedicto, J.; Martínez, C. y Campillo, J. 2005. Inducción de metalotioneinas en *Mullus barbatus* como biomarcador específico de contaminación metálica: estudio de campo en el mediterráneo occidental. *Cienc. Mar.* 31 (1B): 265-274
- Benítez, R. 2007. Efecto del cadmio sobre la población celular celómica y su acumulación en los tejidos del tunicado *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). Trabajo de pregrado. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Bermúdez, I. y Grimaldi, J. 1975. Estudio comparativo de cuatro especies de ascidias de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre, Venezuela. *Lagena*, 35-36: 31-49.
- Berthet, B.; Mouneyrac, C.; Pérez, T. y Amiard-Triquet, C. 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp. Biochem. and Physiol. Part C: Toxicology and Pharmacology.* 141 (3): 306-313.
- Bialko, E.; Grimaldi, J. y Montes, A. 1982. Algunos aspectos histológicos e histoquímicos de la túnica de *Ascidia nigra* (Savigny, 1816). *Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente* 21 (2): 157-166.
- Bradford, M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248.
- Brambila, E. y Gonzalez, E. 1993. Las metalotioneinas: ¿centros de basura o proteínas claves en el metabolismo celular?. *Elementos.* 19(3): 3-9.
- Brambila, E. y Lozano, P. 2000. Metalotioneinas, bioquímica y funciones propuestas. *BEB*, 18 (1): 21-27.
- Bustamante, P.; Cosson, R.; Gallien, I.; Caurant, F. y Miramand, P. 2006. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar. Environ. Res.*, 53: 227-241
- Cajaraville, M. 2003. Concepto de Biomarcador. Utilidad de los biomarcadores celulares en programas de seguimiento ambiental. Pollution in the environment: detection, evaluation and restoration. En: *Environmental quality assessment*. País vasco. Pags. 1-2.
- Cullaj, A.; Lazo, P. y Duka S. 2007. "Heavy metals and metallothionein levels in mussel samples of albanian seacoast". <<http://www.cismalbania.it/download/46>> (18/12/2010).

- Da Rocha, R.; Da Cruz, T. y Almeida, S. 1999. The biology of *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in southern Brazil: Spatial distribution and reproductive cycle. *Bull. Mar. Sci.* 64: 77-87.
- Dhainaut, A. y Scaps P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.* 79: 233-253.
- [Dohi, Y.](#); [Kosaka, K.](#); [Ohba, K.](#) y [Yoneyama Y.](#) 1986. Cadmium-binding proteins of three marine molluscs and characterization of two cadmium-binding glycoproteins from the hepatopancreas of a whelk, *Buccinum tenuissimum*. *Environ. Health. Perspect.* 65:49-55.
- Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Erk, M.; Ruus, A.; Ingebrigtsen, K. y Hylland, K. 2005. Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in marine invertebrates--a radiotracer study. *Chemosphere*, 61(11):1651-64.
- FAO. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados manual de capacitación <www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S04.htm>. (15/11/2011).
- Fernández, R. 2007. "Ascidias sistemas corporales". "Asturnatura". <<http://www.asturnatura.com>>. (24/04/2007).
- Franchi, N. 2008. Xth scientific meeting of the Italian Association of Developmental and Comparative Immunobiology (IADCI), 18 - 20 February 2009, Department of Human, Environmental and Natural Sciences, University of Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy. Individuation of a new metallothionein from the urochordate *Ciona intestinalis*. *ISJ* 6: 22-31.
- Frazier, J. 1985. Cadmium-binding proteins in the mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Health. Perspect.* 65: 39-43.
- Goodbody, I., 1962. The biology of *Ascidia nigra* (Savigny) I. Survival and mortality in an adult population. *Biol. Bull.*, 122 : 40-51.
- Hardiviller, y.; Denis, F.; Demattei, M.; Bustamante, P.; Laulier, M. y Cosson R. 2006. Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 143 : 321-342.

- Heeseon, J.; Jungyoun, J.; Kyung-Ho, C. y In-Young, A. 2006. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comp. Biochem. and Physio. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 145 (2): 227-235.
- Hickman, C., Roberts, L. y Larson, A. 1995. Principios integrales de Zoología. 8va edición. Wm. C. Brown Publishers, Inglaterra.
- Kang, Y. 2006. Methallotionein redox cycle and fuction. *Exp.Biol. Med.*231 (9): 1459-1467.
- Kaplan, E. 1988. A field guide to southeastern and Caribbean seashores: Cape Hatteras to the Gulf coast, Florida, and the Caribbean. Boston, USA. 425 pp.
- Lemus, M. 2004. Determinación subcelular de mercurio y su relación con proteínas enlazadoras de mercurio en tejidos de *Emerita portoricensis*. Trabajo de ascenso. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Liebrich, W.; Brown, A. y Botes, D. 1995. Cadmium-binding proteins from a tunicate, *Pyura vittata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112 (1): 35-42.
- López, F. 1994. El cadmio en moluscos y sus conservas. *Rev. Aliment., Equipos y Tecnol.*, 3: 35-37.
- López, E. 2007. Las metalotioneinas y el estrés quirúrgico. *REB*. 26(2): 67-72.
- Lu, F. 2000. *Environmental Toxicology*. The University of Arizona. Tucson.
- Manahan, E. 2002. Toxic elements. En: *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. Lewis Publisher. London. Págs. 211-231.
- Marcano, L.; Boscan, M. y Bravo, A. 2005. Niveles de cadmio y proteínas séricas en madres y sus recién nacidos. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. 39 (2): 159-167.
- Marcano, L.; Nusetti, O. Rodríguez-Grau, J. y Vilas, J. 1996. Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*. *Comp. Biochem. and Physio. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology l.* 114(3): 179-184.
- Margoshes, M. y Valle, B. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *The Journal of the American Chemical Society*. 79: 48-13.

