



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

VARIACIÓN ESTACIONAL DE METALOTIONEINAS EN LA PEPITONA *Arca zebra* (Bivalvia: Arcidae) Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE METALES Y EL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN LA LOCALIDAD DE GUAYACÁN. EDO. SUCRE, VENEZUELA.

(Modalidad: Investigación)

CAROLINA MERCEDES LAURENT SINGH

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

CUMANÁ, 2014

VARIACIÓN ESTACIONAL DE METALOTIONEINAS EN LA PEPITONA *Arca zebra* (Bivalvia: Arcidae) Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE METALES Y EL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN LA LOCALIDAD DE GUAYACÁN, EDO. SUCRE, VENEZUELA.

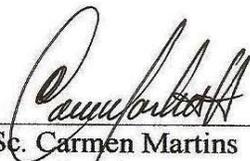
APROBADO POR:



Dra. Mairim Lemus
Asesor



M.Sc. Leida Marcano
Jurado



M.Sc. Carmen Martins
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	6
TEMPERATURA DEL AGUA	7
MEDIDAS MORFOMÉTRICAS E ÍNDICE DE CONDICIÓN	7
TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	7
DETERMINACIÓN DE METALES	7
DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNAS (MTs).....	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
TEMPERATURA DEL AGUA	11
VARIACIÓN ESTACIONAL DEL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN <i>ARCA ZEBRA</i>	12
VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (ZINC, COBRE, CADMIO Y PLOMO) EN <i>ARCA ZEBRA</i>	15
<i>Zinc (Zn)</i>	15
<i>Cobre (Cu)</i>	17
<i>Plomo (Pb)</i>	19
<i>Cadmio (Cd)</i>	20
VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNAS EN <i>ARCA ZEBRA</i>	22

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNAS, METALES Y EL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN <i>ARCA ZEBRA</i>	26
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
APÉNDICES.....	44
HOJA DE METADATOS	45

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, por darnos la vida, por dar luz a nuestro camino, por guiar cada uno de nuestros pasos y proveer la fuerza necesaria para lograr los objetivos propuestos.

A mis padres por brindarme todo su apoyo, dedicación y estímulo por ser ejemplo digno de constancia, seguridad, perseverancia y por haberme inculcado valores.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Mairim Lemus, quien en todo momento brindó su apoyo, conocimiento y guía, haciendo posible el feliz término de este trabajo.

Al Sr. Abel Vásquez por la colaboración prestada en la recolección de las muestras en Isla Caribe.

Al Lic. Frank Guevara por su paciente apoyo técnico y moral brindado durante el procesamiento de las muestras.

A los técnicos Prim, Deudedyth y Henry Astudillo por su valiosa colaboración y ayuda.

A la Dra. Mariolga Berrizbeitia por su paciencia y comprensión por todas las vicisitudes ocurridas a lo largo de la carrera.

A Luz Coronado, la incondicional del postgrado, por su eficiencia, fiel servicio y estar siempre pendiente de todos los estudiantes de ese postgrado.

A mi madre Judith Singh, y hermanos Joanina y Jonathan, por soportarme y apoyarme en este momento.

A todas aquellas personas, que de una u otra forma me guiaron y apoyaron para la elaboración de este trabajo.

Gracias totales

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Longitud de onda y límites de detección del equipo para los metales analizados por espectrofotometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado	8
Tabla 2. Valor certificado y de recuperación para los metales analizados.....	8
Tabla 3. Concentración basal de metalotioneínas en bivalvos de sitios considerados no contaminados	24
Tabla 4. Análisis de correlación entre contenido de metalotioneínas, el índice de condición (IC) y la concentración de metales pesados en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela. (Coeficiente y r2) ..	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la Comunidad de Chacopata donde se muestra la estación de muestreo.....	6
Figura 2. Variación estacional de la temperatura, en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela.....	11
Figura 3. Variación estacional del índice de condición en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=76,51; P<0,05	13
Figura 4. Variación estacional de la concentración de zinc en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=71,34; P<0,05	16
Figura 5. Variación estacional de la concentración de cobre en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=59,28; P<0,05	18
Figura 6. Variación estacional de la concentración de plomo en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=69,46; P<0,05.....	19
Figura 7. Variación estacional de la concentración de cadmio en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=91,0; P<0,05.....	20
Figura 8. Variación estacional de la concentración de metalotioneínas en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=93,43; P<0,05	22
Figura 9. Análisis de componente principal entre contenido de metalotioneínas, el índice de condición (IC) y la concentración de metales pesados en individuos de <i>Arca zebra</i> , recolectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela.	27

RESUMEN

Las metalotioneínas (MTs), son proteínas ubicuas, no enzimáticas, de baja masa molecular y de alto contenido de cisteína. Los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína permiten a las MTs unir metales particulares por lo que son usadas como biomarcador en programas de monitoreo de contaminación, basándose en la premisa de que el aumento de los niveles de MTs se debe principalmente a la exposición metálica. Sin embargo, factores naturales como la temperatura, el índice de condición y el sexo pueden influir en la síntesis de MTs; por lo que en el presente trabajo se evaluó la relación entre las MTs, el índice de condición (IC) y la concentración de metales en organismos del bivalvo *Arca zebra* de la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela. Los niveles de MTs fueron determinados en muestras recolectadas desde enero hasta diciembre 2012, por un método de cuantificación colorimétrica empleando reactivo de Ellman, el IC fue calculado utilizando la ecuación $IC = (Masa\ seca / Masa\ húmeda) * 100$ y los metales fueron evaluados en el tejido blando seco digerido con ácido nítrico a través de espectrofotometría inductivamente acoplado a plasma (ICP). La pepitona *A. zebra* presentó una variación estacional significativa de los valores de MTs, IC y metales. De acuerdo a los valores promedios obtenidos en *A. zebra*, las concentraciones de Zn sobrepasan los valores permisibles para el consumo humano, el cual corresponde a 50 µg/g de masa húmeda según “Brazilian Ministry of Health”, de igual forma el Cd por encima de los valores permisibles (0,1 µg/g) para el consumo humano establecidos por las normas COVENIN. Por otro lado, se observó que las MTs y el IC presentaron una relación positiva significativa, donde los valores más altos fueron durante el mes de agosto de 2012, mientras que por el contrario no se evidenció correlación entre la concentración de metales tóxicos (Pb y Cd) y el nivel de MTs, pero sí con los niveles de Cu, demostrándose que los factores ambientales y fisiológicos deben ser tomados en cuenta a la hora de determinar la fuente inductora de MTs en el organismo.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial ha traído consigo el incremento de sustancias contaminantes de todo tipo (orgánicas e inorgánicas), las cuales en la mayoría de los casos son incorporados a los cuerpos de agua, siendo los ecosistemas costeros uno de los más susceptibles a esta problemática de origen antrópico.

El efecto de los contaminantes sobre la vida marina tiene un amplio rango, que va desde envenenamiento directo a través de la ingesta de contaminantes, hasta la degradación indirecta del hábitat por la contaminación, lo que produce agua de pobre calidad y crea aguas costeras inhabitables por los organismos marinos. La contaminación frecuentemente daña directamente a los organismos retrasando o previniendo el desarrollo reproductivo, o de forma indirecta afectando las poblaciones mediante la reducción del hábitat disponible para su exitosa reproducción; es por ello que la presencia de sustancias tóxicas en el medio puede determinar cambios fisiológicos y bioquímicos en los organismos, con el fin de adaptarse a las condiciones prevalecientes.

La contaminación del medio marino por metales pesados provenientes de fuentes terrestres es un problema que debe ser considerado prioritario (Benedicto *et al.*, 2005), debido a que los metales persisten en los ambientes acuáticos por no ser biodegradables, y sus formas químicas y concentraciones son gobernadas por diferentes procesos, bien sean de orden natural o no, variando la biodisponibilidad de los mismos para los organismos vivos (Pérez-López *et al.*, 2003). Estos agentes químicos, pueden ser elementos esenciales requeridos para el soporte de actividades biológicas y no esenciales con una función biológica no conocida, pero pueden ser tóxicos al estar el organismo expuesto a altas concentraciones. El efecto negativo es evidente, no solo por el decrecimiento de la diversidad de especies acuáticas, sino por la exposición directa de seres humanos a estos xenobióticos a través de la cadena alimentaria, con un potencial peligro a la salud humana (Andersen *et al.*, 1996; Pérez-López *et al.*, 2003).

Para determinar contaminación por metales pesados, algunos invertebrados marinos son útiles biomonitores, por lo que muchos estudios han sido dirigidos a determinar la concentración de metales en estos organismos (Pérez-López *et al.*, 2003),

pero más allá de establecer la incorporación de metales se ha hecho necesario evaluar la condición fisiológica y los mecanismos implicados en la toxicidad de elementos metálicos; por lo que en la actualidad la sociedad científica ha dirigido sus esfuerzos en estudiar moléculas involucradas en diferentes procesos biológicos que han sido señaladas como biomarcadores y están correlacionadas con contaminación ambiental por metales pesados (Ryvolova *et al.*, 2011).

