



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
POSTGRADO DE BIOLOGÍA APLICADA

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN *Perna viridis* (BIVALVIA: MITILIDAE)
BAJO CONDICIONES DE ANOXIA, ANHIDROBIOSIS Y REOXIGENACIÓN,
PREVIA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS

(Modalidad: Investigación)

Lcda. GABRIELA MARÍA SÁNCHEZ ROJAS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTARUM EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION ECOTOXICOLOGÍA

CUMANÁ, FEBRERO 2013



VICERRECTORADO ACADÉMICO
CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Núcleo de: ...Sucre.....

Postgrado en: ...Biología Aplicada.....

Nº: 001/2013

ACTA DE DEFENSA DE TRABAJO DE GRADO

Nosotros, Dr. Edgar Zapata, Dra. Mairin Lemus Barrios y Dra. Raquel Salazar Lugo, integrantes del Jurado designado por la Comisión Coordinadora del Postgrado en Biología Aplicada. Para examinar el Trabajo de Grado intitulado: "DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN *Perna viridis* (BIVALVIA: MITILIDAE) BAJO CONDICIONES DE ANOXIA, ANHIDROBIOSIS Y REOXIGENACIÓN, PREVIA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS" presentado por la Lda. Gabriela Sánchez Rojas, con cédula de identidad N°16.995.621, a los fines de cumplir con el requisito legal para optar al grado de: Magister Scientiarum en Biología Aplicada, Mención Ecotoxicología, hacemos constar que hemos examinado el mismo e interrogado al postulante en sesión publica celebrada hoy, a las 9:30 A.M., EN LA SEDE DEL POSTGRADO EN BIOLOGIA APLICADA, UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NUCLEO SUCRE, CERRO DEL MEDIO, CASA Nro. 13. Finalizada la defensa del trabajo por parte del postulante, el Jurado decidió..... APROBARLO..... (Aprobarlo o Improbarlo) por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor que él mismo (se/no se) ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Institución.

En fe de lo anterior se levanta la presente Acta, que firmamos conjuntamente con la Coordinadora del Postgrado en: BIOLOGIA APLICADA.

En la ciudad de: CUMANANA, a los cinco (05) días del mes de febrero de 2013.

Jurado Examinador:

Prof. Edgar Zapata (Tutor)

Prof. Mairin Lemus Barrios

Prof. Raquel Salazar

Coordinadora del Programa de Postgrado:

Prof.: Mariolga Berrizbeitia de Morgado
Nombre

Firma y Sello



INDICE

<u>INDICE.....</u>	<u>2</u>
<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>i</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>ii</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>iii</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS.....</u>	<u>iv</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>v</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>6</u>
<u>METODOLOGÍA.....</u>	<u>10</u>
<u>Ejemplares y sitio de colecta.....</u>	<u>10</u>
<u>Bioensayos de exposición.....</u>	<u>10</u>
<u>Condiciones de anoxia y anhidrobiosis.....</u>	<u>10</u>
<u>Metalotioneínas</u>	<u>11</u>
<u>Grupos sulfhidrilos (-SH).....</u>	<u>12</u>
<u>Peroxidación de lípidos.....</u>	<u>12</u>
<u>Cuantificación de proteínas totales.....</u>	<u>13</u>
<u>Preparación de los extractos enzimáticos.....</u>	<u>14</u>
<u>Análisis enzimáticos.....</u>	<u>14</u>
<u>Oxígeno disuelto.....</u>	<u>15</u>
<u>Análisis estadísticos</u>	<u>16</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>17</u>
<u>Metalotioneínas.....</u>	<u>17</u>
<u>Peroxidación de lípidos (MDA).....</u>	<u>20</u>
<u>Glutationa-S-transferasa (GST).....</u>	<u>21</u>
<u>Catalasa (CAT).....</u>	<u>23</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>25</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>36</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>36</u>
<u>APÉNDICES.....</u>	<u>1</u>

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso, a la Virgen del Valle y a todos mis santos en especial (SMA, SMDL, SC, SMD, entre otros), por haberme dado las fuerzas necesarias y la sabiduría para salir adelante en los momentos más duros y difíciles de mi vida en donde creía que todo estaba perdido.

A mi madre Liduvina Rojas por ayudarme durante toda mi vida, por ser mi inspiración y ejemplo a seguir, por sacarme adelante, por ayudarme en mi carrera, y porque a pesar de todo lo que no has pasado seguimos luchando día tras día para salir adelante, GRACIAS por todo te quiero madre querida. Sin ti nada hubiese sido posible.

A mi padre Julio César Sánchez Feo (Q.E.P.D) porque en vida hizo hasta lo imposible para ayudarme a salir adelante, y en donde quiera que estés me sigues ayudando; estas presente todos los días de mí vida y no sabes cuanta falta me has hecho. GRACIAS por todo. Te quiero por siempre y para siempre padre mío.

A mí por la lucha constante durante toda mi vida, porque a pesar de que me han tocado pruebas duras y difíciles sigo luchando cada día que Dios me permite estar viva.

A un ser que sin esperarlo llegó a mi vida para darme fuerzas para seguir adelante, para alegrarnos la vida a pesar de tantas dificultades del día a día, por el vivo, suspiro, respiro y lucho cada día de mi vida, Mí hijo Julio César. TE QUIERO HIJO.

A la familia Ríos por todo el apoyo, el cariño y la ayuda que me han brindado a lo largo de toda de mi vida en especial a Teresa Ríos, Mercedes Ríos, Carlos Ríos, María Gabriela Ríos, Carla Fraile, Camila Ríos y a los que ya no están Carmelo Ríos y Tamara Ríos.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Edgar Zapata porque confió en mí en esta nueva etapa profesional de mi vida por haber aceptado ser mi asesor y haberme apoyado una vez más, por ser un gran ser humano que a pesar de su inteligencia es el ser más sencillo que conozco y un excelente amigo con el cual el podido contar en los peores momentos de mi vida, cuando ya creo que todo está perdido siempre tiene una palabra de aliento para mí. GRACIAS a usted y a Exima por toda la ayuda y el cariño para conmigo y mi familia los quiero.

Al Prof. Osmar Nusetti por haberme permitido realizar mi tesis en el Laboratorio de Ecotoxicología del Dpto. de Biología.

A la Prof. Yusmar Ramos por todo su apoyo a lo largo de toda mi carrera desde que me dio clase en el 2003 ha sido una gran ayuda para mí y ha estado conmigo en los buenos y malos momentos de mi vida. Es un gran ser humano y excelente amiga. GRACIAS por todo y por querer a mi hijo y a mi madre.

A las Profesoras Mairin Lemus y Sonia Nusetti por toda su ayuda y colaboración y sobre todo buena disposición para ayudarme en mi tesis de Postgrado.

A mis amigas Ahieska Liscano, Alba Liscano, Mariana Granadillo, Saraí Acuña y amigo Jesús González, por toda su ayuda, amistad, apoyo incondicional en los buenos y malos momentos de mi vida. GRACIAS A TODOS.

A mi hermano Ernesto González (nené) y a su madre (Suli Roques) y su hermana (Mari González) y a toda su flia por todo el apoyo y la ayuda incondicional en los peores momentos de mi vida. GRACIAS

A Maigualida Bastardo y su flía por todo el apoyo y el cariño hacia mi hijo. Mi agradecimiento eterno.

A mis compañeras Madargelis Barreto y Cecilia Naranjo por su amistad y colaboración en la parte experimental.

A mis amigos Roberts Rondón, Elimar Machado, Rafael y Francisco L. por ayudarme en los peores momentos de mi vida.

A mis amigas de siempre, de toda la vida por ayudarme cada vez que pueden y las necesito, en los buenos y malos momentos ellas son: Dulce Adrian, Carla Patiño, Malena Azocar, Esther Rodríguez y María Virginia Salazar. GRACIAS A TODAS.

A la señora Luz Coronado por toda su ayuda y colaboración en el Postgrado de Biología Aplicada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Contenido de metalotioneínas (μg de MT/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.....19
- Figura 2. Concentración de grupos sulfidrilo totales ($\mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.....19
- Figura 3. Niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.....21
- Figura 4. Actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.....22
- Figura 5. Actividad máxima de catalasa (U/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.24

LISTA DE ABREVIATURAS

Anoxia	ANX
Anhidrobiosis	ANH
Reoxigenación previa anoxia	ANX-Reoxi
Reoxigenación previa anhidrobiosis	ANH-Reoxi
Metalotioneínas	MT
Grupos sulfidrilos	SH
Malondialdehído	MDA
Glutathiona-S-transferasa	GST
Catalasa	CAT
Coefficiente de Fisher condición	Fsc
Coefficiente de Fisher tratamientos	Fst
Sustancias reactivas del ácido tiobarbiturico	TBARS

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar los efectos que inducen los metales pesados sobre las respuestas antioxidantes y la tolerancia del mejillón verde *Perna viridis* a la anoxia (ANX) y anhidrobiosis (ANH), se procedió a colocar, en acuarios estáticos, diez organismos a 100 µg de Cd /l, 50 µg Cu/l, 50 µmol/L de H₂O₂ y un grupo sólo en agua de mar, durante una semana. Posteriormente, los organismos pre-expuestos fueron colocados (por separados) en dos condiciones experimentales: (1) agua anóxica por 48 horas, (2) fuera del agua (anhidrobiosis) por 24 horas; para luego (3) colocarlos en acuarios con agua de mar completamente aireada durante 3-5 horas como período de reoxigenación. Se determinó en cada uno de los organismos tratados: el contenido de metalotioneínas (MT), concentración de grupos sulfidrilos (-SH), sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas (PT) y actividad de las enzimas glutationa-S- transferasa (GST) y catalasa (CAT). El consumo de oxígeno (O₂) en el período de anoxia también fue evaluado. Los parámetros evaluados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA doble y para contraste “a posteriori”. Se evidenció un incremento significativo en el contenido de MT durante la exposición a metales y durante el período de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu y a Cd, en el grupo de anoxia y en el de reoxigenación previa anoxia se observó que las MT incrementaron solo con la preexposición a Cu. Se observó una disminución significativa de la MT en los períodos de anoxia y reoxigenación previa anoxia en los organismos preexpuestos a Cd y a H₂O₂. Se evidenció un aumento significativo en la concentración de grupos sulfidrilos durante la exposición en los organismos expuestos a Cu, durante la condición de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos Cu, Cd y a H₂O₂, y en la condición reoxigenación previa anoxia en los organismos preexpuestos a Cu y a H₂O₂. Se observó un incremento significativo en los niveles de TBARS durante la exposición en los organismos expuestos a Cu y Cd, y en la condición de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H₂O₂; contrariamente se observó una disminución significativa en los niveles de TBARS en la condición de reoxigenación previa anhidrobiosis. La actividad de GST mostró un descenso significativo en todas las condiciones experimentales en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂. La actividad de CAT mostró un incremento significativo en las condiciones experimentales: anoxia, anhidrobiosis, reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cd. Se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima en la condición de anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu y a H₂O₂. En esta investigación se evidenció el efecto que tiene los metales pesados sobre las respuestas bioquímicas en los diferentes cambios de oxigenación.

INTRODUCCIÓN

La oscilación de las mareas en los ecosistemas costeros trae como consecuencia cambios cíclicos de los niveles de oxígeno, condicionando su disponibilidad para los organismos supralitorales, en especial a los mejillones. Durante la bajamar, los organismos quedan expuestos a los rayos solares y al viento durante varias horas, lo que puede conllevar a una posible desecación. Para evitar estos abates ambientales, e incluso ataques de depredadores, los mejillones tienden a cerrar completamente sus conchas, lo que resulta en una condición de anoxia inducida. Para soportar la ausencia de oxígeno (anoxia) y agua (anhidrobiosis), tales bivalvos poseen mecanismos adaptativos, entre los cuales se cuenta un efectivo metabolismo fermentativo (Storey y Storey, 1990) y una reducción considerablemente de su tasa metabólica (Ladare y Storey, 2002). Las condiciones intradiarias entre normoxia y anoxia pueden provocar estrés a nivel molecular en tales organismos, no solo asociado a la baja disponibilidad de oxígeno, sino a los efectos producidos por la reintroducción de oxígeno a los tejidos, ya que en la alta marea, se inicia un proceso de reintroducción de oxígeno que puede resultar en un incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), cuyas consecuencias pueden conllevar a daños oxidativos (Pannunzio y Storey, 1998; Storey, 2004; Krivoruchko y Storey, 2010).

Las EROs, tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical (OH^{\cdot}), son moléculas que poseen electrones desapareados, permitiendo reaccionar con moléculas orgánicas. Estos oxiradicales pueden participar en distintos tipos de reacciones en las cuales pueden sufrir procesos de oxidación y reducción. Al ser especies reactivas pueden producir efectos moleculares dañinos tales como la oxidación de ADN, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos (Storey, 1996). Por lo tanto, para resistir continuamente el estrés de los cambios de oxigenación, es de suponer que los mejillones poseen componentes efectivos para minimizar los daños moleculares

durante la transición de la condición de anaerobiosis a aerobiosis (De Almeida y Dias- Bairy, 2006).