- Martins, C. 2004. Acumulación y depuración de cadmio en relación con el perfil de enlazamiento a metaloproteínas en el hepatopáncrea del bivalvo *Lima scabra*. Trabajo de Maestría en Biología Aplicada mención Ecotoxicología ambiental. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Mas, A. y Azcue, J.1993. Metales en sistemas biológicos. Promociones y publicaciones universitarias, S.A. Barcelona, España.
- Noriega, G. 1982. Madurez sexual y desove del tunicado *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). Trabajo de Pregrado. Licenciatura en Biología. Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente. Cumaná.
- [Podgurskaya, O.](#) 2006. Cadmium concentration and subcellular distribution in organs of the mussel *Crenomytilus grayanus* from upwelling regions of Okhotsk Sea and Sea of Japan. [Arch. Environ. Contam. Toxicol.](#) 51(4):567-72.
- Raimundo, J. Pereira, P.; Vale, C. y Caetano, M. 2005. Concentraciones de Fe, Zn, Cu y Cd en la glándula digestiva y los tejidos musculares de *Octopus vulgaris* y *Sepia officinalis* de dos zonas costera de Portugal. *Cien. Mar.* 31 (1B): 243-251.
- Rainbow P y A Scott. 1979. Two heavy metal binding proteins in the midgut gland of the crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 55: 143-150.
- Ramírez, A. 2002. Toxicología del cadmio conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 63 (1): 1202-10.
- Rand, G.; Wells, P. y McCarty, L. 1995. Introduction to aquatic toxicology. En: *Fundamentals of aquatic toxicology*. Rand, G. (ed). Taylor y Francis, Florida. Págs. 3-67.
- Ray, S.; McLeese, D. y Burrige, L. 1981. Cadmium in tissues of lobster captured near a lead smelter. *Mar. Poll. Bull.*, 12: 383-386.
- Reish, D. 1980. Use of polychaetous annelids as test organisms for marine bioassay experiments. *Mar. Environ. Res.*, 4: 140-154.
- Reish, D. 1984. *Marine Ecotoxicological Tests with polychaetous Annelids. Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, (Eds) State Univ. Ghent. And Inst. Mar. Scient. Res., Bredine, Belgium.

- Reyes, R. 1999. Las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia*. 24(6): 366-371.
- Rodríguez, C. 2007. Efecto del zinc sobre la población celular celómica y su bioacumulación en tejidos del tunicado *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). Trabajo de pregrado. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Roesjadi, G. 1986. Mercury-binding proteins from the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Health. Perspect.* 65:45-8.
- Roesjadi, G. 2003. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. and Physio. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology l.* 113(12): 117-123.
- Roméo, M.; Frasila, C.; Gnassia-Barelli, M.; Damiens, G.; Micu, D. y Mustata, G., 2005. Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Water Res.* 39: 596–604.
- Salazar-Lugo, R. 2009. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *REDVET.* 10(11): 1-16.
- Siewicki, T.; Sydlowski, J. y Webb, E. 1983. The nature of cadmium binding in comercial eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Arch. Env. Cont. Toxicol.* 12: 299-304.
- Simkiss, K.; Taylor, M. y Mason, A. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 187-201.
- Stephan, C. 1971. Methods for calauting LC₅₀ .En: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. Mayer, F y Hamelink, J. (eds). American Society for Testing Materials, Philadephia. Págs. 65-48.
- Van Name, A. 1945. The ascidians of south Australian I. Spences Gulf . St. Vicent Gulf and Encounter Bay. *Trans. R. Soc. Aust.*, 96 (1): 37-38.
- Voss, G. 1980. *Seashore life of Florida and the Caribbean*. Mineola, NY. USA. 199 pp.
- Viarengo, A. y Nott, J. 1992. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Com. Biochem. Physiol.*, 1046 (3): 355-372.

Walkers, C.; Hopkin, S.; Sibly, P. y Peakall, D. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Editorial Francis Taylor. 1996.

Web, J.; Macey, D. y Talbot, V. 1985. [Identification of ferritin as a major high molecular weight zinc-binding protein in the tropical rock oyster, *Saccostrea cucullata*](#). *Arch. Env. Cont. Toxicol.* 14: 403-407.