Un biomarcador, es una variación bioquímica, celular, fisiológica o de comportamiento que puede ser medida en tejido, muestras de fluidos corporales o a nivel de todo el organismo que provee evidencia de exposición y/o efectos de uno o más contaminantes químicos (y/o radiaciones). En este sentido, las metalotioneínas (MTs), son consideradas un biomarcador para contaminación ambiental por metales. Éstas son proteínas no enzimáticas, de baja masa molecular (2 a 16 kDa), alto contenido de cisteína, aminoácidos no aromáticos y estabilidad térmica. Los grupos tiol (SH) de los residuos de cisteína permiten a las metalotioneínas unir metales esenciales (Como Zn, Cu, Se) y xenobióticos (Como Cd, Hg, Ag, As) (Amiard *et al.*, 2006). Otros metales que compartan características estequiométricas con el Cu y Zn pueden ser también unidos por las MTs (Templeton y Cherian, 1991). Estas proteínas usualmente no se encuentran saturadas por un solo metal, sino que contienen varios átomos de Cu, Zn, Cd, o cuando están presentes Hg y Ag (Amiard *et al.*, 2006; Amiard y Cosson, 1997). Las MTs han sido reportadas en muchos vertebrados (Roeva *et al.*, 1999; Olsson *et al.*, 1998) e invertebrados acuáticos principalmente moluscos (Isani *et al.*, 2000; Langston *et al.*, 1998).

Las MTs presentan elementos altamente conservados y predictivos en la mayoría de los filos, esto junto con su ubicuidad, lleva a la conclusión de que estas proteínas juegan un rol esencial en procesos vitales (Amiard *et al.*, 2006). Entre las funciones biológicas adjudicada a las MTs, dada su participación en la acumulación de metales ha llevado a muchos autores a asociar tolerancia a los metales con inducción de MTs y a concluir que estas proteínas están probablemente involucradas en procesos de detoxificación de metales no esenciales y exceso de esenciales, reduciendo la unión no específica de metales dentro de las células, y así limitando su potencial tóxico, por lo

que tienen un importante rol en la homeostasis y prevención de toxicidad de metales pesados (Egli *et al.*, 2006). También pueden actuar como un reservorio no tóxico de metales esenciales (Cu y Zn), disponible para abastecer las demandas enzimáticas y metabólicas del organismo (Amiard *et al.*, 2006).

Las metalotoneínas también parecieran tener otros roles, incluyendo protección en contra de la radiación ionizante (Cai *et al.*, 1999) y defensa antioxidante (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2002). Así, los organismos pre-expuestos a metales como el cadmio resisten mejor el stress oxidativo, como resultado de la inducción de metalotoneínas, las cuales parecen limitar los efectos de los radicales hidroxilo (OH) y superóxido (O₂⁻) barriéndolos. Además se ha establecido que un incremento en la concentración de MTs puede ser relacionado con un decrecimiento de la sensibilidad de un organismo a el exceso de metales (Pavicic *et al.*, 1994). Algunos autores han notado que en una misma especie, las poblaciones que viven en un medio contaminado por metales tiene mayor concentración de MTs (Ross *et al.*, 2002).

En definitiva, es generalmente aceptado que las MTs son una importante defensa frente a la detoxificación de metales no esenciales (Cd y Hg). La inducción temprana de MTs por metales, como el cadmio, en diferentes especies (anélidos, moluscos, crustáceos, peces, etc.) hace de estas proteínas un potencial biomarcador de exposición a metales útil para evaluar la importancia ecotoxicológica de metales no esenciales (Cd, Hg) y esenciales (Cu), pero potencialmente tóxicos. Las MTs son ahora parte de un conjunto de biomarcadores reconocidos a nivel Europeo y es empleado en el marco del Aseguramiento de la Calidad de los Efectos Biológicos en los Programas de Monitoreo (siglas en ingles BEQUALM) (Mathiessen, 2000),

Los moluscos marinos, son un grupo de gran importancia ecológica entre los invertebrados acuáticos, que pueden acumular metales traza en órdenes de magnitud superiores que las concentraciones presentes en el medio. Es por esto, que los moluscos han sido ampliamente usados como indicadores de contaminación por metales en ecosistemas marinos (Amiard *et al.*, 2006; Alhama *et al.*, 2006 e Isani *et al.*, 2000). Además metales pesados como el Cd, Cu y Hg, se han asumido como buenos inductores de biosíntesis de MTs. En este respecto, la MT es considerada un válido biomarcador de

exposición a metales en moluscos marinos; por lo que se concluye que la MT puede ser un útil biomarcador para contaminación ambiental por metales en organismos de vida libre, aun cuando varios factores ambientales y fisiológicos pueden afectar la expresión de la proteína en poblaciones naturales (Knapen, *et al.*, 2007).

La presencia de MTs en moluscos marinos fue propuesta primeramente en ostras y mejillones durante los años 70, sin embargo la MT en mejillones y ostras fue completamente purificada y secuenciada mucho después. Desde los primeros estudios era evidente que la purificación de MTs de moluscos era mucho más difícil que las de mamíferos. MTs de mejillones están caracterizadas por la presencia de una forma monomérica y una forma dimérica. Varios parámetros fisiológicos y bioquímicos pueden influir en la concentración y aislamiento de MTs de tejidos de molusco (Isani *et al.*, 2000).

La mayoría de los estudios que señalan a las metalotioneínas como buen biomarcador de exposición a metales, han sido realizados en condiciones controladas de laboratorio. Mientras que por otro lado, los estudios de campo son escasos, pero sus resultados ponen en duda el uso de niveles de MTs como biomarcador, ya que se ha evidenciado que factores naturales pueden influir en la síntesis de metalotioneínas (Cosson, 2000; Isani *et al.*, 2000), como las citoquinas, hormonas de stress (Bremner, 1991; Cousins, 1985) el sexo (Olsson, 1998) y la temperatura (Carpené *et al.*, 1992), y esto debe ser tomado en cuenta antes de sacar conclusiones; es por ello que la determinación estacional de estas proteínas es relevante a la hora de determinar la fuente inductora en el organismo. Por otro lado, el índice de condición o cantidad relativa de carne en los bivalvos, según Cruz y Villalobos (1993), ha sido utilizado para estimar el valor del organismo para su explotación y consumo, siendo por lo general proporcional a la talla. Además, permite conocer cómo responde internamente el organismo ante las variaciones ambientales. Este índice ha sido asociado intrínsecamente a la reproducción, ciclos de utilización y almacenamiento de energía y extrínsecamente está influenciado por la disponibilidad de alimento y temperatura (Acosta *et al.*, 2006), por lo cual tiene sentido investigar si existe alguna relación entre este índice y los niveles de metalotioneínas en los organismos. Sin embargo, en bivalvos se conocen pocos estudios

de campo sobre la variación de metalotioneínas en relación al índice de condición, entre ellos destaca Lemus *et al.* (2013) y Rojas (2012), quienes evidenciaron que las MTs del mejillón *Perna viridis* presentaron variación dependiendo del estado reproductivo y el índice de condición (IC); mientras que en mamíferos un estudio en peces hembras de *Salmo trutta* arrojaron que los niveles de cobre y zinc varían con el estado reproductivo del pez.

La pepitona, *Arca zebra*, es el bivalvo más importante en el nororiente de Venezuela, y constituye el segundo rubro en cuanto a volumen de pesca para la pesquería artesanal del estado Sucre, después de la sardina, siendo el soporte fundamental de pueblos que dependen exclusivamente de esa actividad (Prieto *et al.*, 2001; Jiménez, 1999;). La especie, que pertenece a la familia Arcidae, se distribuye desde la costa del Golfo de México y sur de Florida hasta el norte de Brasil, pero es en Venezuela que forma bancos de importancia comercial (Prieto *et al.*, 2001). En Venezuela se ha empleado exitosamente este bivalvo como biomonitor de metales pesados (Lanza *et al.*, 2011; Acagua, 2008) y se conocen datos sobre su crecimiento (Prieto y Saint-Aubyn 1998), índice de condición y producción secundaria (Lista *et al.*, 2008 y 2006; Prieto *et al.*, 2001), sin embargo, hasta el momento no existen estudios que relacionen metalotioneínas, con niveles de metales pesados y/o el índice de condición (IC).

En vista de lo anterior, el objetivo del presente estudio de campo fue el de evaluar como la variación estacional afecta la concentración de metalotioneínas en la pepitona *A. zebra* y su correlación con el índice de condición y los valores de metales pesados presentes en dicho bivalvo recolectado en la localidad de Guayacán. Edo. Sucre, Venezuela, con el fin de establecer respuestas a las perturbaciones antrópicas y su variación según las condiciones del medio.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron colectadas mensualmente durante un año (2012), en la costa norte de la Península de Araya, específicamente en isla Caribe (10°41'30" Lat. N 63°50'37" Long.), de la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela (Figura 1).

La extracción de los ejemplares de *Arca zebra* con talla adulta (> 50 mm) (Prieto, *et al.*, 2001) se realizó por buceo libre a una profundidad entre 2 a 5 m, luego se colocaron en bolsas plásticas y enseguida en una cava con hielo, para ser trasladados al Laboratorio de Ecofisiología y Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV), donde se almacenaron a -4°C hasta su procesamiento.