El sistema de defensa antioxidante que protege a las células de la acción perjudicial de EROs está constituido por un número de compuestos antioxidantes no enzimáticos que incluyen a las vitaminas A, C, E, glutatona y metalotioneínas, y enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD, EC 1.1.15.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutatona peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y la glutatona reductasa (GR, EC 1.6.4.2) las cuales están encargadas de controlar y llevar a concentraciones fisiológicamente estables a los oxiradicales. Además, existe un particular interés en la determinación de la actividad de la enzimas glutatona-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) la cual cataliza reacciones de conjugación de la glutatona a xenobióticos (Manduzio *et al.*, 2004).

Las metalotioneínas (MT) son proteínas termoestables de baja masa molecular (6000-12000) que se combinan ávidamente con metales de transición de los grupos IB y IIB (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}), caracterizadas por su elevado contenido de cisteína, y ausencia de aminoácidos aromáticos (Röesijadi, 1992). Se ha determinado su desempeño molecular en el metabolismo de los metales esenciales y el control de la toxicidad de los metales pesados. Se han presentado evidencias sugiriendo que las MT no están confinadas solamente al metabolismo de metales pesados, dado que pueden ser inducidas por otros factores biológicos internos y ambientales tales como anoxia, congelamiento, ayuna y variación en la oxigenación (Muto *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2001; English y Storey, 2003). Más aún, Zapata-Vívenes y Nusetti (2007) han indicado la posible participación de la MT en los procesos intracelulares de defensa contra el estrés oxidativo.

Un desbalance entre la capacidad barredora del sistema de defensa antioxidante y la acción toxica de las EROs puede causar daños oxidativos en las membranas biológicas, conllevando a peroxidación de ácidos grasos. La peroxidación de lípidos es conocida como la descomposición y producción de una variedad de sustancias, incluyendo etano, pentano y aldehídos (Sukhotin *et al.*, 2002; Sánchez, 2008). Esta respuesta ha sido reconocida e implementada como marcador de estrés

oxidativo (Ribera *et al.*, 1991). Tales daños moleculares pueden resultar en alteraciones de la integración funcional entre el citosol y las membranas celulares que determinan el control metabólico de la glucólisis en organismos resistentes a la anoxia (Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007).

La presencia de metales pesados en los ecosistemas acuáticos puede llegar a producir efectos negativos sobre la biota acuática, debido a su alta persistencia. Su peligrosidad radica en que pueden ser tóxicos a pequeñas concentraciones y también ser acumulados en la cadena trófica, empezando por el fitoplancton. Los metales pesados pueden producir un efecto de biomagnificación en los niveles más altos de la cadena ya que, al ser organismos de estos niveles parte en la dieta del hombre, constituyen un riesgo para la salud humana (Acosta y Lodeiros, 2004). Estudios han demostrado efectos tóxicos de estas sustancias sobre el metabolismo energético y tolerancia a ciertas variables ambientales en *P. viridis* (Zapata, 2005; Yap *et al.*, 2006; Nusetti *et al.*, 2010; Martínez-Gil, 2012). Se ha propuesto que el ingreso de algunos metales pesados a los organismos marinos y su posterior biotransformación vía ciclo redox de xenobióticos, puede conllevar a una sobreproducción de EROs. Por ende, los ajustes bioquímicos en organismos anóxico-tolerantes posiblemente sean perturbados por procesos de contaminación ambiental, tal como se ha sugerido en otras especies de bivalvos expuestas a diversos xenobióticos (Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1991; Nicholson, 2003; Zapata-Vívenes *et al.*, 2012).

El cobre (Cu) es un elemento esencial para el mantenimiento celular. La incorporación de niveles excesivos de este metal en los organismos genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), que sin un balance adecuado en los mecanismos de defensa, pueden generar daños irreversibles en las biomoléculas (Contreras *et al.*, 2008). Diversos autores han señalado que *P. viridis* es una buena especie para monitorear contaminación por metales esenciales en el medio acuático (Phillips, 1985; Chidambaram, 1991). Es conocido que elevadas concentraciones de Cu pueden afectar negativamente la fisiología celular de forma independiente, permitiendo la formación de especies reactivas del oxígeno, mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Fridovich, 1998).

El cadmio (Cd) es un metal no esencial con función biológica no conocida en animales, a altas concentraciones es potencialmente tóxico en los organismos acuáticos, pero a bajas concentraciones puede alterar la fisiología adversamente (Sokolova *et al.*, 2005). El Cd es considerado como uno de los elementos químicos más biotóxicos (especialmente en su forma Cd^{2+}) en los ecosistemas marinos, a los que penetra por deposición atmosférica, por la descarga de diversos afluentes, bioacumulación y de la escorrentía límica (Sadiq, 1992). No obstante, se ha demostrado que niveles subletales de Cd pueden alterar las funciones de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, respiración mitocondrial (citocromo c oxidasa) y actividad antioxidante (Nusetti *et al.*, 2010), así como cambios negativos en la tasa de respiración, crecimiento, (Narváez *et al.*, 2005).

Se ha evidenciado la inducción del sistema de defensa antioxidante en animales bajo condiciones anóxicas en especies afines (Hermes-Lima y Zenteno-Savin, 2002; De Almeida *et al.* 2005), acción que prepara al organismo al flujo de oxígeno al momento de la reoxigenación. De acuerdo con lo antes expuesto, este trabajo aporta información sobre la modulación del sistema de defensa antioxidante del mejillón verde *P. viridis* en relación a los cambios de oxigenación en el medio, y como tales ajustes bioquímicos son afectados por niveles subletales de cadmio y cobre.

METODOLOGÍA

Ejemplares y sitio de colecta

Los ejemplares de *P. viridis*, con tallas comprendidas entre 8-10 cm y sin distinción de sexo, fueron colectados en la localidad de Guayacán localizada en la región norte de la Península de Araya, Venezuela. Los organismos se mantuvieron durante una semana en acuarios con agua de mar filtrada (salinidad 36; pH $7,7 \pm 0,2$; temperatura 25 ± 1 °C), con aireación constante y alimentados con las microalgas cultivadas.

Bioensayos de exposición

Diez organismos, por cada concentración, fueron expuestos durante un período de siete días a 100 µg de Cd/l y 50 µg de Cu/l. Estas concentraciones garantizaron condiciones fisiológicas aparentemente estables durante los períodos de exposición. Se incluyó un grupo control colocados sólo en agua de mar y adicionalmente, se utilizó un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno 50 µmol/l de H₂O₂, con el objetivo de inducir daños lipoperoxidativos. Este experimento fue realizado por triplicado.

Condiciones de anoxia y anhidrobiosis

Un grupo de diez organismos por cada tratamiento (Control, Cu, Cd y H₂O₂), fueron colocados en envases contentivos con agua anóxica y sellado herméticamente durante 48 horas. A la vez, Un segundo grupo (N=10) se colocaron fuera de los acuarios por 24 horas para simular una condición de anhidrobiosis. Los mejillones fueron sujetos con cintas plásticas para evitar la abertura de las valvas. Posteriormente, ambos grupos fueron nuevamente colocados en acuarios con agua de mar completamente aireadas (95-99 % de oxigenación) por 3 horas. A cada grupo se les disecó la glándula digestiva, la cual se almacenó a -20 °C (por un periodo no mayor a 7 días) hasta su uso en la cuantificación de los parámetros bioquímicos. Los parámetros bioquímicos fueron determinados en todos los organismos expuestos y

controles, antes y después del período de anoxia, anhidrobiosis, y después de la reoxigenación.

Metalotioneínas

El contenido de metalotioneínas se llevó a cabo usando el método espectrofotométrico planteado por Viarengo *et al.*, 1997. La glándula digestiva de *P. viridis* fue homogenizada de 0-4 °C, a una relación 1:4 masa de tejido/volumen de buffer extracción el cual estuvo compuesto de Tris-HCl 20 mmol/l (hidroximetilamina) a pH 8,6, que contendrá: sacarosa 500 mmol/l, leupeptina 6 µmol/l, PMSF (ácido metil-fenil sulfoxido), 0,5 mmol/l, ditionitrotriol (DDT) 2 mmol/l y β mercaptoetanol al 0,01 %. El homogenizado será centrifugado a 1000 g por 1 hora. Por cada mililitro de sobrenadante se añadieron 1,05 ml de etanol más 80 µl de cloroformo en frío (-20 °C). Las muestras fueron centrifugadas a 2200 g por 10 minutos a 0-4 °C. Al sobrenadante colectado se le añadió 1 mg de ARN y 40 µl de HCl al 37% y 3 ml de etanol absoluto frío (a una concentración final de 87 %) se mezclaron bien y las muestras se mantuvieron a -10 °C por 2 horas y centrifugadas nuevamente a 2200 g por 30 minutos. El precipitado contenido de las metalotioneínas fue lavado con 87% de etanol/1% de cloroformo en buffer de homogenización y posteriormente centrifugado a 2200 g por 10 minutos, y secado bajo una atmósfera de nitrógeno.

El precipitado fue resuspendido en 150 µl de NaCl (cloruro de sodio) a 250 mmol/l y 150 µl de HCl a 100 mmol/l conteniendo EDTA (ácido etilendiaminotetracetato) a 4 mmol/l. Seguidamente se le añadieron 2 ml de DTNB (ácido ditionitrobenzoico) 0,43 mmol/l y NaCl 0,20 mmol/l diluído en buffer fosfato de sodio 200 mmol/l a pH 8 a temperatura ambiente. Las muestras fueron finalmente centrifugadas a 2200 g por 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado para determinar los grupos -SH de la MT a una longitud de onda de 412 nm; el contenido de MT fue estimada usando glutatona reducida como estándar (Ellman, 1959). La cantidad de MT en *P. viridis* fue definida en base a un contenido de 29 % de cisteína por cada MT (Khoo y Patel, 1999) y expresadas en µg de MT por gramo de masa húmeda. Los

tioles endógenos tales como glutatona, cisteínas libres, proteínas, etc., no interfirieron en el ensayo.

Durante el proceso de homogenización las metalotioneínas estuvieron protegidas de oxidación y de proteasas bajo condiciones reducidas con leupectina, DTT y β -mercaptoetanol.

Grupos sulfhidrilos (-SH)

La concentración de grupos sulfhidrilos totales se determinó por el método de Elman (1959). Para ello 0,2 g de tejido (glándula digestiva), se homogenizaron en 2 ml de buffer Tris 100 mmol/l pH 8,0 y fueron centrifugados a 2 200 x *g* por 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 50 μ l de las muestras. Los reactivos a utilizar fueron los siguientes: solución de DTNB (stock) constituida de 50 mmol/l de acetato de sodio y 2 mmol/l de DTNB en 100 ml de agua destilada, buffer Tris 100 mmol/l. En la cubeta experimental se añadieron 500 μ l de DTNB, 250 μ l de agua destilada, 200 μ l de buffer Tris y 50 μ l de la muestra y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 412 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto y utilizando glutatona reducida como estándar.

Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual se fundamenta en la cuantificación colorimétrica de uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, el malondialdehído (MDA), siguiendo el protocolo estandarizado para bivalvos propuesto por Livingstone *et al.* (1990). Para ello 0,2 g de tejido (glándula digestiva), se homogenizaron en 2 ml de buffer Tris 100 mmol/l pH 8,0 y fueron centrifugados a 2 200 x *g* por 15 minutos. Del sobrenadante resultante se tomaron 250 μ l y se colocaron en baño de agua a 37 °C por 15 minutos, al terminar el tiempo los mismos fueron retirados del baño de agua y colocados en baño de hielo,

adicionando a cada tubo 250 μl de solución cromógena contentiva de ácido tricloroacético 12,5%, ácido clorhídrico 1 mol/l para detener la reacción, luego a cada tubo se le añadió 500 μl ácido tiobarbitúrico al 1%, se agitaron los tubos y se colocaron en baño de agua a 90 °C con agitación constante por 45 minutos. Posteriormente fueron retirados del baño de agua y colocados nuevamente en baño de hielo para ser enfriados y luego fueron centrifugados a 1 500 x g por 10 minutos a 4°C; el sobrenadante final se transfirió a la celda del espectrofotómetro para su medición a 532 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados serán expresados en nmol de MDA por mg de proteínas.

Cuantificación de proteínas totales

Los niveles de proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.*, (1951). Para ello 0,2 g de tejido (glándula digestiva), se homogenizaron en 2 ml de buffer Tris 100 mmol/l pH 8,0 y fueron centrifugados a 2 200 x g por 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 20 μl de la muestra. Los reactivos a utilizar fueron los siguientes: El reactivo A compuesto de 10 g de carbonato de sodio en 500 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH a 100 mmol/l) y el reactivo B compuesto de 0,5 g de tartato de sodio/potasio en 30 ml de agua destilada y se disolvieron 0,25 g de sulfato de cobre (CuSO_4) hasta un volumen de 50 ml.