White, S. y Rainbow, P. 1986. A preliminary study of Cu-, Cd-, and Zn-binding components in the hepatopáncreas of *Palaemon elegans* (Crustácea: Decápoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 83 (1): 111-116.

Hoja de Metadatos

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

Título	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS ENLAZADORAS DE CADMIO EN <i>Ascidia nigra</i> (Savigny, 1816)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Benitez F., Roseulys del V.	CVLAC	13773908
	e-mail	roseulysdelvallebenitezf@gmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Cadmio, Ascidia, <i>Pyura vittata</i>, metalotioninas

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Biología Aplicada	Ecotoxicología

Resumen (abstract):

Se evaluó la presencia de proteínas enlazadoras de cadmio en tejidos del tunicado *Ascidia nigra*. Los organismos fueron colectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre y llevados al Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán (CIEG) para su aclimatación, posteriormente se determinó la presencia de cadmio en 5 ejemplares de *A. nigra* para tener una línea basal del metal, para ello se les disectó hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo túnica y branquias, para luego ser tratados con HNO₃ y ser leídos en absorción atómica, de igual manera después del periodo de aclimatación se determinó el LC₅₀, utilizando el método Probit, del cadmio para esta especie resultando ser de 0,2 mg/L. Se realizó un bioensayo agudo de 7 días para inducir la presencia de proteínas enlazadoras de metal, exponiendo los animales al LC₅₀ encontrado. Los ejemplares (4 org) a exponer, fueron colocados en acuarios de 5 l de capacidad, utilizando el mismo patrón para los ejemplares controles. El agua y el metal fueron renovados diariamente, la temperatura promedio fue de 30 ± 2 °C, salinidad 36‰, fotoperiodo 12/12. Después de haber transcurrido los 7 días de exposición fueron congelados, para posteriormente ser trasladados, al laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico de Venezuela, donde se separaron en túnica y tejido blando (constituido por hepatopáncreas, músculo, sistema digestivo y branquias), se homogenizaron para la caracterización parcial de las proteínas enlazadoras del metal siguiendo la metodología propuesta por Wallace y col. (2000). 2 mg de la Fracción citoplasmática (FC) fueron colocadas en una columna G-75 previamente equilibrada y calibrada con masas moleculares conocidas. La columna fue excluida a una velocidad de 2 ml/60 min y las fracciones fueron analizadas a 280 nm y grupos sulfhidrilos a 412 nm. Las fracciones eluidas se les determinó el contenido de cadmio, cobre y zinc por espectrofotometría de absorción atómica a 361 nm y a las que contenían cadmio, se les estimó el peso molecular. Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron que *A. nigra* proveniente del ambiente natural, es capaz de bioacumular Cd en sus tejidos, tal como se observó en el tejido branquial que presentó la mayor concentración con un valor promedio de 20,5± 22,27 mg/L. En cuanto a la incorporación de cadmio a la fracción citoplasmática (FC) en los organismos expuestos se encontró que la túnica arrojó un valor de 0,852 µg/g, mientras que en el tejido blando fue de 1,320 µg/g a diferencia de los controles que presentaron 0,157 µg/g y 0,316 µg/g para túnica y en el tejido blando respectivamente. Se determinó que el cadmio se enlaza a una proteína con una masa molecular menor que la del Citocromo C, aproximadamente de 6 a 2 kDa en FC de tejido blando, por otra parte en la túnica se reportó una proteína similar, aproximadamente 14 kDa y otra de alta masa molecular, aproximadamente 74 kDa, que enlazó metal de igual manera. Los resultados demuestran la presencia de una proteína rica en grupos sulfhidrilos que enlaza metal y se encuentra tanto en tejido blando como en la túnica y la cual se sugiere que pueda ser una metalotionina, mientras que la otra no presenta grupos sulfhidrilos y por su alto peso molecular podría ser otra clase de ligando. Debido al poco porcentaje de incorporación de Cd en la FC durante este estudio y la alta mortalidad que presentan los organismos bajo condiciones controladas, se puede señalar que la especie *Ascidia nigra* no es un organismos ideal para estudios en condiciones de laboratorio.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Lemus, Mairin	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6429405
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	
Nusetti, Sonia	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11380086
	e-mail	snusetti@yahoo.com
	e-mail	
Zapata, Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	12269219
	e-mail	edzapata2002@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	03	30
------	----	----

Lenguaje: spa _____

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6	Word



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

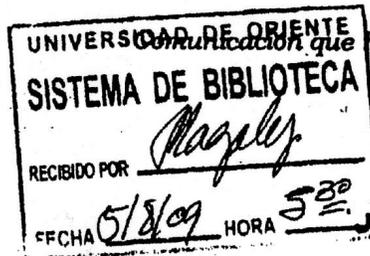
Cumaná, 04 AGO 2009

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.

Cordialmente,

[Signature]
JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario



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

JABC/YGC/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 grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



Lcda. ~~Roseulys Benitez~~
Autora



Dra. Mairin Lemus.
Asesora