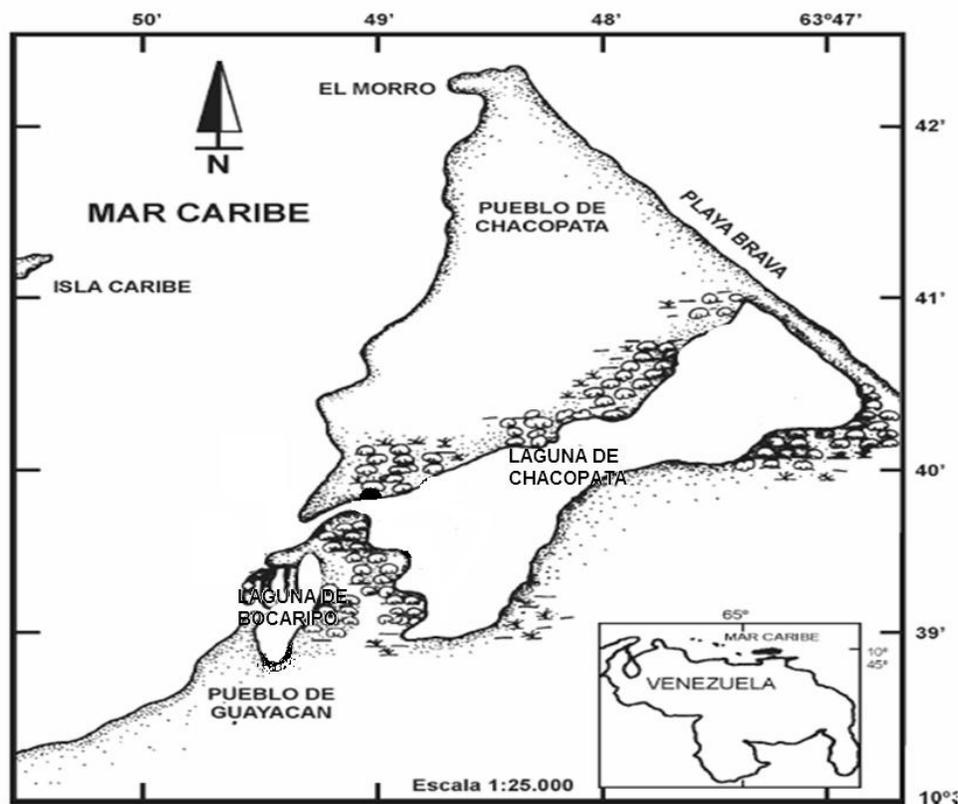


Figura 1. Mapa de la Comunidad de Chacopata donde se muestra la estación de muestreo

TEMPERATURA DEL AGUA

Para la caracterización climática de la zona se consideró la temperatura, la cual fue suministrada por el Servicio Meteorológico de la Fundación la Salle, estación Punta de Piedra.

MEDIDAS MORFOMÉTRICAS E ÍNDICE DE CONDICIÓN

En el laboratorio se tomó un grupo de 15 organismos por mes al azar y cada uno se limpió cuidadosamente de adherencias en la concha y fueron lavados varias veces con agua desionizada para evitar posibles contaminantes externos. Se determinó la longitud de la concha (desde la charnela hasta el borde ventral) con un vernier digital Mytutoyo de 0,01 mm de apreciación. Los ejemplares fueron desbullados con una paleta de plástico, se eliminó su biso, y se colocaron en una balanza analítica Denver, modelo TR204 de 0,001 g de apreciación para determinar masa húmeda y posteriormente masa seca.

El índice de condición (IC) fue determinado empleando la ecuación propuesta por Hickman e Illingworth (1980): $IC = (Masa\ seca / Masa\ húmeda) * 100$.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se prepararon extractos crudos del tejido blando de cada organismo, picando todo el organismo con una tijera quirúrgica hasta formar una masa homogénea, y 1 g del tejido picado se homogenizó con 3 ml de buffer Tris-HCl (10mmol l-1, pH 8,6; 10mM 2-mercaptoethanol y PMSF) usando un homogeneizador Polytron modelo Brinkmann, para determinación de metalotioneínas, mientras que el resto del tejido blando se utilizó para la determinación de metales.

DETERMINACIÓN DE METALES

El tejido blando obtenido se secó en un horno de secado eléctrico Felisa a 60°C por 72 horas. Luego las muestras secas se pesaron para prontamente ser digeridas en 5 ml de ácido nítrico (HNO₃) por 48 horas. Seguidamente se colocaron en baño María a 60°C por 1 hora. Posteriormente, se filtraron en papel Whatman No. 42 y aforadas hasta

25 ml con agua desionizada. Las soluciones fueron analizadas en un espectrómetro de emisión óptica inductivamente acoplado a un plasma (ICP-OES), marca Perkin Elmer, modelo Óptima 5300 DV, cuyas especificaciones se indican en la tabla 1. Las concentraciones de cada metal fueron expresadas como $\mu\text{g/g}$ de masa húmeda.

Tabla 1. Longitud de onda y límites de detección del equipo para los metales analizados por espectrofotometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado

Metal	Longitud de onda (nm)	Límites de detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Zinc	213,9	0,1-1
Cobre	324,7	0,1-1
Cadmio	228,8	<0,1
Plomo	283,3	1-10

Para realizar las curvas de calibración se usaron estándares de Zn, Cu, Cd y Pb y se validó el método a través de estándar de referencia de tejido desarrollado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnologías (NIST) en Canadá, Oyster Tissue 1566_a; que es un material de referencia estandarizado usado en la instrumentación, calibración y validación metodológica para los análisis químicos elementales en bivalvos marinos (SRM) 1566_a Oyster Tissues NIST. La recuperación del método para todos los metales, no presentó diferencias significativas con los valores certificados por lo que el *t*s para todos los metales fue estadísticamente no significativa ($P < 0,05$) (tabla 2).

Tabla 2. Valor certificado y de recuperación para los metales analizados.

Metal	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps)	Recuperación (%)
Zinc	$83,02 \pm 57,00$	118,14
Cobre	$66,30 \pm 4,33$	102,71
Cadmio	$4,15 \pm 0,38$	105,06
Plomo	$0,37 \pm 0,01$	110,61

DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNAS (MTs)

El contenido de las metalotioneínas (MT) fue determinado en 1 ml de homogeneizado de tejido blando usando el método espectrofotométrico, planteado por Viarengo *et al.* (1997). El homogeneizado fue centrifugado a 4 000 rpm por 30 minutos a 0-4°C, para separar el sobrenadante (fracción citosólica).

A cada mililitro de sobrenadante le fue añadido 1,05 ml de etanol más 80 µl de cloroformo en frío (-20°C), para por una parte eliminar los tioles solubles de bajo peso molecular, los cuales al reaccionar con el DTNB podrían interferir con la cuantificación de MTs, garantizando la purificación parcial y la concentración de MTs. Luego fue centrifugado a 4 000 rpm por 10 minutos, a 0-4°C. El sobrenadante fue combinado con 0,5 mg de ARN, como coprecipitante para incrementar el porcentaje de recuperación de MTs, 40 µl de HCl 37% y 5 ml de etanol absoluto frío, la acidificación desestabiliza las MTs incrementando su precipitación. La solución extraída fue mantenida a - 20°C por una hora y centrifugadas nuevamente a 4 000 rpm por 10 minutos. El precipitado que contiene la fracción de MT fue lavado con etanol 87%, cloroformo 1% y buffer de homogeneización, posteriormente, fue centrifugado a 4 000 rpm por 10 minutos. El precipitado fue secado al aire libre y luego resuspendido en 150 µl de NaCl a 0,25 M y 150 µl de HCl 1 N que contenía 4 mmol de EDTA. Luego se le añadió una solución preparada con 4,2 ml de NaCl 2 M, que contiene 0,43 M de ácido ditionitrobenzoico (DTNB) en buffer Na-fosfato 0,2 M a pH 8, a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue centrifugada por 5 minutos a 3 000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para determinar la absorbancia a 412 nm (Ellman, 1958).

La concentración de grupos -SH (sulfhidrilos) fue estimada utilizando la curva patrón de glutatión reducido (GSH) con concentraciones de 0; 5; 10; 20 y 30 µmol/mL. Para obtener las concentraciones de MTs se consideró que 1 mmol GSH = 0,055 mmol/L de MTs y serán expresadas en µg de MTs/g mh (Gruber y Valle, 2000).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron comparaciones mensuales de los niveles de MTs, metales pesados, e índice de condición para lo cual se utilizó el análisis de Kruskal Wallis, y para

observar las diferencias significativas se graficó usando caja y bigotes. Se aplicó un análisis de correlación y componente principal para determinar si existía asociación entre el índice de condición, los metales y las MTs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TEMPERATURA DEL AGUA

Para la zona norte del estado Sucre se describen procesos físicoquímicos que determinan estacionalidad en los sistemas costeros, en la figura 2 se puede observar las variaciones de temperatura mostrando un patrón que permite establecer dos períodos: uno conformado por los meses de enero, febrero, marzo y diciembre donde se evidenció bajas temperaturas, característico de los focos de surgencia; y un segundo período constituido por los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre, observándose un incremento en la temperatura, condiciones particulares del período de baja surgencia, y donde el resto de los meses comprenden etapas de transición entre una época y otra.