En la cubeta experimental se colocaron 880 μl del reactivo 1(solución cobre-alcalina) el cual estuvo compuesto de 50 ml del reactivo A con 1 ml del reactivo B, 20 μl de las muestras se mezclaron bien y se incubaron por 10 minutos, posteriormente adicionaron 100 μl del reactivo 2 compuesto de 50 ml del reactivo Folin-Crocatteus en 100 ml de agua destilada y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 650 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto y utilizando albúmina de

suero bovino como estándar. Los resultados serán expresados en gramos de masa húmeda (g.m.h).

Preparación de los extractos enzimáticos

La glándula digestiva del organismo experimental *P. viridis* se homogenizó de 0-4 °C, a una relación 1:9 masa de tejido/volumen de buffer extracción. El buffer de extracción para las preparaciones enzimáticas estuvo compuesto de Tris-HCl 20 mmol/l (hidroximetilamina) a pH 7,6 conteniendo: EDTA (ácido etilendiaminotetracetato) 1 mmol/l, DDT (ditiotreitól) 1 mmol/l, sucrosa 500 mmol/l, KCl (cloruro de potasio) 150 mmol/l, justo antes de la homogenización se le agregó 10 µl de PMSF (ácido metil-fenil sulfoxido) 100 mmol/l diluído en alcohol isopropílico). El homogenizado resultante será centrifugado inicialmente a 1 100 x g por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada. El sobrenadante obtenido será nuevamente centrifugado a 2 200 x g durante 20 minutos. Del sobrenadante final se tomaran 2 ml que se utilizarán como fuente de enzimas.

Análisis enzimáticos

Las actividades máximas de las enzimas antioxidantes se determinaron en un espectrofotometro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1 °C. Los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado en un volumen final de la mezcla de 1 ml. Los resultados fueron expresados en actividad específica (U/g.m.h.), donde U es la cantidad de enzima necesaria para catalizar 1 micromol de sustrato en un minuto.

Glutationa-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18). La actividad enzimática se determinó siguiendo el ascenso de la concentración del complejo formado entre GSH y -1-cloro- 2,4- dinitrobenceno (CDNB), a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de extinción $9,6 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de incubación consistió de 890 µl de buffer fosfato de sodio (Na_2PHO_4) 100 mmol/l pH 6,5; 10 µl CDNB 25 mmol/l diluído en etanol y 50 µl del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente para establecer la línea base. La reacción se inició por la adición de 50 µl de GSH.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). La actividad fue determinada midiendo el descenso de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (Coeficiente de extinción $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Mezcla de incubación: buffer fosfato de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mmol/l pH 7,5 y H_2O_2 500 mmol/l. A la cubeta experimental (de cuarzo) se le agregó 970 μl de buffer fosfato y 20 μl del extracto enzimático, se mezcló rápidamente y se midió la absorbancia por 90 segundos para establecer una línea base. Para dar inicio a la reacción se le añadió 10 μl de H_2O_2 .

Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto se determinó por el método de Strickland y Parson (1972). Las muestras colectadas después de diversos tiempos durante el período de anoxia (oxigenación, 1, 24, 48 y 72 horas), fueron colocadas en un envase de plástico, luego por medio de una manguera se pasó a una botella de vidrio (DBO), cuidando a toda costa que no entrara aire a la botella. Luego con la ayuda de un gotero se colocó 1 ml del reactivo 1 (solución de sulfato de manganeso MnSO_4) color rosado y 1 ml del reactivo 2 (solución de yoduro) color amarillo, inmediatamente se agitó la botella con movimiento rotatorio para fijar el oxígeno disuelto, y se guardó en la oscuridad por 30 minutos. Después de haber pasado la muestra en la oscuridad, se le agregó 1 ml del ácido sulfúrico, se agitó y se formó una coloración amarilla oscura. Posteriormente se tomaron 50 ml de la muestra y se colocó en un matraz erlenmeyer. Posteriormente para la titulación con tiosulfato se colocó en una bureta 50 ml de tiosulfato (0,01 mmol/l), luego con la ayuda de la llave de paso se deja caer gota a gota en el matraz que contenía la muestra moviendo el matraz constantemente, no se debe dejar de remover, hasta que la solución se tornó amarilla clara, luego se colocó de 2 a 3 gotas de almidón y se deja caer gota a gota nuevamente el tiosulfato hasta que la muestra quedó transparente. Luego se procedió a calcular el volumen titulado equivalente a la concentración de O_2 . La concentración de oxígeno disuelto se calculó mediante la siguiente ecuación: $\text{O}_2 \text{ ml/l} = 0,05597 \times F \times 20,134 \times V$,

Donde $F = 10 / \text{promedio de los valores de tiosulfato}$, V volumen de la muestra.

Análisis estadísticos

Todos los parámetros bioquímicos fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA de dos vías, usado un paquete estadístico Statgrafic Plus versión 5.1 en ambiente Window. Para el contraste “a posteriori” se utilizó una prueba de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

Metalotioneínas

En la figura 1 se muestra el contenido de MT en la glándula digestiva en los organismos sometidos a las diferentes condiciones experimentales expuestos a metales (Cu Cd y H₂O₂), anoxia (ANX) y anhidrobiosis (ANH), y normoxia (reoxigenación). Se observaron diferencias significativas en las diferentes condiciones experimentales. (Fsc=8270,32; p<0,05; Figura 1); (Fst=7166; 7 p<0,05; Figura 1).

Cuando se contrastan los organismos controles de cada una de las condiciones experimentales se observó un aumento significativo en el contenido de MT en las condiciones de anoxia y anhidrobiosis (70,05 ± 1,09; 72,54 ± 0,39 µg de MT/ gmh), y luego un descenso en los organismos recuperados para ambas condiciones (64,61± 0,38; 33,21± 0,7839 µg de MT/ gmh).

En el período de exposición a metales se evidenció un aumento significativo en el contenido de MT en la glándula digestiva en los organismos expuestos a las concentraciones de Cu y Cd (75, 01 ± 0,24; 76,55 ± 0,99 µg de MT/ gmh), no así para H₂O₂ (59,07± 0,73 µg de MT/ gmh).

Durante el período de anoxia se observó un incremento significativo en el contenido de MT en los organismos preexpuestos a Cu (84,99 ± 0,90 µg de MT/ gmh) y un descenso en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ (40, 91 ± 0,30; 27,78 ± 0,18 µg de MT/ gmh).

Durante el período de anhidrobiosis se observó un incremento significativo del contenido de MT en los organismos preexpuestos a Cu y Cd (83, 09 ± 1,36; 82,12 ± 1,59; µg de MT/ gmh); mientras se observó una disminución significativa de los organismos preexpuestos a H₂O₂ (40,43 ± 1,11 µg de MT/ gmh).

Los niveles de MT durante la reoxigenación, específicamente en los organismos previamente sometidos a la anoxia, mostraron un descenso en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ (17,45 ± 0,28; 16, 54 ± 0,27 µg de MT/ gmh);

sin embargo en los organismos preexpuestos a Cu los niveles de MT fueron mantenidos ($82,99 \pm 0,43 \mu\text{g}$ de MT/ gmh).

En los organismos recuperados de la anhidrobiosis se observó solo una disminución significativa en el contenido de MT en los organismos preexpuestos a Cd ($32,74 \pm 0,46 \mu\text{g}$ de MT/ gmh).

La concentración de grupos -SH en la glándula digestiva mostró diferencias significativas en los organismos sometidos a las diferentes condiciones experimentales: expuestos a metales, cambios de oxigenación (anoxia y anhidrobiosis) y recuperados en normoxia (reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis) ($F_{sc}=489,13$; $p<0,05$; Figura 2); ($F_{st}=117,96$; $p<0,05$; Figura 2).

Los organismos controles de las condiciones experimentales (anhidrobiosis y reoxigenación previa anhidrobiosis), mostraron un incremento significativo en la concentración de -SH ($0,38 \pm 0,05 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas; $0,55 \pm 0,01 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas), mientras que el período de anoxia y reoxigenación previa anoxia no mostraron diferencias significativas.

En el período de exposición a xenobióticos se observó un aumento significativo en la concentración de -SH en los organismos expuestos a la concentración de Cu ($0,62 \pm 0,05 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas), no obstante en los organismos expuestos a Cd y H_2O_2 no mostraron cambios significativos.

Durante la condición de ANX y reoxigenación previa ANX no se observaron diferencias significativas en la concentración de grupos -SH.

En la condición de anhidrobiosis se observó un aumento significativo en la concentración de grupos -SH en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H_2O_2 ($1,06 \pm 0,04$; $1,86 \pm 0,39$; $1,08 \pm 0,15 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas).

En los organismos recuperados previamente de la anhidrobiosis se observó un aumento significativo en la concentración de grupos -SH en los organismos preexpuestos a Cu y H_2O_2 ($0,83 \pm 0,05$; $1,35 \pm 0,07 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas), no así para Cd ($0,56 \pm 0,04 \mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas).

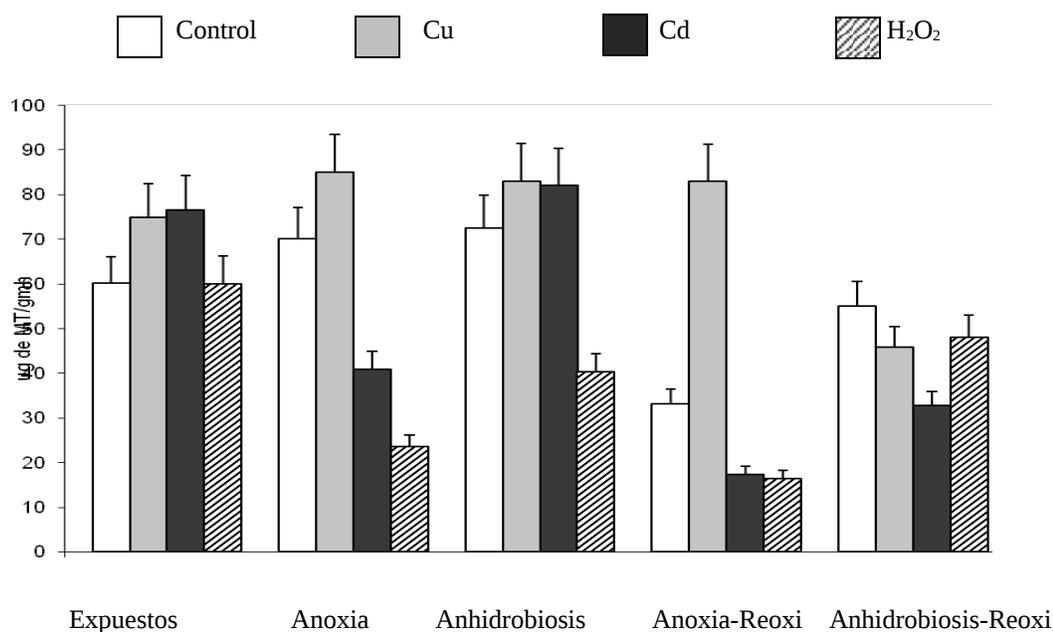


Figura 1. Contenido de metalotioneínas (μg de MT/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H₂O₂ durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.

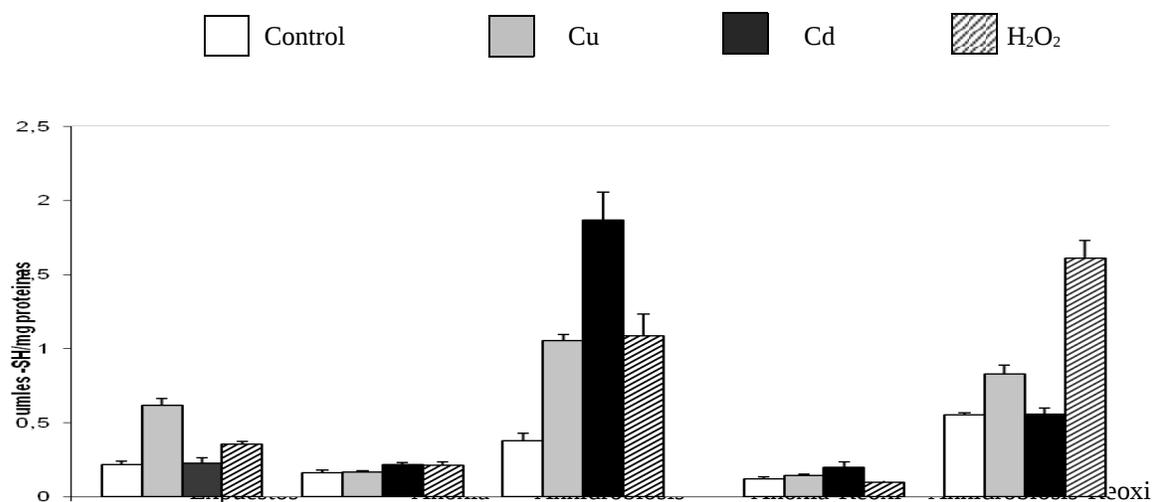


Figura 2. Concentración de grupos sulfidrilos totales ($\mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre

y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis-reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.