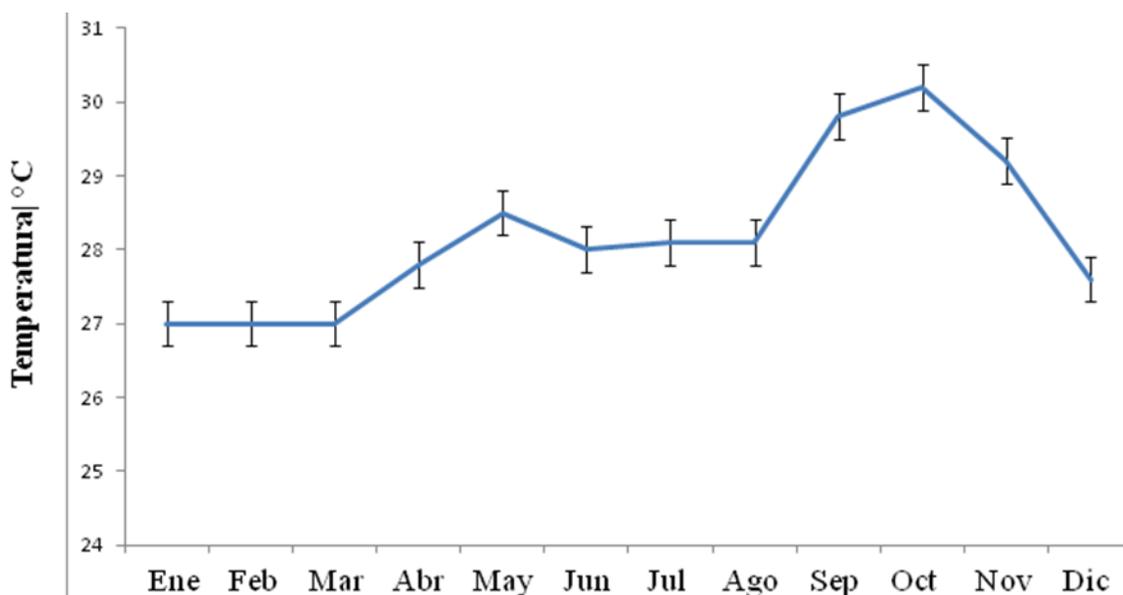


Figura 2. Variación estacional de la temperatura, en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela.

La surgencia es un fenómeno oceanográfico caracterizado por el ascenso vertical de aguas profundas en reemplazo de aguas superficiales, desplazadas horizontalmente principalmente por la acción de los vientos alisios, que soplan paralelos a la costa. Las zonas de surgencia se caracterizan por presentar una temperatura superficial del mar (TSM) más fría, mayor concentración de nutrientes y clorofila, respecto a las aguas de los alrededores, lo cual las convierte en zonas altamente productivas. En el sur del

Caribe se han descrito varios focos de surgencia, muchos de los cuales se encuentran situados en la costa norte de Venezuela (Arteaga, 2009; Torres y Ruiz, 2003).

La costas del estado Sucre, se describen por lo general como aguas cálidas durante la temporada de lluvia (junio a noviembre) y con disminuciones de la salinidad por la influencia que ejercen las descargas de los ríos vecinos; mientras que por el contrario, éstas aguas lucen temperaturas más bajas y salinas en sequía (diciembre a mayo), producto de los característicos eventos de surgencia (Castañeda, 2006).

El patrón para la temperatura en este estudio durante los meses de enero, febrero, marzo y diciembre del 2012, son característicos de la surgencia costera que se presenta en esta zona. En los meses de baja surgencia se observa el proceso a la inversa, las temperaturas suben y la baja de nutrientes conlleva a la disminución del fitoplancton y materia orgánica. Arrieche *et al.*, (2002), observó en el Morro de Guarapo, Venezuela, que el período de más baja concentración fitoplanctónica fue el mes de agosto, debido a la estratificación característica del agua en la región. Las variaciones en estos factores ambientales pueden afectar la acumulación de metales, bien sea incrementando o disminuyendo las formas químicas biodisponibles para los organismos, o incidiendo en la tasa de incorporación de metales, influyendo así sobre las concentraciones de MTs, debido a que éstas están probablemente involucradas en procesos de detoxificación de metales (Amiard *et al.*, 2006).

VARIACIÓN ESTACIONAL DEL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN *Arca zebra*

El índice de condición (IC) en *Arca zebra*, en la figura 3 muestra diferencias significativas durante los meses muestreados, observándose el mayor valor promedio de IC durante el mes de agosto ($23,87 \pm 1,30$) y el menor valor promedio se observó durante los meses de noviembre ($17,17 \pm 1,91$) y septiembre ($17,47 \pm 1,47$) de 2012, coincidiendo todas estas variaciones con los meses de mayor temperatura en la zona de estudio. Durante los primeros seis meses del año, la presencia del período de surgencia, caracterizado por bajas temperaturas y altas concentraciones de fitoplancton, comprenden una etapa de engorde e incremento del tejido gonadal para *A. zebra* debido a la disponibilidad de alimento, ya para agosto los organismos maduros alcanzan su

mayor IC y debido al incremento de la temperatura del agua liberan los gametos al medio produciéndose una baja en el IC como se observa en el mes de septiembre.

Al respecto Nakal y Prieto (1984) comentan, que existe una estrecha relación entre el IC, la producción secundaria y el ciclo reproductivo de *A. zebra*. Durante la época de mayor producción primaria ésta especie genera tejido reproductivo a una alta tasa alcanzando la maduración total en los últimos meses del primer semestre del año, donde ocurre un primer desove de importancia. La disminución del IC coincide con los períodos de baja producción secundaria en el Golfo de Cariaco, ya que los organismos de mayor tamaño generan relativamente más cantidad de tejido reproductivo que los jóvenes (Pérez, 1980). Por otro lado, el ciclo gametogénico de *A. zebra* también se relaciona con cambios estacionales en la temperatura (Lista *et al.*, 2008 y 2006); las altas temperaturas características de la época de no surgencia inciden en el incremento del IC y viceversa como se observa en este trabajo.

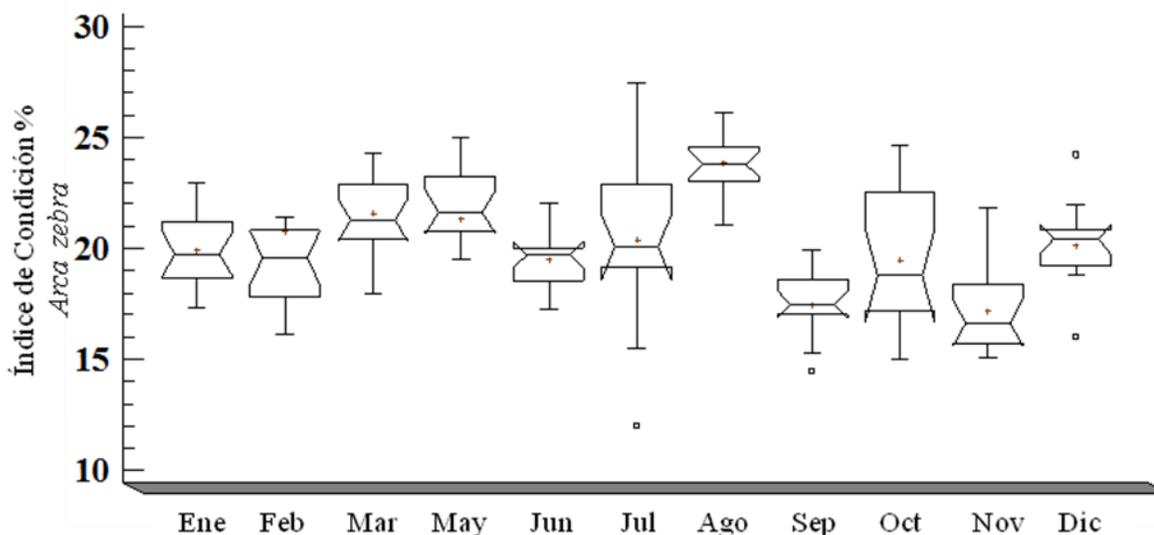


Figura 3. Variación estacional del índice de condición en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=76,51; P<0,05

Al igual que en este trabajo, Prieto *et al.*, (2001) detectaron diferencias mensuales significativas del IC en individuos de *A. zebra* colectados en el Golfo de Cariaco, Venezuela, y presentaron valores mínimos entre septiembre de 1984 a febrero de 1985 y máximos de marzo de 1985 a agosto de 1985. Por otro lado, Lista *et al.*, 2008,

también encontraron variación estacional en el IC para la misma especie en la Península de Araya, Venezuela, obteniendo valores altos desde junio 2002 hasta septiembre 2002, en noviembre 2002 y junio 2003 y los más bajos en octubre 2002, febrero y mayo 2003, existiendo en estos meses el mayor número de organismos maduros y desovados, respectivamente, pero no halló sincronía en la madurez y desove entre machos y hembras.

Arrieche *et al.*, (2002) en el mejillón *Perna perna* del Morro de Guarapo, Venezuela, encontró que el IC presentó diferencias significativas entre meses, sexos, intervalos de longitud, y estados de maduración sexual, registrándose la condición más baja en los individuos en fase de regresión gonadal, seguido del estadio en fase de desove. El IC de *P. perna* presentó una alta variabilidad en los diversos estadios de madurez sexual, sugiriendo que los individuos estarían sometidos a cambios fisiológicos durante todo el año, por efecto de la reproducción y los factores ambientales (Arrieche *et al.*, 2002). Por otro lado, Prieto *et al.*, (1999), halló los máximos valores de IC en el mejillón de fondo *Modiolus squamosus* en los meses de abril, agosto de 1990 y marzo de 1991; mientras que las disminuciones del índice estuvieron relacionadas principalmente con el desove, debido a que los órganos sexuales en los mejillones representan una alta proporción de las partes blandas; por lo que los cambios bruscos observados en su investigación son causados por la formación y pérdida de gametos por desove, o por reabsorción de los mismos. Acosta *et al.*, (2006), evidenció que el IC de *P. perna* y *P. viridis* fue correlativo a los periodos de madurez y desove de cada uno de los mejillones.

En las especies comerciales *Anadara tuberculosa* en Costa Rica (Cruz, 1982) y *Crassostrea columbiensis* en Colombia (Caballero-Cruz *et al.*, 1996) las oscilaciones de los IC estuvieron relacionados con la formación y pérdida de gametos. Mora (1985) y Lista *et al.* (2008), establecieron una etapa de pérdida de masa para *A. zebra* durante el mes de mayo y dos etapas de engorde, una durante el mes de junio y otra entre enero y abril. Por otro lado, Prieto *et al.* (2001) determinaron en la pepitona una etapa de pérdida de masa desde agosto hasta enero y una etapa de engorde desde febrero hasta julio; mientras que en el presente trabajo se observó un incremento en el IC durante el mes de agosto y un descenso en septiembre y noviembre. Bautista, (1989) y Ruiz *et al.* (1998)

indican que las diferencias entre meses de engorde y de pérdida de masa de una misma especie se deben a las estrategias reproductivas como respuesta a la expresión de los factores ambientales.

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (zinc, cobre, cadmio y plomo) EN *Arca zebra*

Las concentraciones promedio de los metales Zn, Cu, Cd y Pb, en muestras de tejido seco de *A. zebra*, mostraron diferencias significativas durante los meses muestreados, las mismas pueden ser explicadas por la presencia del fenómeno de surgencia en el área Nororiental de nuestro país, y por la variación durante estos meses del ciclo reproductivo de la especie estudiada.

Zinc (Zn)

La variación estacional de la concentración de Zn, presentó diferencias significativas (KW=71,34; $p < 0,05$). Al usar el gráfico de caja y bigotes, se observan 7 grupos los cuales serán mencionados en orden decreciente: el primero formado por mayo ($57,46 \pm 20,30$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y septiembre ($53,99 \pm 10,38$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el segundo por octubre ($41,52 \pm 10,67$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y noviembre ($38,38 \pm 14,62$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el tercero por junio ($36,95 \pm 15,10$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el cuarto por enero ($34,82 \pm 6,15$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), julio ($33,29 \pm 4,67$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y agosto ($34,40 \pm 15,95$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el quinto por diciembre ($28,57 \pm 4,66$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el sexto por febrero ($28,26 \pm 8,42$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y el último por marzo ($24,17 \pm 7,53$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) (Figura 4).

Uno de los picos más alto de Zn fue observado durante el mes de septiembre 2012 coincidiendo posiblemente con el período de desove. El Zn es un metal esencial para los organismos, ya que tiene distintas funciones en el organismo (catalíticas, estructurales y de regulación), por esa razón podría encontrarse en altas concentraciones en *A. zebra* durante el mes de septiembre que abarca la época reproductiva (Lista *et al.*, 2006) y de regeneración de tejido gonadal de la especie. Según Laurent (2009), el mejillón verde *Perna viridis* en la localidad de Guayacán, Venezuela presenta los

mayores niveles de Zn durante el período de desove, ya que éste es necesario para el crecimiento y desarrollo de los organismos, generando una mayor demanda del mismo durante este período. El incremento de la temperatura y la disminución de la biomasa fitoplanctónica, son variables que ponen en marcha el proceso de desove de *P. viridis* (Sreenivassan *et al.*, 1989), de igual forma en este trabajo durante el mes de septiembre el incremento de la temperatura y la posible baja en la disponibilidad de alimento impulsaría a *A. zebra* a liberar sus gametos al medio, necesitando mayores niveles de Zn para el crecimiento y regeneración de tejido gonadal, coincidiendo con períodos de baja producción secundaria. Acagua (2008) en individuos de *A. zebra* recolectados en la localidad de Guayacán, Venezuela encontró la mayor concentración promedio de Zn (44,88 µg/g masa seca) en el mes de agosto 2006 de igual forma asociando este valor con la demanda de este metal por parte del organismo durante el período reproductivo.

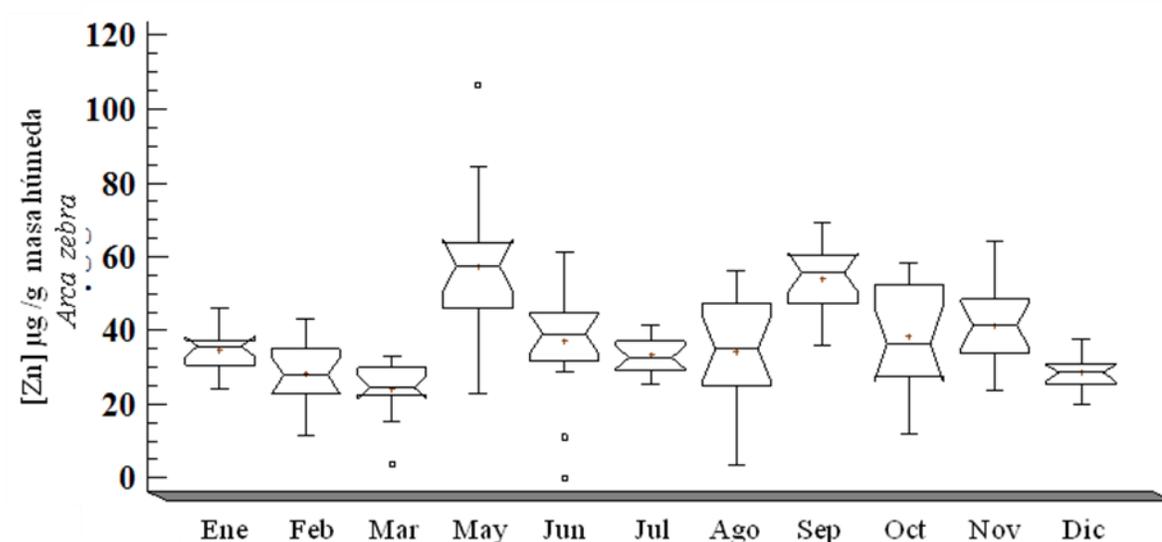


Figura 4. Variación estacional de la concentración de zinc en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=71,34; P<0,05

Por otro lado, los mayores niveles de Zn coinciden con los menores valores de IC, al respecto Acagua (2008) durante su estudio evidenció que la concentración de Cd, Cu y Zn tienen una relación inversa con la talla de *A. zebra*, donde los organismos de tallas pequeñas contienen una mayor concentración de metales que los organismos de

tallas mayores; tal correlación puede atribuirse al efecto de dilución debido al descenso de la masa del cuerpo (Raspor *et al.*, 2004).

Durante el mes de mayo también se observó un alto nivel de Zn, en dicho mes se cree que se genera una alza en la biomasa fitoplanctónica producto de la surgencia característica del primer semestre del año, traduciéndose en mayor disponibilidad de alimento. Hay que destacar que la principal fuente de captación de este elemento en bivalvos es a través de la alimentación, donde Ke y Wang (2001) mostraron que la incorporación de Zn a través de la alimentación en *Crassostrea rivularis* y *Saccostrea glomerata*, contribuye a más del 50% de la acumulación de este metal.

De acuerdo a los valores promedios obtenidos en *A. zebra*, las concentraciones de Zn en mayo y septiembre sobrepasan los valores permisibles para el consumo humano, el cual corresponde a 50 µg/g de masa húmeda según la Brazilian Ministry of Health (1975).

Cobre (Cu)

Durante los meses muestreados se encontraron diferencias significativas (KW=58,28; $p < 0,05$), formándose 7 grupos: el primero representado por el mes de octubre ($0,94 \pm 0,56$ µg/g masa húmeda), el segundo por el mes de julio ($0,66 \pm 0,23$ µg/g masa húmeda), el tercero por marzo ($0,59 \pm 0,21$ µg/g masa húmeda) y septiembre ($0,61 \pm 0,17$ µg/g masa húmeda), el cuarto por mayo ($0,52 \pm 0,14$ µg/g masa húmeda) y agosto ($0,56 \pm 0,31$ µg/g masa húmeda), el quinto grupo conformado por los meses de enero ($0,48 \pm 0,11$ µg/g masa seca) y junio ($0,49 \pm 0,19$ µg/g masa húmeda), el sexto por noviembre ($0,40 \pm 0,10$ µg/g masa húmeda), y los menores valores en febrero ($0,32 \pm 0,08$ µg/g masa húmeda), y diciembre ($0,33 \pm 0,07$ µg/g masa húmeda). (Figura 5).