Peroxidación de lípidos (MDA)

En la figura 3 se muestran los niveles de TBARS en la glándula digestiva de los organismos expuestos a las diferentes condiciones experimentales, mostrando diferencias significativas ($F_{sc}=526,05$; $p<0,05$; $F_{st}=16,36$; $p<0,05$; Figura 3).

Cuando se contrastan los organismos controles de las condiciones experimentales (anoxia, anhidrobiosis y reoxigenación previa anoxia) se observó un aumento en los niveles de TBARS ($97,15 \pm 8,42$; $182,50 \pm 3,39$; $93,57 \pm 3,17$ nmoles de TBARS/mg de proteína), mientras que el período de reoxigenación previa anhidrobiosis no hubo variación significativa.

En el período de exposición se observó un aumento significativo en los niveles de TBARS en los organismos expuestos a las concentraciones de Cu y Cd ($115,96 \pm 4,97$; $83,89 \pm 10,32$ nmoles de TBARS/mg de proteína), no así para H_2O_2 ($20,64 \pm 2,79$ nmoles de TBARS/mg de proteína).

En la condición de anoxia y reoxigenación previa anoxia no se observaron diferencias significativas en los niveles de MDA.

En la condición de anhidrobiosis se observó un aumento significativo en los niveles de TBARS en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H_2O_2 ($275,49 \pm 6,69$; $379,70 \pm 79,54$, $388,06 \pm 68,28$ nmoles de MDA/mg de proteína).

En los organismos recuperados de la anhidrobiosis se observó una disminución en los niveles de MDA en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H_2O_2 ($54,66 \pm 1,14$; $50,94 \pm 3,00$; $55,15 \pm 1,74$ nmoles de MDA/mg de proteína).

Glutationa-S-transferasa (GST)

La actividad de GST en la glándula digestiva presentó diferencias significativas en los diferentes condiciones experimentales ($F_{sc}=104,88$; $p<0,05$ / $F_{st}=234,20$; $p<0,05$; Figura 4).

Cuando se contrastan los organismos controles de las condiciones experimentales (anoxia, anhidrobiosis, reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis), se observó un incremento ($0,76 \pm 0,03$; $0,91 \pm 0,07$; $0,90 \pm 0,06$; $0,82 \pm 0,11$; $0,82 \pm 0,12$ U/ gmh).

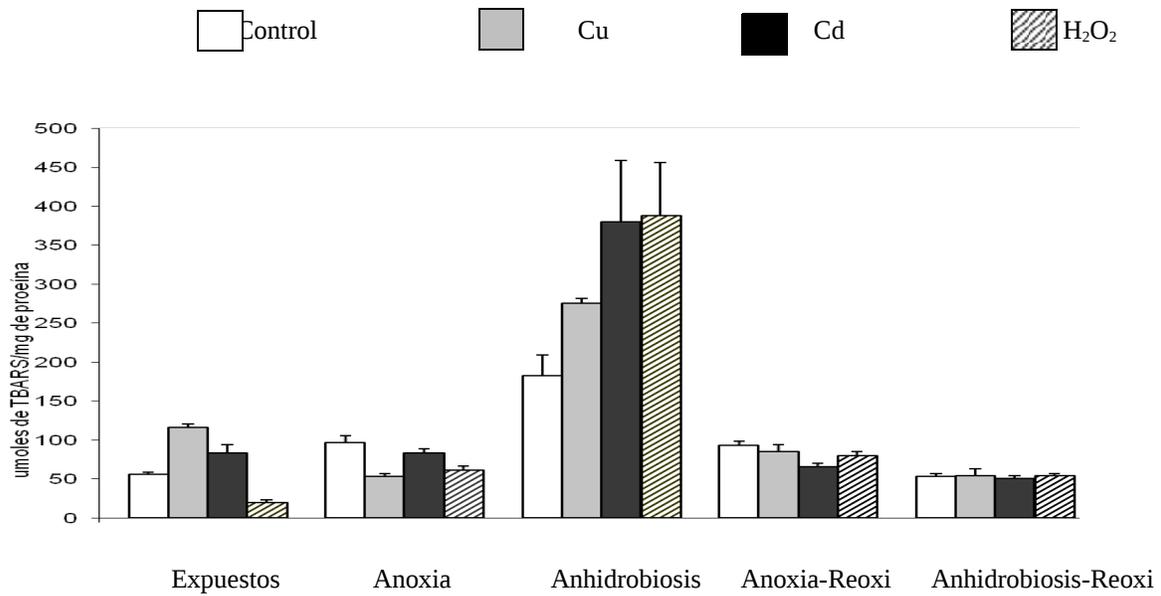


Figura 3. Niveles de malondialdehído (nmol de MDA/mg de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H₂O₂ durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.

Durante la exposición a metales se observó una disminución significativa de la actividad de GST en los organismos expuestos a las concentraciones de Cd y H₂O₂ ($0,62 \pm 0,12$; $0,64 \pm 0,09$ U/ gmh).

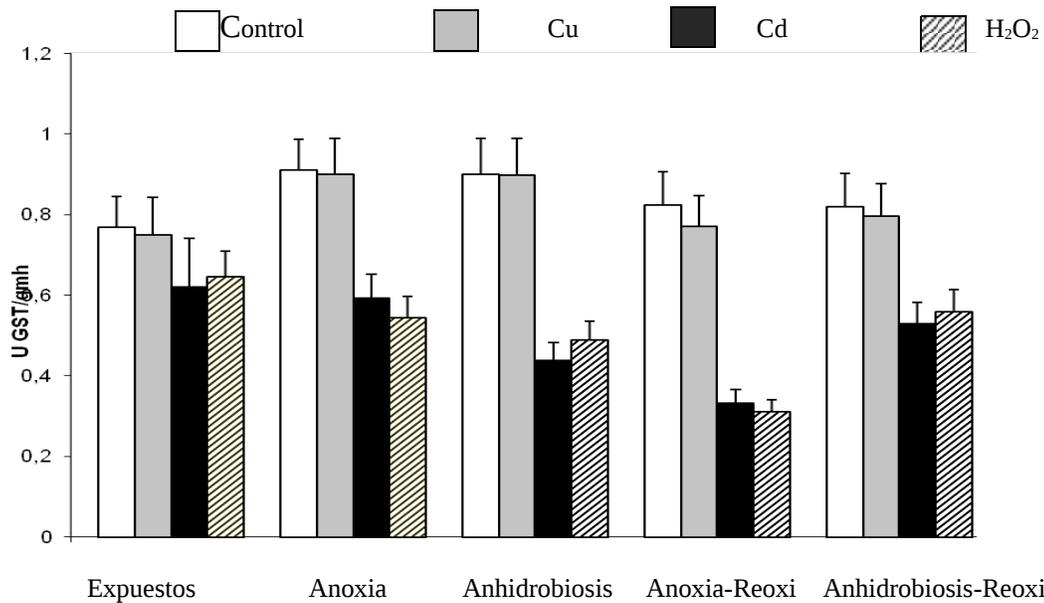


Figura 4. Actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.

Durante la condición de anoxia se observó una disminución significativa de la actividad de GST en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ ($0,59 \pm 0,09$; $0,54 \pm 0,09$ U/ gmh), mientras que en los organismos preexpuestos a Cu la actividad de la enzima se mantuvo igual a los organismos controles.

Durante la condición de anhidrobiosis se observó una disminución significativa de la actividad de GST en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ ($0,43 \pm 0,01$; $0,48 \pm 0,04$ U/ gmh), mientras que en los organismos preexpuestos a Cu la actividad de la enzima se mantuvo igual a los organismos controles.

La actividad de GST durante la reoxigenación, en los organismos previamente sometidos a la anoxia, mostró un descenso significativo en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ ($0,33 \pm 0,05$; $0,31 \pm 0,01$ U/ gmh), mientras que en los

organismos preexpuestos a Cu la actividad de la enzima se mantuvo igual a los organismos controles.

La actividad de GST durante la reoxigenación, en los organismos previamente sometidos a la anhidrobiosis mostró una disminución significativa de la actividad de GST en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂ ($0,53 \pm 0,11$; $0,55 \pm 0,12$ U/ gmh), mientras que en los organismos preexpuestos a Cu la actividad de la enzima se mantuvo igual a los organismos controles.

Catalasa (CAT)

La actividad de CAT en la glándula digestiva mostró diferencias significativas en las diferentes condiciones experimentales (Fsc= 51,94; p<0,05/ Fst=383,68; p<0,05; Figura 5).

Cuando se contrastan los organismos controles se observó un incremento significativo de la actividad de CAT en las diferentes condiciones experimentales: anoxia, anhidrobiosis, reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis- ($0,65 \pm 2,12$; $118,05 \pm 2,16$; $110,05 \pm 2,04$; $120,49 \pm 1,92$; $82,01 \pm 3,19$; U/ gmh).

Durante la exposición a metales se evidenció un incremento significativo en la actividad de la enzima en los organismos expuestos a las concentraciones de Cu, Cd y H₂O₂ ($91,05 \pm 2,07$; $120,09 \pm 2,06$; $81,07 \pm 2,08$ U/ gmh).

Durante la condición de anoxia se observó un aumento significativo en la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cd ($160,09 \pm 3,16$ U/ gmh). Sin embargo se observó una disminución de la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cu y H₂O₂ ($84,14 \pm 3,36$; $52,42 \pm 2,17$ U/ gmh).

Durante la condición de ANH se observó un aumento significativo en la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cd ($129,01 \pm 2,04$ U/ gmh), mientras se observó una disminución de la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a H₂O₂ ($49,92 \pm 1,17$ U/ gmh).

En los organismos recuperados de la anoxia se observó un aumento significativo en la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cd ($158,09 \pm 3,06$ U/ gmh), sin embargo se observó una disminución de la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a H₂O₂ ($51,07 \pm 1,78$ U/ gmh).

En los organismos recuperados de la anhidrobiosis se observó un aumento significativo en la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cd ($120,82 \pm 3,08$ U/ gmh), sin embargo se observó una disminución de la actividad de CAT en los organismos preexpuestos a Cu y H₂O₂ ($45,09 \pm 2,36$; $55,64 \pm 2,10$ U/ gmh).

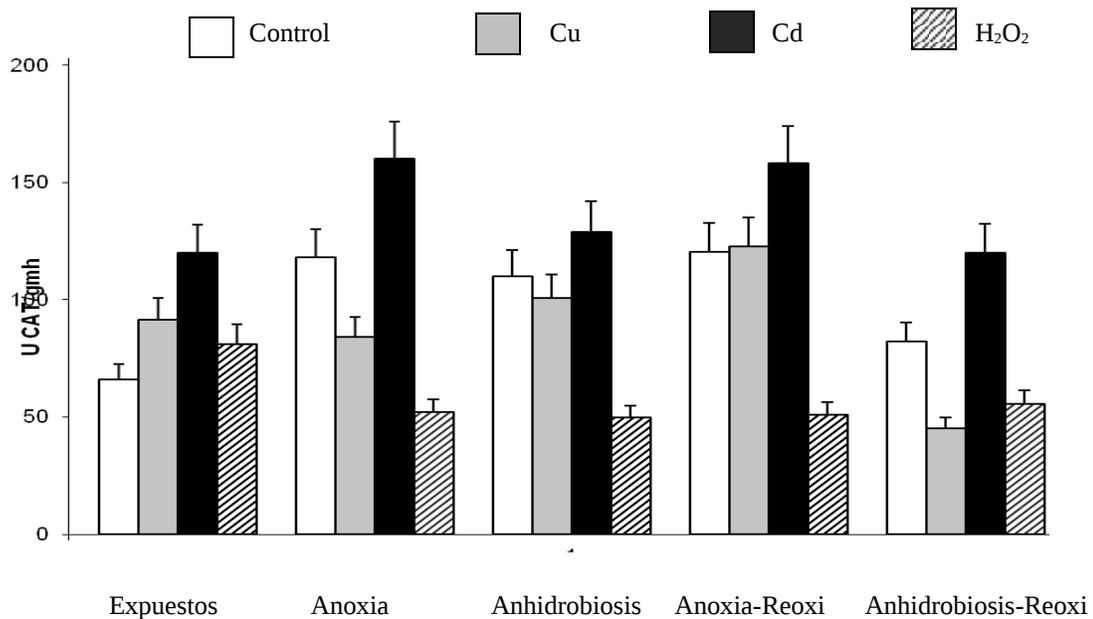


Figura 5. Actividad máxima de catalasa (U/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días y en las diferentes condiciones experimentales anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), anoxia- reoxigenación y anhidrobiosis- reoxigenación (3 horas). Las barras expresan las medias y la tendencia la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Esta investigación muestra un incremento en los compuestos antioxidantes y en la actividad de las enzimas a excepción de la enzima GST, que presentó una disminución significativa en el mejillon *P. viridis* inducido no solo por la exposición a metales pesados (Cu y Cd) y agentes prooxidantes (H_2O_2), sino también bajo cambios de oxigenación. Se observó aumento en los niveles de las especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) reflejando el daño oxidativo asociado a la exposición a un corto periodo a metales, y con mayor efecto en la anhidrobiosis. Al parecer, en la condición de anoxia (ANX), las respuestas antioxidantes fueron suficientes para contrarrestar el posible daño oxidativo que pudo ser ocasionado durante este período, visualizado por una disminución en los niveles de TBARS en anoxia. Contrariamente en el período de anhidrobiosis (ANH) se incrementaron las respuestas bioquímicas: MT, -SH, y CAT, las cuales no fueron altamente efectivas para evitar el estrés oxidativo que se evidenció en esta condición por el incremento altamente significativo en los niveles de MDA en los organismos preexposados a (Cu, Cd y H_2O_2). En la reoxigenación previa ANX se incrementó el contenido de MT (Cu) y actividad de CAT (Cd), que fue suficiente para evitar el daño lipoperoxidativo evidenciado por no presentar variación significativa en los niveles de TBARS. En la reoxigenación previa anhidrobiosis se observó un incremento en la concentración de -SH y actividad de CAT (Cd), las cuales fueron óptimas para reducir el daño oxidativo, evidenciado por una reducción significativa en los niveles de TBARS en las diferentes condiciones experimentales. La actividad de GST presentó una disminución significativa en las diferentes condiciones experimentales (expuestos, ANX, ANH, reoxigenación previa ANX, reoxigenación previa ANH) a las concentraciones de Cd y H_2O_2 .

El incremento en el contenido de MT en la glándula digestiva de los organismos durante la condición de exposición, anoxia y reoxigenación previa anoxia a las concentraciones de Cu y Cd, puede estar relacionado con una reducción significativa en los niveles de TBARS. Por el contrario el incremento de MT en

anhidrobiosis no fue suficiente para contrarrestar el daño oxidativo, evidenciado por un incremento significativo en los niveles de TBARS en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H₂O₂. En el presente estudio los organismos fueron expuestos a Cu y Cd para inducir las MT y la exposición a H₂O₂ sirvió para inducir daños lipoperóxidativos. En mejillones, el incremento de la producción de MT es mediado por el ingreso de Cu y Cd a la glándula digestiva, esta proteína es capaz de interactuar directamente con metales (Viarengo *et al.*, 1997). Se ha caracterizado y secuenciado la MT (tipo I) presente en el mejillón *P. viridis*, la cual está formada por 72 aa y un alto contenido de grupos -SH (21 Cys y 9 dominios Cys-X-Cys) (Khoo y Patel, 1999; Viarengo *et al.*, 1999; Davis y Cousins, 2000; Zapata, 2005).

Ambos metales (Cu y Cd) ejercen un efecto modulador sobre la síntesis de esta proteína. Las MT tienen un papel importante en los procesos de control de toxicidad de metales pesados, regulación del metabolismo, transporte y almacenamiento de metales como Zn y Cu y protección frente al estrés oxidativo (Zapata y Nusetti, 2007). Las MT juegan un papel fundamental como un sistema de protección celular contra la toxicidad del Cd y debido a que en su forma iónica el Cu es un elemento muy tóxico, se ha propuesto que las MT pueden tener una función importante al fijar el Cu iónico y así mantener baja su concentración intracelular. La estabilidad del complejo MT-Cu es 100 mayor a la MT-Cd y a su vez la constante de estabilidad del complejo es 1000 veces mayor a la del complejo MT-Zn (Brambila, 1999).

El incremento de MT en organismos preexpuestos a Cd y Cu en los períodos de anoxia y reoxigenación previa anoxia fue suficiente para evitar los daños oxidativos y posibles ajustes fisiológicos que permitieron una mayor sobrevivencia a la anoxia (Zapata, 2005; Zapata y Nusetti, 2007); respuesta que no fue evidenciada en los organismos expuestos a anhidrobiosis, por el incremento en los niveles de TBARS. Un metabolismo aeróbico limitado puede comprometer el mantenimiento de las funciones; es ampliamente conocido que los niveles subletales de Cd disipan el potencial de membrana mitocondrial en invertebrados y vertebrados, alterando de esta manera todos los procesos bioquímicos fundamentales que se encargan de producir

energía a partir de nutrientes por medio de oxígeno, lo que trae como consecuencia el agotamiento de ATP (Nusetti *et al.*, 2010); y el Cu a altas concentraciones puede producir estrés oxidativo por reacciones Fenton (Fridovich, 1998).

Las principales rutas de desintoxicación de metales pesados en los tejidos incluyen la actividad de ligandos a los metales en ciertas proteínas (MT y algunas proteínas de alta masa molar), secuestros por los lisosomas y vesículas membranosas de metal-tiolados y complejos metal-imidazólicos de moléculas de baja masa molar (taurina, histidina). Los metales ligados a moléculas orgánicas pueden ser dirigidos a los lisosomas y a las vesículas intracelulares, resultando en la reducción de la toxicidad de los iones metálicos por vía exocitosis y excreción del cuerpo (Viarengo *et al.*, 1981; Di Giulio *et al.*, 1995; Alemán, 2007).

Las MT son buenas candidatas a participar en la defensa frente al estrés oxidativo por varias razones. En primer lugar estas proteínas tienen un gran número de tioles en su estructura. Este grupo químico es muy neutrófilo por lo que puede reaccionar con mucha afinidad con radicales electrófilos como las EROs (Kagi y Shaffer, 1988; Vallee, 1995). *In vitro* se ha observado que la MT-I es capaz de interactuar con el radical libre OH^\cdot y en menor medida con O_2^\cdot causados por la actividad de la xantina oxidasa. La afinidad con la que reacciona con OH^\cdot es superior a la de cualquier molécula biológica conocida por lo que pensó que su función podría ser la de proteger a la célula frente a este radical (Thomalley y Vasak, 1985). La interacción se realizaría con directamente con los grupos tioles al ser desplazados los metales.

El incremento observado en la concentración de grupos $-\text{SH}$ en los mejillones durante el período de exposición (Cu), anhidrobiosis (Cu, Cd, H_2O_2) y reoxigenación previa anhidrobiosis (Cu, H_2O_2), posiblemente corresponda a una respuesta de compensación antioxidante contra la producción de intermediarios reactivos experimentada por el ingreso excesivo Cd y Cu al organismo, evidenciado por un aumento en los niveles de TBARS en el período de anhidrobiosis. No obstante en el período de anhidrobiosis también se observó un incremento de las MT, pero no fue suficiente para contrarrestar los daños oxidativos. Sin embargo, el incremento de $-\text{SH}$

en el período de reoxigenación previa anhidrobiosis fue suficiente para evitar daños lipoperóxidativos, ya que se observó una reducción significativa en los niveles de TBARS.

Con la valoración de los grupos tioles en esta investigación se pretendió obtener en forma generalizada, la sumatoria de las concentraciones de GSH, Homocisteína, cisteína y otros compuestos contentivos de –SH, inclusive proteínas. Los grupos –SH son químicamente activos y presentan una alta afinidad por metales pesados (edman *et al.*, 2001). Los tioles de baja masa molecular, actúan como antioxidantes endógenos y amortiguadores redox, siendo importantes en la homeostasis celular. Estas funciones celulares son mediadas por modificaciones post-traduccionales (procesos de tiolación de proteínas), las cual involucran la formación de mezclas de disulfuros entre GSH y residuos de cisteínas de cadenas polipeptídicas (Zapata, 2005; Barreto, 2010).

P. viridis posee defensas antioxidantes (compuestos y enzimas antioxidantes) para contrarrestar los daños oxidativos. Uno de los compuestos más importantes es la GSH, junto a otros compuestos de baja masa molecular contentivos de grupos –SH (Zapata, 2005). La GSH a pesar que posee un solo grupo –SH, tiene como función principal y primordial mantener el balance redox (GSH y GSSG) en la célula, asegurando el funcionamiento normal, como el transporte y metabolismo en el organismo. Por esta razón y porque se ha señalado que la GSH protege contra la toxicidad de Hg, Cd y Cu indicando la actividad protectora de la molécula, por la afinidad de los grupos –SH con iones de metales. Metales como Hg, Cu y Fe existen en múltiples estados de oxidación las cuales inducen, a series de reacciones redox, estrés oxidativo en células y tejidos (Aleman, 2007). Además se han reportado incrementos en la concentración de GSH como respuesta antioxidante en *P. viridis* sometido a bifenilos policlorinados (PBCs), un fuerte inductor de daño oxidativo (Cheung *et al.*, 2002).

El incremento de los niveles de TBARS en el período de exposición (Cu) y anhidrobiosis (Cu, Cd y H₂O₂) puede estar relacionado con la sobreproducción de EROs que podría estar desbalanceando al sistema de defensa antioxidante; indicando

que las respuestas bioquímicas no fueron suficientemente efectivas para contrarrestar el daño oxidativo ocasionado en las membranas. La sobreproducción de radicales libres, tales como el anión superóxido y radical hidróxilo pueden perturbar la eficiencia antioxidante, lo cual ofrece un preámbulo para las alteraciones oxidativas (peroxidación) de las membranas biológicas. El efecto prooxidante de los metales de transición tales como Fe y Cu en organismos ha sido ensayado, mostrando que estos metales pueden inducir producción de oxiradicales principalmente peroxidación de lípidos. Esto fue confirmado en este estudio, demostrando incrementos de EROs y MDA en el tejido de mejillones expuestos a Cu en los períodos anteriormente mencionados. De igual manera se observó una alteración del estado redox en los organismos expuestos a Cd y H₂O₂ respectivamente.

En el entorno celular las moléculas atacadas pueden ser proteínas, ácidos nucleicos ó ácidos grasos que pueden ver alterada su estructura molecular y su función. Dentro de los ácidos grasos son especialmente sensibles los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Como consecuencia de la reacción con un radical libre, la molécula con la que interacciona puede perder ó ganar electrones convirtiéndose a su vez en un radical lo cual puede conducir a una reacción en cadena como la peroxidación lipídica. Estudios realizados con Cu y Cd en la glándula digestiva han demostrado que la primera alteración se detecta por una baja actividad y estabilidad de las membranas lisosomales (estructuras que participan en el catabolismo y eliminación de las MT), sugiriendo que los iones metálicos juegan un rol bioquímico en la peroxidación de lípidos (LPO), representando probablemente el punto central en la alteración de la fisiología lisosomal (Viarengo *et al.*, 1981). Se ha sugerido que el Cu estimula los procesos de LPO alterando la fisiología de los lisosomas de la glándula digestiva del mejillón *M. edulis*, indicando un incremento en el contenido de granos de lipofusina capaces de unir cationes metálicos en forma estable, representando un tipo de desintoxicación de los metales pesados en las células de los mejillones (Viarengo, 1989). Varios estudios muestran el aumento en LPO en organismos expuestos a altas concentraciones de xenobióticos (Manduzio *et al.* ,

2004; Sánchez, 2008), originándose lipoperóxidos, lo cual es una señal importante de que están ocurriendo procesos patológicos en la célula (Pacifci y Davies, 1991).

La disminución de los niveles de TBARS en el período de reoxigenación previa anhidrobiosis puede ser debido a que las respuestas bioquímicas fueron altamente efectivas contra la producción de oxiradicales, inducidos por la exposición a metales pesados, evitando así niveles elevados de peroxidación de lípidos.

De Almeida *et al.*, 2005 explican que pueden ocurrir cambios en el sistema de defensa antioxidante durante la falta de O₂ en organismos tolerantes hipoxia/anoxia. Tales cambios no fueron observados después de 18 horas, lo que indica que el tiempo de exposición afecta al sistema de defensa antioxidante. Cuando los mejillones fueron reoxigenados, los niveles de MDA retornaron a los valores controles. Este patrón muestra que los mejillones son capaces de conservar los niveles basales cuando son reoxigenados, lo cual indica la necesidad de oxígeno en los procesos metabólicos para tratar de reparar el daño oxidativo y esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

También se ha demostrado que la LPO de las membranas biológicas juega un papel prominente en el envejecimiento de las células y en la toxicidad del oxígeno, ocasionando una disminución significativa de los fosfolípidos de las membranas, modificando así su fluidez. Es probable que los iones de Cu participen en la iniciación y propagación de LPO y estimulen *in vivo* la degradación de las membranas lipídicas (Sánchez, 2008). Los niveles de MDA van a depender de las enzimas antioxidantes, las mismas pueden variar entre órganos, concentración y tiempos de exposición.

La disminución de la actividad de GST en la glándula digestiva de los organismos expuestos a las diferentes condiciones experimentales, puede ser debido a que a las concentraciones de Cd y H₂O₂, causaron una inhibición en la actividad de la enzima, lo cual evitó la captación y subsiguiente eliminación de sustancias prooxidantes, posiblemente asociado con una condición de estrés oxidativo, evidenciado por los niveles de MDA. Se ha reportado que no todas las isoenzimas de GST pueden ser inducibles (Fitzpatrick *et al.*, 1995). La GST se encarga de controlar

la toxicidad de metabolitos electrofílicos derivados de la biotransformación de xenobióticos sustancias de desecho fisiológicos los cuales son conjugados a GSH (Di Giulio *et al.*, 1995). Estos complejos se hacen más solubles y fácilmente excretables. La actividad de GST mayormente detectada en el citosol y en la fracción microsomal y son susceptibles a ser inducidas por exposición a sustancias prooxidantes (Damián *et al.*, 2004; Manduzio *et al.*, 2004). Además existen evidencias que sugieren la participación de la enzima en el transporte intracelular de compuestos lipofílicos endógenos y exógenos (xenobióticos) hacia la membrana micromosomal para su biotransformación primaria por el MFO de citocromo P450 (Nusetti *et al.*, 2004).