El cobre es un elemento esencial del metabolismo y está ampliamente distribuido en todos los continentes y forma parte de la mayoría de los organismos vivos. Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica. Entre otros usos de este metal se encuentra la fabricación de cañerías para el agua, material para techumbres, baterías de cocina, equipos químicos y farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre (Manahan, 2007).

Los moluscos tienen mecanismos biológicos para regular el Cu en sus tejidos (homeostasis) ya que es usado en el grupo funcional hemo de la hemocianina, pigmento respiratorio de los animales (Zorrilla, 2003), por lo que durante la época reproductiva de *A. zebra* requiere de este elemento en elevadas concentraciones (Lista *et al.*, 2006).

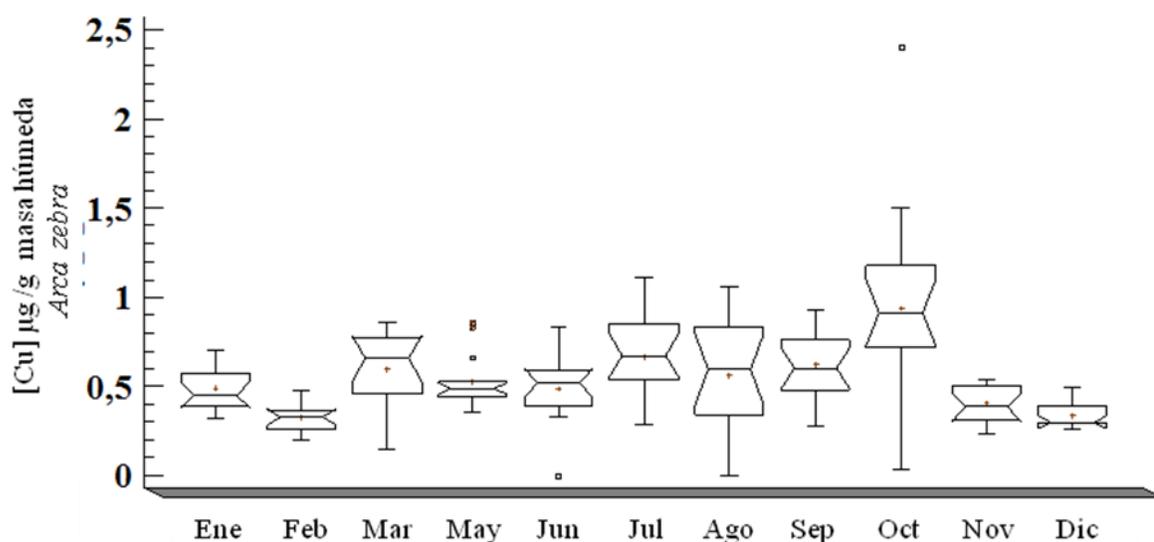


Figura 5. Variación estacional de la concentración de cobre en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=59,28; P<0,05

Se observó un solapamiento significativo de los grupos determinados por la prueba a *posteriori*, debido quizás a la asincronización de ciclo reproductivo de la especie, encontrándose individuos con diferentes estados de madurez sexual durante todos los meses (Lista *et al.*, 2008). Los moluscos bivalvos en zonas tropicales se caracterizan por presentar desoves prolongados y procesos gametogénicos continuos (Báez *et al.*, 2005); por lo que no existe homogeneidad en la manifestación de los diferentes estados gametogénicos y es usual encontrar folículos con diferentes estados de maduración y desove en un mismo individuo (Nakal, 1979), que también caracteriza otras especies como *C. rhizophorae* (Vélez, 1975), *P. imbricata* (Marcano, 1984) y *Perna viridis* (Marcano, 2004), lo que podría explicar el patrón de solapamiento en las concentraciones de Cu.

Lanza *et al.* (2011), halló valores en *A. zebra* de 1,801 $\mu\text{g/g}$ y Acagua (2008) encontró la máxima concentración de Cu de 3,35 $\mu\text{g/g}$ masa seca; por otro lado Rodríguez (2010) en *Tivela mactroides* de la playa Caicara en el edo. Anzoátegui observó valores de hasta 29,44 $\mu\text{g/g}$; Laurent (2009) encontró valores de 3,66 $\mu\text{g/g}$ en *P. viridis*; el límite permisible por las normas COVENIN (1994) es de 10 $\mu\text{g/g}$ de masa húmeda, todos estos valores muy por encima de la máxima concentración encontrada en este trabajo de 0,94 $\mu\text{g/g}$ masa húmeda.

Plomo (Pb)

El plomo presentó diferencias significativas (KW=69,46; $p < 0,05$) durante los diferentes meses formándose 2 grupos: el primero conformado por los meses de marzo, mayo, julio, septiembre y octubre con valores entre 0,07 y 0,10 $\mu\text{g/g}$ masa húmeda que es donde se evidencia la máxima concentración de plomo y un segundo grupo comprendido por los meses de enero, febrero, junio, agosto, noviembre y diciembre con valores entre 0,005 y 0,02 $\mu\text{g/g}$ masa húmeda (Figura 6).

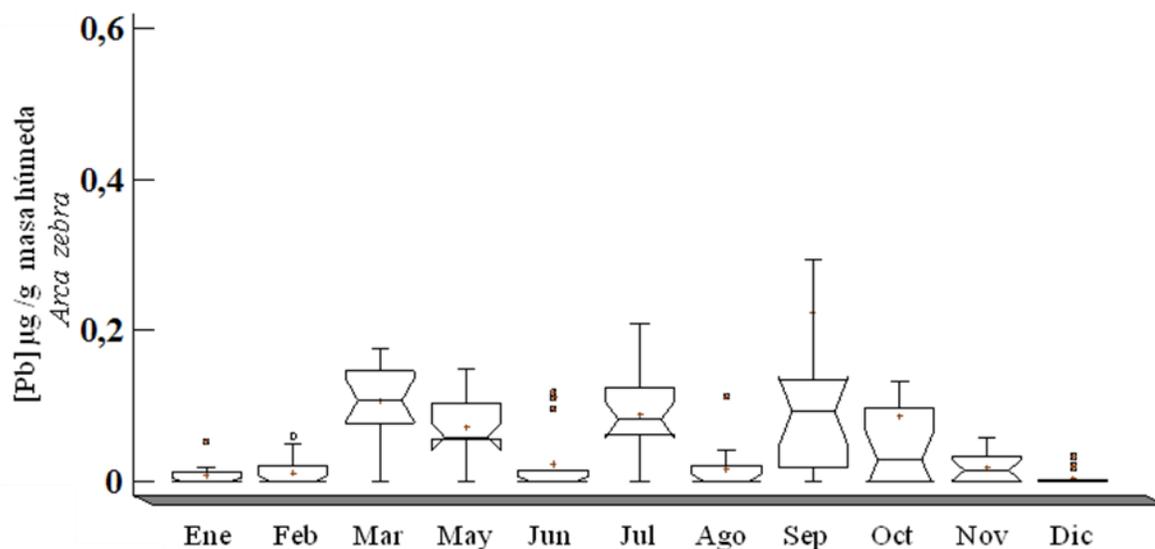


Figura 6. Variación estacional de la concentración de plomo en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=69,46; $P < 0,05$

El plomo es un metal no esencial, por lo que no presenta ninguna función metabólica en los organismos y es considerado uno de los mayores contaminantes

ambientales (Acagua, 2008). La distribución de Pb en los océanos está frecuentemente asociada a deposición atmosférica o a descargas urbanas. (Besada *et al.*, 2008). Por lo que su concentración en organismos marinos está directamente ligada a actividades humanas. Chiu *et al.*, (2000) sugieren que el transporte marítimo puede llevar al plomo a aumentar su biodisponibilidad en aguas costeras.

Segura (2006) encontró en especies como *A. zebra* valores de Pb que van desde 5,74 a 6,20 $\mu\text{g/g}$; en *T. mactroides* se encontraron concentraciones de 4,08-4,28 $\mu\text{g/g}$; en *P. viridis* valores desde 2,20-3,52 $\mu\text{g/g}$ y en *Donax spp* concentraciones de 8,87 $\mu\text{g/g}$. Acagua (2008) encontró valores máximos de 0,94 $\mu\text{g/g}$ y Laurent (2009) en *P. viridis* encontró valores máximos de 1,53 $\mu\text{g/g}$. Los valores de plomo encontrados en *A. zebra* en este trabajo no sobrepasan los límites permisibles para el consumo humano el cual según las normas COVENIN (1994) es de 2 $\mu\text{g/g}$.