Existen estudios donde la actividad de GST no fue incrementa en la glándula digestiva expuesta a diferentes contaminantes (Jemec *et al.*, 2008; Sánchez, 2008). Cheung *et al.*, 2001, reportaron que la GST hepática no incremento significativamente con la conc de PAHs, lo cual puede ser debido a que en algunos casos la concentración del tóxico puede ser innaturalmente alta, causando que la enzima sea inhibida. También es posible que los intermediarios tóxicos producidos en el hepatopáncreas pueda inactivar a GST, resultando una reducida actividad de GST. De igual manera Manduzio *et al.*, 2004, no observaron incremento de GST en hepatopáncreas, debido a que a pesar de que la glándula digestiva es de peculiar interés porque este tejido está involucrado en más procesos de biotransformación y generación del ciclo redox, pero esto muestra altas fluctuaciones de niveles de actividad.

Existen evidencias que muestran que la actividad de GST no fue incrementada durante los períodos de exposición a anoxia y anhidrobiosis. Krivoruchko y Storey, 2010 reportaron que existen dos clases de α GST fueron encontradas en el hígado de *Trachemys scripta elengans*, un homodimero y un heterodimero. Ambos exhibieron una mayor reducción específica en respuesta a anoxia y el heterodimero presento mejor cambio en preferencia del sustrato. Además es aparente que GST sufre modificaciones en respuesta a cambios en la disponibilidad de oxígeno para optimizar su función. Sin embargo, De Almeida *et al.*, 2005 observaron incrementos en la actividad de GST en la glándula digestiva a hipoxia (18 horas) y reoxigenación

(1hora); Este incremento puede ser debido a la excreción de los productos finales anaeróbicos generados y acumulados durante el período hipoxia/anoxia. Sin embargo existen evidencias que las isoformas de GST tienen actividad peroxidasa.

El incremento de la actividad de la enzima CAT en la glándula digestiva en los organismos durante el período de exposición (Cu, Cd y H₂O₂), ANX (Cd), ANH (Cd), reoxigenación-ANX (Cd) y reoxigenación-ANH (Cd), sugiere una situación de incrementos en la producción de oxiradicales presumiblemente con aniones superóxidos y peróxidos asociado sustancias prooxidantes. Estas respuestas de defensa antioxidante contra el desarrollo de un estrés oxidativo, a nivel enzimático refleja la capacidad de defensa que posee CAT frente a la presencia de EROs. La glándula digestiva en bivalvos acumula elevados niveles de sustancias orgánicas e inorgánicas, cuya biotransformación resulta en un incremento en la generación de radicales libres, acentuando el riesgo de LPO y cambios estructurales en las proteínas, y ác. nucleicos sino emerge una respuesta adecuada antioxidante (Viarengo *et al.*, 1990; Di Giulio *et al.*, 1995; Nusetti *et al.*, 2004). CAT descompone el H₂O₂ en agua y oxígeno (Wiston y Di Giulio, 1991; Fridovish, 1998). Numerosas investigaciones han demostrado la activación del sistema de defensa antioxidante específicamente CAT en organismos contaminados con distintos xenobióticos orgánicos e inorgánicos (Cheung *et al.*, 2001; 2002; Niyogi *et al.*, 2001; Sánchez, 2008).

El incremento en la actividad de CAT es interpretado como una preparación del mejillón en respuesta a la producción de EROs durante la anoxia y anhidrobiosis y la subsecuente reoxigenación. Según la hipótesis Hermes-Lima *et al.*, 1998, el cual observó incrementos de SOD y CAT en 30 días de invernación. Considerando que la exposición hipoxia/anoxia pueden resultar en incrementos en daños de ADN y peroxidación de lípidos, por esto incrementa la actividad CAT, que también puede resultar como respuesta celular para el incremento en la producción de EROs durante el período de hipoxia. Aunque este incremento no puede proteger contra daño oxidativo durante el período de hipoxia, puede contribuir a un decrecimiento del daño después de la reoxigenación (De Almeida *et al.*, 2005). Krivoruchko y Storey, 2010, han observado un incremento de CAT en el período activo después de la estivación.

En contraste una situación diferente ocurrió en estivación en *O. láctea*, la actividad de CAT, SOD, GPx, GST, fueron generalmente altas en hepatopáncreas en caracoles en estivación que en caracoles activos (Hermes lima *et al.*, 1995). Se han postulado que estos ajustes de defensa antioxidante pueden minimizar daños debido a la carga de la generación de EROs, ocurriendo como resultado de un rápido incremento en el consumo de O₂ sobre minutos tempranos del despertamiento (Hermes lima *et al.*, 1998).

La disminución de la actividad de la enzima CAT en la glándula digestiva en los organismos durante los períodos de ANX (H₂O₂), ANH (H₂O₂), reoxigenación-ANX (H₂O₂) y reoxigenación-ANH (H₂O₂), puede ser debido a que el Cd probablemente induce la producción del radical hidróxilo, el cual es la principal vía para la producción de H₂O₂ (Jemec *et al.*, 2008). Igualmente a altas concentraciones de H₂O₂ causan una inactivación rápida de CAT (Aebi, 1984).

El consumo de oxígeno fue alto en los organismos expuestos a las 24 horas al período de ANX, mientras que a las 48 horas no hubo consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno permite medir la condición fisiológica de los individuos frente una situación de estrés por contaminantes en los ecosistemas marinos (Narváez *et al.*, 2005).

En este estudio se evidenciaron las adaptaciones bioquímicas que sufren los organismos cuando están sometidos a estados de exposición como: anoxia, anhidrobiosis, reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis demostrado por las respuestas bioquímicas analizadas en la glándula digestiva de *P. viridis* en los distintos cambios de oxigenación. El mejillón verde *P. viridis* está adaptado a rápidas y drásticas fluctuaciones de oxígeno en su medio natural. Generalmente los bivalvos sometidos a cortos períodos de ANX (2-4 horas) incrementan la actividad de las enzimas fosforilasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, piruvato quinasa entre otras. Por lo tanto se sugiere que las alteraciones en las membranas biológicas y/o macromoléculas asociadas, podrían ser un factor de perturbación en los ajustes del metabolismo energético que modulan la actividad glucolítica bajo condiciones de ANX (Zapata, 2005).

Los mecanismos bioquímicos de tolerancia a la ANX en moluscos han sido bien estudiados en bivalvos y gasterópodos para *Mytilus* spp (de Zwan *et al.*, 1992), y *L. littorea* (Greenway y Storey, 2001). Por consiguiente, la respuesta a la ANX incluye la inhibición reversible para la vía glucolítica acoplada con el incremento en la producción de ATP por metabolismo fermentativo, principalmente para la acumulación de succinato y propionato como productos finales. Además, la renovación de ATP es inhibida y la tasa metabólica suprimida a 10% de la tasa aeróbica restante a igual temperatura (Ladare y Storey, 2002; Tovar, 2007).

El estrés oxidativo puede ocurrir bajo varias condiciones, una de las más importantes es la exposición de los organismos a hipoxia/anoxia seguido por reoxigenación (Hermes-lima y Zenteno-Savin, 2002; Storey, 2004). Esta condición principalmente puede ocasionar cambios significativos en el metabolismo oxidativo celular, generalmente inducido por sensores de O₂ que son modulados por cambios en la producción de O₂. Los sensores de O₂ son hemoproteínas o proteínas que encierran un cofactor hemo (Hochachka, 1997), los cuales son afectados por modificaciones en la concentración de O₂. El sensor también puede contener NADPH oxidasa y es capaz de generar EROs para servir como moléculas señales. (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Datos previos han indicado que aun cuando los mejillones son expuestos a la hipoxia, ellos pueden mantener un bajo flujo de O₂, los tejidos por apertura y cierre periódico de la concha (gapping behavior) que garantiza una baja renovación de O₂. La mitocondria ha sido considerada como un posible sensor de O₂ durante hipoxia, por la continua generación de EROs en el sitio de la Ubisemiquinona del complejo III. Es bien conocido que las EROs pueden ser producidas por reducción incompleta del O₂ molecular en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Las EROs generadas en este proceso incluyen O₂⁻, OH⁻, H₂O₂; y la tendencia de la cadena transportadora de electrones para generar tales EROs es por una transferencia de electrones inapropiada al O₂ molecular, que depende de factores que incluye la disponibilidad del O₂ molecular el estado de reducción de llevar los electrones y membrana potencial de la mitocondria (De Almeida *et al.*, 2005).

La capacidad de depresión metabólica 10-20% del correspondiente metabolismo aeróbico, permite que los tejidos minimizen la necesidad de energía y además de la supervivencia por extensos períodos de tiempo usando el ATP generado por la glucólisis anaeróbicamente solamente. Además para los cambios presentados en tejidos por la severa limitante de O₂ (anhidrobiosis) la tortuga puede también sufrir con el potencial de estrés oxidativo que ocurre con la reintroducción del O₂. La cadena transportadora de electrones mitocondrial puede reducirse durante la hipoxia/anoxia porque es menor o ausente de O₂ como aceptor de electrones. Esto hace particularmente susceptible para regenerar EROs sobre la reoxigenación cuando la presencia de O₂ es alta (Storey y Storey, 1990; Krivoruchko y Kenneth Storey, 2010).

Esta investigación evidenció el efecto que tienen los metales pesados (Cu y Cd) sobre la modulación de las respuestas bioquímicas (MT, grupos -SH, GST, CAT) en presencia de cambios de oxigenación. Es probable que la preexposición de *P. viridis* a cobre, cadmio y peróxido de hidrógeno, haya resultado en la intensificación del sistema antioxidante mediado por las MT, particularmente en el período de anoxia y reoxigenación previa anoxia fueron altamente efectivas relacionándose inversamente con la formación de TBARS en la glándula digestiva de los organismos. Sin embargo en el período de anhidrobiosis el incremento de las MT y las respuestas bioquímicas activadas no fueron suficientes para contrarrestar los daños oxidativo mostrado por una relación directa con incremento de productos de lipoperoxidación de membranas (TBARS), lo cual evidencia que posiblemente fue este el cambio de oxigenación que más afectó el sistema de defensa antioxidante y los ajustes fisiológicos inducidos por la falta de O₂.

CONCLUSIONES

- La exposición *P. viridis* a concentraciones subletales de Cu, Cd y H₂O₂ reflejó alteraciones en las respuestas bioquímicas, inducidas por acción directa de los posibles agentes prooxidantes.
- El sistema antioxidante en la glándula digestiva de *P. viridis* no fue afectado por la exposición a Cu, Cd y H₂O₂ en el período de anoxia, no obstante las elevadas concentraciones de MT comprueban ser un mecanismo de defensa efectivo contra la toxicidad del Cd toxicidad que podría afectar los mecanismos de adaptación bioquímicos relacionados con la tolerancia a condiciones anóxicas.
- El sistema de defensa antioxidante no fue altamente efectivo en la glándula digestiva en el período de ANH, mecanismo de defensa inducibles en presencia de altas concentraciones de EROs; ya que los niveles de TBARS reflejaron una condición de daño oxidativo.
- La sensibilidad de los biomarcadores bioquímicos evaluados en *P. viridis* siguieren ser eficaces señales en presencia de metales pesados como Cu y Cd, marcando diferencias significativas en el tiempo de exposición y dosis de los contaminantes.
- En esta investigación se evidenció el efecto que tiene los metales pesados sobre las respuestas bioquímicas en los diferentes cambios de oxigenación en los que habitan los mejillones en el ambiente natural.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. Catalasa in vitro. *Methods in Enzimology.*, 105: 121-126.
- Alemán, L. 2007. Efectos tóxicos del mercurio en el mejillón verde *P. viridis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia). Trabajo de Grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Acosta, V. y Lodeiros, C. 2004. Metales pesados en almeja *Tivela Mactroides* Born, 1778 (Bivlavia: Veneridae) en localidades costeras con distintos grados de contaminación en Venezuela. *Ciencias Marinas.*, 30 (2): 323-333.
- Agarrad, J; Kishore, R. y Bayne, B. 1992. *Perna viridis* (Linnaeus 1758) first record of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribb. Mar. Stud.*, 3: 59-60.
- Antón, M. 2010. Parámetros citológicos, inmunológicos y Estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo *Pinctada imbricata* expuesto a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos. Trabajo de Grado. Departamento de Biología. UDO. Cumaná.
- Arias-Díaz, A. y García, J. 2001. Concentración de metales pesados Cu y Pb y su relación con la actividad enzimática de glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa en el mejillón *Perna viridis*. *Zootec. Trop.*, 19 (1): 115-129.
- Bauman, J.W.; Liu, J.; Liu, P.Y. y Klaassen, C.D. 1991. Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110: 347-354.
- Benítez, J y T. Okuda. 1971. Variación estacional en la composición química del mejillón *Perna perna* (L) *natural*. *Bol. Inst. Ocean. Univ. Oriente.*, 10(1): 3-8.
- Fraga, F.1958. Variación estacional de la composición bioquímica del mejillón *Mytilus edulis*. II. Hidratos de carbono. *Inv. Pesq.*, 2: 33-37.
- Barreto, M. 2010. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) colectado en costas del Estado Sucre, Venezuela. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Brambila, E. y Lozano, P. 1999. Metalotioneínas, Bioquímicas y Funciones Propuestas. Centro de Investigaciones Microbiológicas, ICBUAP.
- Bindoli, A. 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, 5: 247-261.
- Cheung, C.; Zheng, G.; Li, A.; Richardson, B. y Lam, P. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidant responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.*, 52: 189-203.
- Cheung, C.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 2002. Relationship between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbon (polychlorinated biphenyl and chlorinated pesticides) and antioxidant responses of marine mussel, *Perna viridis*. *Mar. Poll. Bull.*, 45: 181-191.

- Chidambaram, N. 1991. The green mussel *Perna viridis* as an indicator of copper pollution along Madras coast, Bay of Bengal. *Indian J. Environ. Prot.*, 11: 727-732.
- Contreras, L.; Moenne, A. y Correa, J. 2008. Estrés oxidativo generado por cobre en *Scytosiphon lomentaria* y *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta). *Comp. Biochem Physiol.*, 120C: 50-61.
- Damián, G.; His, E.; Gnassia-Bareli, M.; Quiniou, F. y Romeo, M. 2004. Evaluation of biomarker in oyster larvae in natural and polluted condition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138: 121-128.
- Dang, Z.C.; Berntssen, M.H.G.; Lundebye, A. K; Flik, G.; Wendelaar-Bonga, S.E. y Lock, R.A.C. 2001. Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 53: 91-101.
- Davies, K.J.A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279–289.
- Davis S.R. y Cousins, R.J. 2002. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.*, 130: 1085-1088.
- De Almeida, E.; Dias- Bairy, A.; Dafre, A.; Gomes, O.; Medeiros, M. y Di Mascio, P. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, 318: 21– 30.
- De Almeida, E. A. y Dias-Bairy, A. C. 2006. Effects of aerial exposure on antioxidant defences in the brown mussel *P. perna*. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 49 (2): 225-229.
- De Almeida, E.; Dias, A.; De Melo, A.; Martínez, G.; Miyamoto, S.; Onuki, J.; Fujita, L.; Carriao, C.; Manso, F.; Ronsein, G.; Sigolo, C.; Barbosa, C.; Gracioso, A.; Gennari, M. y Di Mascio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidant, lipid peroxidation and DNA damage. *Rev. Comp. Biochem and Physiol.*, 146: 588-600.
- De Zwaan, A.; Thompson, R.J. y Livingstone, D.R. 1980. Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Biochemistry. *J. Comp. Physiol.*, 137: 105-114.
- De Zwaan, A.; Cortesi, P.; van den Thillart, G.; Brooks, S.; Storey, K.B; Ross, J.; van Lieshout, G.; Cattani, O. y Vitali, G. 1992. Emergency metabolism of bivalves at reduced oxygen tensions. In: Marine Coastal Eutrophication. (Vollenweider, R.A., Marchetti, R. y Viviani, R., Eds). Pág: 1029-1039.
- Di Guilio, R.T.; Benson, W.H.; Sander, B.M. y Vanveld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Rand, G.M. (Ed). Second Edition. Págs. 223-255.
- Eartman R.H.M., Wagenvoort, A.J., Hummel, G. y Smaal, A.C. 1993. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170: 179-195.

- Ellman, G. L. 1959. Quantitative determination of peptides by sulfhydryl (-SH) groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Engel, D.W. y Broewer, M. 1991. Short-term Metallothionein and copper changes in blue crabs at ecdysis. *Biol. Bull.*, 180: 447-452.
- English, T. E. y Storey, K. 2003. Freezing and anoxia induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the gastropod *Littorina littorea*. *Jour. Exp. Biol.*, 206: 2517-2524.
- Fitzpatrick, P.; Krag, R.O.B.; Hojrup, P. y Sheehan, D. 1995. Characterization of a glutathione-S- transferase and relates glutathione binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biochemical Journal.*, 305: 145-150.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.
- Geracitano, L.; Monserrat, J. y Bianchini, A. 2002. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, 227: 145-156.
- Gabbott, P.A. 1976. Energy Metabolism. In: B.L.Bayne ed. *Marine Mussels, Their ecology and Physiology*. Cambridge. Univ. Press. New York. 293-355.
- Gabbott, P.A. 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine mollusc. In: P.W .Hochachka ed. *The Mollusca*. Acad. Press. New York. 162-213.
- Greenway, S. y Storey, K. 2001. Effects of seasonal change and prolonged anoxia on metabolic enzymes of *Littorina littorea*. *Can. J. Zool.*, 79: 907-915.
- Hamer, D. 1986. Metallothioneins. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 913-951.
- Hermes-Lima, M.; Storey, J.M. y Storey K.B., 1998. Antioxidant defences y metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 437-448.
- Hermes-Lima, M. y Zenteno-Savin, T. 2002. Animal response to drastic changer in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133: 537-556.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En: *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Storey K.B (Ed), John Wiley y Sons, Inc. Págs: 319-368.
- Hermes lima, M.; Willmore, W.G. y Storey, K. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts basedon Fe(III) xilenol orange complex formation. *Free Radical. Biol. Med.*, 19: 271-280.
- Hochachka, 1997. Oxygen a key regulatory metabolite in metabolic defense against hipoxia. *Am. Zool.*, 37: 595-603.
- Hochachka, P. W. y Somero, G.N. 2002. *Biochemical Adaptations: Mechanism and process in physiological evolution*. Segunda Edición. Oxford University Press. New york. USA. Pág. 101-123.
- Jemec et al., 2008. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147C: 61-68.
- Kagi, J.H.R. y Shaffer, A. 1988. Biochemistry of metallothioneins. *Perspectives in Biochemistry.*, 27(23): 8509-8515.

- Khoo H.W. y Patel K. H. Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel, *Perna viridis*. *J. Exp. Zool.*, 284 (4) 445–453.
- Krivoruchko, A. y Storey, K. 2010. Mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity. *Oxid. Med. Cell. Long.*, 3: 186-198.
- Kurochkin, I.; Ivanina, A.; Eilers, S.; Downs, C.; May, LA. y Sokolova, I. 2009. Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia y reoxygenation in eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 297(5): 1262- 1272.
- Ladare, K. y Storey, K. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates: Cell and molecular responses to stress. En: *Sensing, signaling and cell adaptation*. Storey, K.B. y Storey J.M (Eds). Vol. 3, Elsevier Press, Amsterdam. Págs 1-24.
- Laurent, C. 2009. Variación estacional de la concentración de metales pesados (Zinc, Cobre, Cadmio, Cromo, Plomo y Níquel) en machos y hembras de *Perna viridis*, en la localidad de Guayacán, Península de Araya Edo. Sucre-Venezuela.
- Livingsstone, D.; Garcia-Martinez, M.; Narbonne, J.; 1990. Oxyradical generation as a pollutant-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Funct. Ecol.*, 4: 415-424.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 42: 656–666.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randal, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lushchak, V.I.; Bahnjukova, T.V. y Storey, K.B. 1998. Effect on hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31 (8): 1059-1067.
- Manduzio, H.; Monsinjon, T.; Galap, C.; Leboulenger, F. y Rocher, B. 2004. Seasonal variations in antioxidant defenses in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/ Zn-superoxide dismutase and glutathione-s-transferase. *Aquat. Toxicol.*, 70: 83-93.
- Martinez-Gil, I. 2011. Estres oxidativo, metabolismo aerobico y anaeróbico en *Perna viridis* (Linnæus, 1758), pre-expuesto a concentraciones subletales de la fracción hidrosoluble de aceite usado de motor de vehículo. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiarum en Biología Marina.
- Muto, N.; Ren W.H; Hwang, G.S; 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. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122 C: 75-82.
- Narváez N., Lodeiros C., Nusetti O., Lemus M. y Maeda-Martinez A.N. 2005. Uptake, depuration and effect of cadmium on the green mussel *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca:Bivalvia). *Ciencias Marinas*, 31 (1A): 91-102.

- Nicholson, S. 2003. Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.
- Niyogi, S.; Biswas, S.; Sarker, S. y Datta, A. 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potencial biomarker of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci. Total. Environ*, 281: 237-246.
- Nusetti, O.; Marcano, L., Zapata-Vivenes, E.; Esclapés, M.; Nusetti, S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil n° 06. *Interciencia*, 29 (6): 324-328.
- Nusetti O. y Zapata E. 2005. Producción de oxiradicales en animales. En: *Fundamentos y técnicas de ecofisiología oxidativa en organismos acuáticos*. Maeda-Martínez, A. (Ed). Editorial Limusa. CYTED & CIBNOR, la Paz, BCS, México (en prensa).
- Nusetti O., Tovar M. y Zapata-Vívenes, E. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subjected to anoxic and aerobic conditions. *J. Shell. Res.*, 29 (1): 203-208.
- Pacifici, R. y Davies, K. 1991. Protein, lipid and ADN repair system in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37: 166-180.
- Pannunzio, T. M. & K. B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 277-292.
- Philips, D. 1985. Organochlorines and trace metals in green-lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong waters: a test of indicator ability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21:251-258.
- Reyes, R. 1999. Las metalotioneínas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia.*, 24: 266-371.
- Rivera, D.; Narboone, J.; Michel, X.; Livingstone, D. y O' Hara, S. 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 177-181.
- Röesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol. (Amst)*, 22: 81-113.
- 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. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 42: 410-415.
- Sadiq, M. 1992. *Toxic metal chemistry in marine environments*. Marcel Dekker. New York, Estados Unidos.
- Sánchez, G. 2008. Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten *Lima scabra* (Born, 1778) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en Biología.

- Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistic in biological reasearch*. Second Edition. W.H. Freeman & Co. New York. 859 pp.
- Sokolova, I.; Ringwood, A. y Johson, C. 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology.*, 74: 218-228.
- Storey K.B. y Storey J.M. 1990. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation, and starvation. *Quart. Rev. Biol.*, 65: 145-174.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29 (12): 1715-1733.
- Storey, K.B. 2004. Adventures in oxygen metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part *Biochem. Mol.Biol.*, 139: 359-369.
- Strickland, J. y Parson, T. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. *Bull. Fish. Res. Board. Canada*, Ottawa., Pág: 310.
- Sukhotin, A.; Abele, D. y Purtner, H. 2002. Growth, metabolism and peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 226: 223-234.
- Thornalley, P. y Vasák, M. 1985. Possible role metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Act.*, 827: 36-44.
- Vallee, B. 1995. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.*, 27: 23-33.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B.; Holwerda, D.A. y Zandee, D.I. 1991. Anoxical survival time and metabolic parameter as stress indice in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 259-265.
- Viarengo, A.; Zannicchi, G.; Moore, M. y Orunesu, M. 1981. Accumulation and detoxification of cooper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam: a study of the subcellular distribution in the digestive glan cell. *Aquac. Toxicol.*, 1: 147-157.
- Viarengo, A. 1989. Heavy metal in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level In: *Reviews in Aquatic. Sciences.*, 44 (1): 69-84.
- Viarengo, A.; Canesi, L.; Pertica, M.; Poli, G.; Moore, M. y Orunesu, M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Comparative Biochemistry and Physiology.*, 97C: 37-42.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F. y Fabbri. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antartic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44 (1): 69-84.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; y Blasco, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.*, 227: 1612-1619.
- Viarengo A.; Burlando, B.; Caratto, N. y Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallotioneins: a comparative overview. *Cell. Mol.Biol.*, 46(2): 407-417.