Cadmio (Cd)

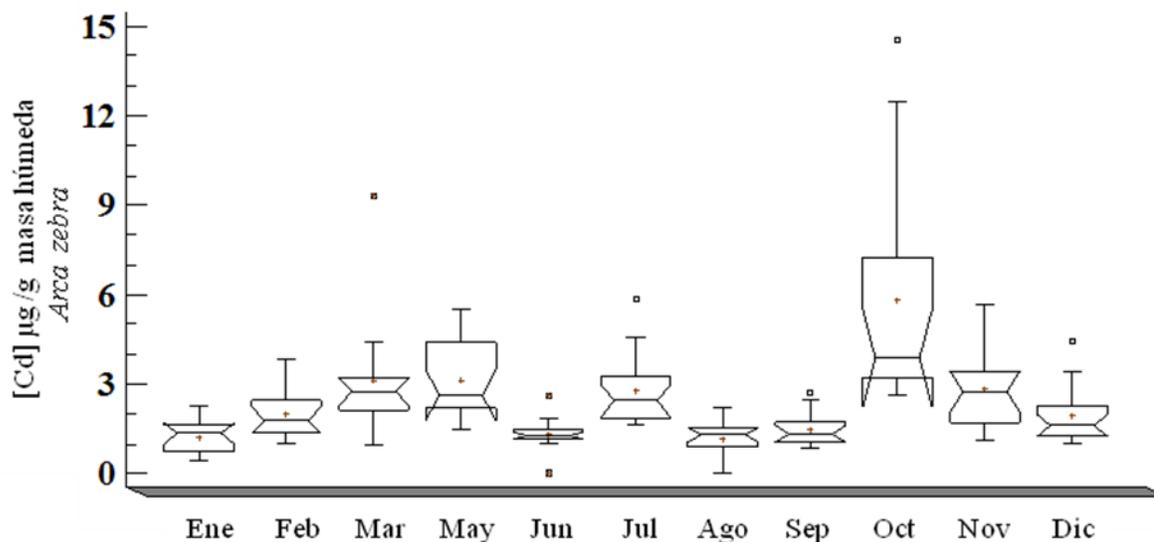


Figura 7. Variación estacional de la concentración de cadmio en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=91,0; P<0,05

En la evaluación del contenido de Cd en ejemplares de *A. zebra* se evidenciaron diferencias significativas (KW=91,0 $p < 0,05$) durante los meses estudiados obteniéndose 5 grupos: el primero representado por el mes de octubre que es donde se evidencia la

máxima concentración de cadmio ($5,80 \pm 3,91 \mu\text{g/g}$ masa húmeda), el segundo por los meses de marzo ($3,12 \pm 1,90 \mu\text{g/g}$ masa húmeda) y mayo ($3,13 \pm 1,20 \mu\text{g/g}$ masa húmeda), el tercero por julio ($2,77 \pm 1,18 \mu\text{g/g}$ masa húmeda) y noviembre ($2,84 \pm 1,30 \mu\text{g/g}$ masa húmeda), el cuarto por diciembre ($1,96 \pm 0,98 \mu\text{g/g}$ masa húmeda) y febrero ($1,98 \pm 0,83 \mu\text{g/g}$ masa húmeda) y los valores más bajos se encontraron en el resto de los meses analizados, con valores comprendidos entre $1,16 \pm 0,57$ y $1,47 \pm 0,53 \mu\text{g/g}$ masa húmeda (Figura 7).

Metales de transición como el Cd son encontrados en el ambiente marino como iones libres, también en una variedad de compuestos como partículas en suspensión y sedimentos. Hay dos principales rutas de exposición de metales para organismos marinos. Los iones metálicos disueltos en el ambiente acuático son absorbidos a través de las branquias (Alvarado *et al.*, 2006), mientras que los metales unidos a partículas sólidas son ingeridas, separadas de su partícula transportadora en el sistema digestivo y absorbidas (Berntssen *et al.*, 2001).

Los mayores niveles de Cd se observan durante los meses de menor temperatura (enero, febrero, marzo, abril y mayo), característico del período de surgencia en la zona, debido a que el Cd muestra un patrón biogeoquímico muy similar al de los nutrientes, particularmente al de los fosfatos, y por lo tanto parece ser controlado por el ciclo de la materia orgánica presente en la columna de agua (Acosta y Lodeiros 2004). Esta característica hace que las aguas de surgencia enriquecidas, constituyan la principal fuente de este elemento para los organismos expuestos (Acosta y Lodeiros 2004). Segovia y Zavala *et al.* (2003) mostraron que los mejillones son excelentes biomonitores de surgencia porque sus concentraciones de Cd están correlacionados al índice de surgencia Vakun. Por lo que se dice que niveles altos de Cd en mejillones pueden ser debido a la cercanía de la surgencia en períodos de muestreo y no a descargas antropogénicas. Un fenómeno similar ha sido reportado en la costa noreste de Galicia (Besada *et al.*, 2011); en la costa noreste de baja California, México (Gutiérrez – Galindo y Muñoz – Barbosa, 2003); la costa atlántica Marroquí (Chafik *et al.*, 2001) y la costa Mauritana (Roméo *et al.*, 2000).

Los valores de cadmio encontrados en *A. zebra* están por encima de los valores

permisibles (0,1 $\mu\text{g/g}$) para el consumo humano (COVENIN, 1994). Sin embargo los valores presentados para esta especie no son superiores a los señalados para otros bivalvos de la región nor-oriental, tal es el caso de *P. viridis* y *C.virginica* que presentaron concentraciones entre 0,53 y 0,12 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente (Rojas *et al.*, 2002). Segura (2006) determinó Cd en varias especies de camarones y bivalvos (obtenidos de mercados) donde se encuentra *A. zebra* con valores de 0,33 $\mu\text{g/g}$.

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNAS EN *Arca zebra*

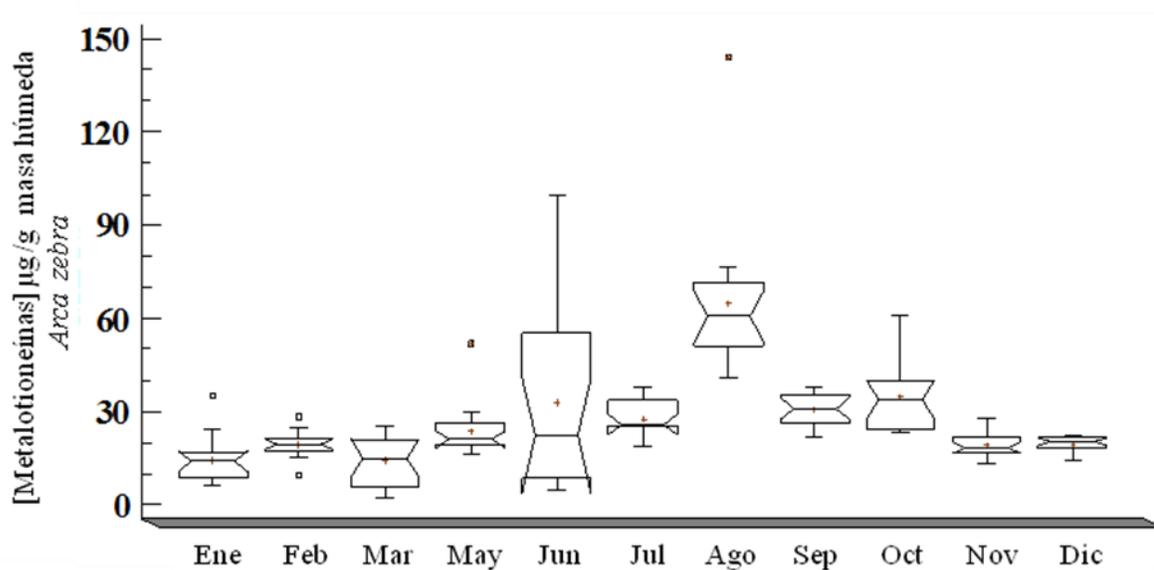


Figura 8. Variación estacional de la concentración de metalotioneínas en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, edo. Sucre, Venezuela. KW=93,43; P<0,05

Como se observa en la figura 8, los niveles de metalotioneínas (MTs) en muestras de tejido de *A. zebra*, mostraron diferencias significativas (KW=93,43; P<0,05) durante los meses muestreados. Se observan 7 grupos los cuales serán mencionados en orden decreciente: En el primer grupo se observa el mayor valor de MT durante el mes de agosto ($64,98 \pm 24,25$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) coincidiendo con el pico más alto obtenido para IC, el segundo grupo conformado por el mes de octubre ($34,58 \pm 10,05$ $\mu\text{g/g}$ masa

húmeda), el tercero consta de los meses de junio ($32,96 \pm 31,61$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y septiembre ($30,80 \pm 5,36$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el cuarto por julio ($27,51 \pm 6,17$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el quinto por mayo ($23,69 \pm 8,67$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), el sexto por febrero ($19,31 \pm 4,30$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), noviembre ($19,05 \pm 3,62$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), y diciembre ($19,56 \pm 2,57$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda), y los menores valores durante los meses de enero ($14,60 \pm 7,47$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) y marzo ($14,26 \pm 7,62$ $\mu\text{g/g}$ masa húmeda) 2012.