- Widdows, J. 1985. Physiological responses to pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 16(4): 129-134.
- Winston, G. y Di Giulio, R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.
- Yap, C. K., A. Ismail, F. B. Edward, S. G. Tan & S. S. Sirai. 2006. Use of different soft tissues of *Perna viridis* as biomonitors of bioavailability and contamination by heavy metals (Cd, Cu, Fe, Pb, Ni, and Zn). *Toxicol. Environ. Chem.*, 88:683-695.
- Zapata-Vívenes, E. 2005. Metalotioneínas y enzimas glucolíticas regulatorias en el mejillón verde *Perna viridis* sujeto a estrés oxidativo. Tesis de post- grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Zapata-Vívenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Escaplès, M. y Arredondo, L. 2005. Immunological responses and wound healing in the polychaeta *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomididae) exposed to cooper. *Ciencias Marinas*, 31: 1-9.
- Zapata-Vívenes, E. y O. Nusetti. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shell. Res.* 26 (2): 1–10.
- Zapata-Vívenes, E., Rojas-Astudillo, L., Sánchez, G. y Barreto, M. 2012. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) colectado en costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38(3): 517–528.
- Zapata-Vívenes, E. Nusetti, O., Tovar-Sánchez, M. y Lemus, M. 2013. Metalotioneínas, Defensas Antioxidantes y Tolerancia a la Anoxia en el Mejillón Verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) Bajo Exposición Aguda a Cadmio. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* (in press)

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de la varianza para el contenido de metalotioneínas (μg de MT/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P

Efectos principales					
A: Estado	33081,3	4	8270,32	10603,90	0,0000
B: Tratamientos	21500,1	3	7166,7	9188,87	0,0000
Interacciones					
AB	9218,34	12	768,195	984,95	0,0000
Residuos	93,5919	120	0,779932		

Total (corregido)	63893,3	139			

Apéndice 2. Análisis de la varianza para la concentración de grupos -SH ($\mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P

Efectos principales					
A: Estado	18,8623	4	4,71558	489,13	0,0000
B: Tratamientos	3,41171	3	1,13724	117,96	0,0000
Interacciones					
AB	8,56889	12	0,714074	74,07	0,0000
Residuos	1,15689	120	0,00964077		

Total (corregido)	31,9998	139			

Apéndice 3. Análisis de la varianza para los niveles de malondialdehído (nmoles de TBARS/mg de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
A: Estado	1,281726	4	320429,0	526,50	0,0000
B: Tratamientos	29871,3	3	9957,09	16,36	0,0000
Interacciones					
AB	219787,0	12	18315,6	30,09	0,0000
Residuos	73032,8	120	608,607		

Total (corregido)	1,604416	139			

Apéndice 4. Análisis de la varianza para la concentración de proteínas totales (µg de proteína/gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
A: Estado	14258,4	4	3564,59	561,30	0,0000
B: Tratamientos	2934,05	3	978,016	154,00	0,0000
Interacciones					
AB	17171,5	12	1430,95	225,33	0,0000
Residuos	762,067	120	6,35056		

Total (corregido)	35125,9	139			

Apéndice 5. Análisis de la varianza para el contenido de carbohidratos totales (μg de carbohidratos/ g de muestra) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
A: Estado	34494,2	3	11498,1	3,10	0,0288
B: Tratamiento	180663,0	3	60221,1	16,26	0,0000
Interacciones					
AB	18971,5	10	1231,95	218,09	0,0000
Residuos	492561,0	133	3703,47		
Total (corregido)	707719,0	139			

Apéndice 6. Análisis de la varianza para la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/ g de muestra) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
A: Estado	3,477886	4	869471,0	104,88	0,0000
B: Tratamientos	5,824456	3	1,941486	234,20	0,0000
Interacciones					
AB	1,286146	12	107179,0	12,93	0,0000
Residuos	994792,0	120	8289,93		
Total (corregido)	1,158337	139			

Apéndice 7. Análisis de la varianza para la actividad máxima de catalasa (U/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días y en los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
A: Estado	16344,1	4	4086,02	51,94	0,0000
B: Tratamientos	90558,3	3	30186,1	383,68	0,0000
Interacciones					
AB	77012,6	12	6417,72	81,57	0,0000
Residuos	9440,93	120	78,6744		
Total (corregido)	193356,0	139			

Apéndice 8. Contraste de rango múltiple para el contenido de metalotioneínas (µg de MT/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 µg/l de cadmio, 50 µg/l de cobre y 50 µmol/l H₂O₂ durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
H ₂ O ₂	35	29,743	0,149278	X
Cd	35	39,9519	0,149278	X
Cu	35	58,3518	0,149278	X
Control	35	58,7602	0,149278	X

Apéndice 9. Contraste de rango múltiple para concentración de grupos –SH ($\mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	35	0,26176	0,0165967	X
Cu	35	0,563439	0,0165967	X
Cd	35	0,633621	0,0165967	X
H_2O_2	35	0,647128	0,0165967	X

Apéndice 10. Contraste de rango múltiple para los niveles de malondialdehido (nmoles de TBARS/mg de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	35	92,754	4,16998	X
Cu	35	117,109	4,16998	X
H_2O_2	35	121,264	4,16998	X
Cd	35	132,857	4,16998	X

Apéndice 11. Contraste de rango múltiple para la concentración de proteínas totales (μg de proteína/gmh) de en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a 100 $\mu\text{g/l}$ de cadmio, 50 $\mu\text{g/l}$ de cobre y 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Cd	35	27,6832	0,425963	X
H_2O_2	35	29,2391	0,425963	X X
Cu	35	29,7869	0,425963	X
Control	35	39,3241	0,425963	X

Apéndice 12. Contraste de rango múltiple para el contenido de carbohidratos (μg de carbohidratos/ gmh) de en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Cd	35	42,3792	10,4064	X
H_2O_2	35	93,6023	10,4064	X
Cu	35	103,802	10,4064	X
Control	35	143,12	10,4064	X

Apéndice 13. Contraste de rango múltiple para la actividad máxima de glutathiona-S- transferasa (U/gmh) de en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Cd	35	501,786	15,3901	X
H_2O_2	35	590,0	15,3901	X
Cu	35	909,048	15,3901	X
Control	35	982,33	15,3901	X

Apéndice 14. Contraste de rango múltiple para la actividad máxima de catalasa (U/gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a $100 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $50 \mu\text{g/l}$ de cobre y $50 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 durante 7 días. PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
H_2O_2	35	58,0857	1,49928	X
Cd	35	111,057	1,49928	X
Cu	35	90,9857	1,49928	X
Control	35	125,986	1,49928	X

Apéndice 15. Contraste de rango múltiple para el contenido de metalotioneínas (μg de MT/ gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
RecAnoxia	28	31,202	0,166897	X
RecAnhidro	28	38,9269	0,166897	X
Anoxia	28	35,5334	0,166897	X
Anhidrobiosis	28	54,8983	0,166897	X
Normoxia	28	72,9481	0,166897	X

Apéndice 16. Contraste de rango múltiple para la concentración de grupos -SH ($\mu\text{moles-SH/mg}$ de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
RecAnoxia	28	0,16853	0,0185557	X
Anoxia	28	0,222214	0,0185557	X
Normoxia	28	0,323026	0,0185557	X
RecAnhidro	28	0,823626	0,0185557	X
Anhidrobiosis	28	1,09504	0,0185557	X

Apéndice 17. Contraste de rango múltiple para los niveles de malondialdehído (nmoles de TBARS/mg de proteínas) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
RecAnhidro	28	53,5897	4,66218	X
Normoxia	28	64,3606	4,66218	XX
Anoxia	28	74,1365	4,66218	X
RecAnoxia	28	81,4511	4,66218	X
Anhidrobiosis	28	306,441	4,66218	X

Apéndice 18. Contraste de rango múltiple para la concentración de proteínas totales (μg de proteína/gmh) de en la glándula digestiva *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Anhidrobiosis	28	17,43	0,476241	X
RecAnhidro	28	21,3861	0,476241	X
RecAnoxia	28	36,5954	0,476241	X
Normoxia	28	40,9471	0,476241	X
Anoxia	28	41,1831	0,476241	X

Apéndice 19. Contraste de rango múltiple para el contenido de carbohidratos (μg de carbohidratos/gmh) de en la glándula digestiva *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Anhidrobiosis	28	77,4273	11,5007	X
Normoxia	28	83,6463	11,5007	X
Anoxia	28	107,744	11,5007	X
RecAnhidro	28	114,085	11,5007	X
RecAnoxia	28	110,081	11,5007	X

Apéndice 20. Contraste de rango múltiple para la actividad máxima de glutatona-S- transferasa (U/gmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
RecAnoxia	28	530,283	17,2067	X
RecAnhidro	28	652,158	17,2067	X
Anhidrobiosis	28	718,835	17,2067	X
Anoxia	28	837,054	17,2067	X
Normoxia	28	990,625	17,2067	X

Apéndice 21. Contraste de rango múltiple para la actividad máxima de catalasa (Ugmh) en la glándula digestiva de *P. viridis* expuestos a los diferentes períodos de exposición anoxia (48 horas), anhidrobiosis (24 horas), reoxigenación- anoxia y reoxigenación- anhidrobiosis (3 horas). PR: porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
RecAnhidro	28	80,6786	1,67625	X
Normoxia	28	89,4464	1,67625	X
Anhidrobiosis	28	95,75	1,67625	X
RecAnoxia	28	107,821	1,67625	X
Anoxia	28	108,946	1,67625	X

HOJAS DE METADATOS

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

Título	Defensas antioxidantes en <i>Perna viridis</i> (bivalvia: mitilidae) bajo condiciones de anoxia, anhidrobiosis y reoxigenación, previa exposición a metales pesados
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Sánchez R., Gabriela M.	CVLAC	16 995 621
	e-mail	gabysanchezunico@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Defensas antioxidantes, metales pesados
Anoxia, anhidrobiosis

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	Biología
	Bioquímica
	Ecotoxicología

Resumen (abstract):

Con el objetivo de evaluar los efectos que inducen los metales pesados sobre las respuestas antioxidantes y la tolerancia del mejillón verde *Perna viridis* a la anoxia (ANX) y anhidrobiosis (ANH), se procedió a colocar, en acuarios estáticos, diez organismos a 100 µg de Cd /l, 50 µg Cu/l, 50 µmol/L de H₂O₂ y un grupo sólo en agua de mar, durante una semana. Posteriormente, los organismos pre-expuestos fueron colocados (por separados) en dos condiciones experimentales: (1) agua anóxica por 48 horas, (2) fuera del agua (anhidrobiosis) por 24 horas; para luego (3) colocarlos en acuarios con agua de mar completamente aireada durante 3-5 horas como período de reoxigenación. Se determinó en cada uno de los organismos tratados: el contenido de metalotioneínas (MT), concentración de grupos sulfidrilos (-SH), sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas (PT) y actividad de las enzimas glutatona-S- transferasa (GST) y catalasa (CAT). El consumo de oxígeno (O₂) en el período de anoxia también fue evaluado. Los parámetros evaluados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA doble y para contraste “a posteriori”. Se evidenció un incremento significativo en el contenido de MT durante la exposición a metales y durante el período de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu y a Cd, en el grupo de anoxia y en el de reoxigenación previa anoxia se observó que las MT incrementaron solo con la preexposición a Cu. Se observó una disminución significativa de la MT en los períodos de anoxia y reoxigenación previa anoxia en los organismos preexpuestos a Cd y a H₂O₂. Se evidenció un aumento significativo en la concentración de grupos sulfidrilos durante la exposición en los organismos expuestos a Cu, durante la condición de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos Cu, Cd y a H₂O₂, y en la condición reoxigenación previa anoxia en los organismos preexpuestos a Cu y a H₂O₂. Se observó un incremento significativo en los niveles de TBARS durante la exposición en los organismos expuestos a Cu y Cd, y en la condición de anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu, Cd y H₂O₂; contrariamente se observó una disminución significativa en los niveles de TBARS en la condición de reoxigenación previa anhidrobiosis. La actividad de GST mostró un descenso significativo en todas las condiciones experimentales en los organismos preexpuestos a Cd y H₂O₂. La actividad de CAT mostró un incremento significativo en las condiciones experimentales: anoxia, anhidrobiosis, reoxigenación previa anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cd. Se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima en la condición de anoxia y reoxigenación previa anhidrobiosis en los organismos preexpuestos a Cu y a H₂O₂. En esta investigación se evidenció el efecto que tiene los metales pesados sobre las respuestas bioquímicas en los diferentes cambios de oxigenación.

Palabras claves: defensas antioxidantes, metales pesados, anoxia, anhidrobiosis.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Edgar Zapata	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12 269 219
	e-mail	edzapata2002@yahoo.com
	e-mail	
Raquel Salazar	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	raquelugo@yahoo.com
	e-mail	
Mairin Lemus	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

2013	02	05
------	----	----

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G.SánchezGabriela.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo:

Msc en Biología Aplicada mención Ecotoxicología

Nivel Asociado con el Trabajo: **Msc**

Área de Estudio: Biología Aplicada

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

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



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.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Cunele
JUAN A. BOLANOS CUNELE
Secretario



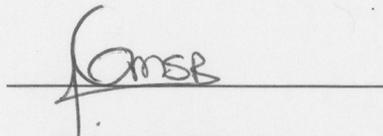
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

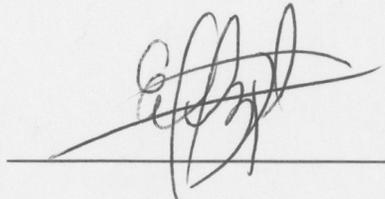
Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

Esta hoja tiene que estar personalizada por el autor (e)s

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Sánchez', is written over a horizontal line.

Gabriela Sánchez

Autor 1

A complex, stylized handwritten signature in black ink is written over a horizontal line.

Prof. Edgar Zapata

Asesor