En el presente estudio se evidenció un incremento en los niveles de metalotioneínas desde junio a octubre, coincidiendo con el período reproductivo de la especie, y de mayor temperatura, donde se observa concentraciones variables de diferentes metales, resaltando los bajos niveles de cadmio durante el mes de agosto y el más alto de zinc en septiembre. Hylland *et al.* (1998) indica que el uso de las MTs en el monitoreo de contaminación está basado en la premisa de que el aumento de sus niveles se debe principalmente a la exposición metálica. El mecanismo de detoxificación metálica de estas metaloproteínas se produce a través de la activación transcripcional de los genes MT, iniciada por la presencia de iones metálicos (Hogstrand y Haux, 1991). Aunque en condiciones normales, sólo cobre y zinc parecen estar asociados con las MT (Nielson *et al.*, 1985). Pero, estudios en el pez *Platichthys flesus* demostraron que el 50-60% de la variabilidad total de metalotioneínas podría también ser explicada por factores relacionados con la estacionalidad, el sexo y el estado de maduración. De hecho, Benedicto *et al.* (2005) demostraron que los niveles de MTs en el pez *Mullus barbatus* aumentan considerablemente en el período de prepuesta, pudiendo estar asociados a un influjo de Zn en relación con la vitelogénesis; explicando los altos valores del IC y MTs en *A. zebra* durante el mes de agosto.

En la tabla 3 se muestra los niveles basales de metalotioneínas en bivalvos muestreados en zonas consideradas no contaminadas, donde las concentraciones en las diferentes especies están relativamente homogéneas, evidenciando diferencias entre órganos en todas las especies siendo la concentración de MTs mayor en la glándula digestiva antes que en las branquias. Basado en la premisa de que las MTs son inducidas por metales, se espera que los tejidos con la mayor concentración de metal acumulado tengan la mayor concentración de MTs. Las ostras tienen la habilidad de almacenar

metales a concentraciones mayores que los mejillones (Beliaeff *et al.*, 1998), y los estudios llevados a cabo en el mejillón *M. edulis* y la ostra *C. gigas* en una zona no contaminada y otra rica en metales pesados corrobora este hecho. Sin embargo, la concentración de metales en branquias y glándula digestiva en ambas especies estaba en el mismo orden de magnitud, mientras que la concentración de MTs era mayor en glándula digestiva, esta diferencia entre órganos no puede ser explicada por diferencias en la concentración de metales (Amiard *et al.*, 2006).

Tabla 3. Concentración basal de metalotioneínas en bivalvos de sitios considerados no contaminados

Especie	Tejido	Concentración ($\mu\text{g/g}$ ms ó mh)	Referencia
<i>Cerastoderma edule</i>	Todo el organismo	4,55 ms	Bebianno y Langston (1989)
<i>Chlamys opercularis</i>	Glándula digestiva	3,6 mh	Bustamante (1998)
<i>Chlamys varia</i>	Glándula digestiva	3,5 mh	Bustamante (1998)
<i>Corbicula fluminea</i>	Todo el organismo	0,25-0,5 mh	Rainglet (1998)
	Todo el organismo	0,1 mh	Amiard-Triquet <i>et al.</i> (1998a)
<i>Crassostrea gigas</i>	Glándula digestiva	5-7 ms	Imber <i>et al.</i> (1987)
		0,7-1,6 mh	Geffard <i>et al.</i> (2001)
	Branquias	0,12-0,30 mh	Geffard <i>et al.</i> (2002a)
<i>Donax vittatus</i>	Todo el organismo	6,37 ms	Bebianno y Langston (1989)
		0,98 \pm 0,11 ms	Bordin <i>et al.</i> (1994)
		3,40 \pm 1,58 ms	Bordin <i>et al.</i> (1997)
<i>Macoma balthica</i>	Todo el organismo	2,3 ms	Amiard-Triquet <i>et al.</i> (1998b)
		3-5 ms	Hummel <i>et al.</i> (2001)
		2,43 ms	Bebianno y Langston (1989)
	Todo el organismo	2,75 \pm 0,99 ms	Bebianno y Langston (1991)
<i>Mytilus edulis</i>		0,5 \pm 0,6 mh	Amiard-Triquet <i>et al.</i> (1998a)
	Glándula digestiva	1,5-3,0 mh	Amiard <i>et al.</i> (1998)

		8,04 ms	Bebianno y Langston (1989)
		8 ms	Bebianno y Langston (1991)
		8,8 ms	Amiard-Triquet <i>et al.</i> (1998b)
		0,3 mh	Amiard <i>et al.</i> (1998)
	Branquias	2,2 ms	Bebianno y Langston (1991)
		1,6-1,8 ms	Amiard-Triquet <i>et al.</i> (1998b)
		3,9-13 ms	Bebianno y Machado (1997)
	Todo el organismo	0,85-1,25 mh	Raspor <i>et al.</i> (1999)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		2,81±0,66 ms	Bebianno y Langston (1992)
		5,73±0,99 mh	Mourgaud <i>et al.</i> (2002)
	Glándula digestiva	2,85-4,23 mh	Raspor <i>et al.</i> (1999)
		2,1 mh	Pavicic <i>et al.</i> (1993)
	Branquias	0,45-0,64 mh	Raspor <i>et al.</i> (1999)
	Branquias	1,25 ms	Langston <i>et al.</i> (1998)
<i>Ostrea edulis</i>	Tejido blando restante	1,48 ms	Langston <i>et al.</i> (1998)
	Todo el organismo	4,29-6,34 ms	Bebianno y Langston (1989)
	Todo el organismo	2,05±0,41 ms	Bebianno <i>et al.</i> (1993)
<i>Ruditapes decussatus</i>		3,40 mh	Hamza-Chaffai <i>et al.</i> (1999)
	Gándula digestiva	4,7 ms	Bebianno <i>et al.</i> (1993)
<i>Tridacna crocea</i>	Branquias	1,97	Bebianno <i>et al.</i> (1993)

Ms: masa seca; mh: masa húmeda

Fuente: Amiard *et al.*, 2006, modificado por Laurent, 2014.

Rodríguez (2010) en la glándula digestiva de *Tivela mactroides* encontró el menor y mayor valor de MTs en agosto 2007 (40,36 µg/g masa húmeda) y julio 2008 (64,47 µg/g masa húmeda) respectivamente, mientras que en este estudio la

concentración promedio de MT más alta fue de 64,98 $\mu\text{g/g}$ de masa húmeda, valores no muy diferentes entre ambas especies, pero si significativamente elevados a los presentados en la tabla 3 para sitios no contaminados.

RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNAS, METALES Y EL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN *Arca zebra*

En la tabla 4 se muestra el análisis de correlación entre contenido de metalotioneínas, el índice de condición (IC) y la concentración de metales pesados en individuos de *Arca zebra*. En la misma se puede apreciar que el Zn presenta una relación significativa con el Cd, el Cu y el IC, mientras que el Cd está relacionado con el Cu, pero la concentración de metalotioneínas no evidenció relación con ningún metal tóxico (Pb y Cd), aunque que si una dependencia significativa con el IC y el Cu.

Tabla 4. Análisis de correlación entre contenido de metalotioneínas, el índice de condición (IC) y la concentración de metales pesados en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela. (Coeficiente y r^2)

	Zn $\mu\text{g/g mh}$	Pb $\mu\text{g/g mh}$	Cd $\mu\text{g/g mh}$	Cu $\mu\text{g/g mh}$	IC%
Zn $\mu\text{g/g mh}$	-	-	-	-	-0,2763 *0,0003
Pb $\mu\text{g/g mh}$	0,1078	-	-	-	0,0340
	0,1681	-	-	-	0,6642
Cd $\mu\text{g/g mh}$	0,1811	0,0838	-	-	-0,0388
	*0,0199	0,2847	-	-	0,6206
Cu $\mu\text{g/g mh}$	0,3485	0,1305	0,2867	-	0,2316
	*0,0000	0,0948	*0,0002	-	*0,0028
MTs $\mu\text{g/g mh}$	0,1159	-0,0336	0,0117	0,1635	0,2300
	0,1382	0,6688	0,8816	*0,0358	*0,0030

mh: masa húmeda; *Correlación significativa

El Zn y el Cd poseen características químicas similares, ambos son metales de transición ubicados en el grupo 13 de la tabla periódica y poseen un gran poder reductor, ambos metales se encuentran en el agua en el estado de oxidación +2 y experimentan frecuentemente procesos geoquímicos juntos, por lo que las propiedades del Zn son análogas a las del Cd, aumentando las propiedades tóxicas de este último, ya que puede reemplazar al zinc en algunas enzimas, alterando su estructura y dañando su actividad

catalítica (Manahan, 2007). El cadmio siempre aparece asociado al zinc en la corteza terrestre y se obtiene como subproducto en la minería y extracción del zinc, además acompaña siempre como contaminante al zinc y a sus productos (Castillo, 2005); mientras que el cobre al igual que el zinc, es esencial para el metabolismo de los organismos ya que participa en los procesos de transporte de electrones y como cofactor de diversas enzimas, por lo que no es de extrañar que estos metales muestren una relación significativa (Scelzo, 1997).

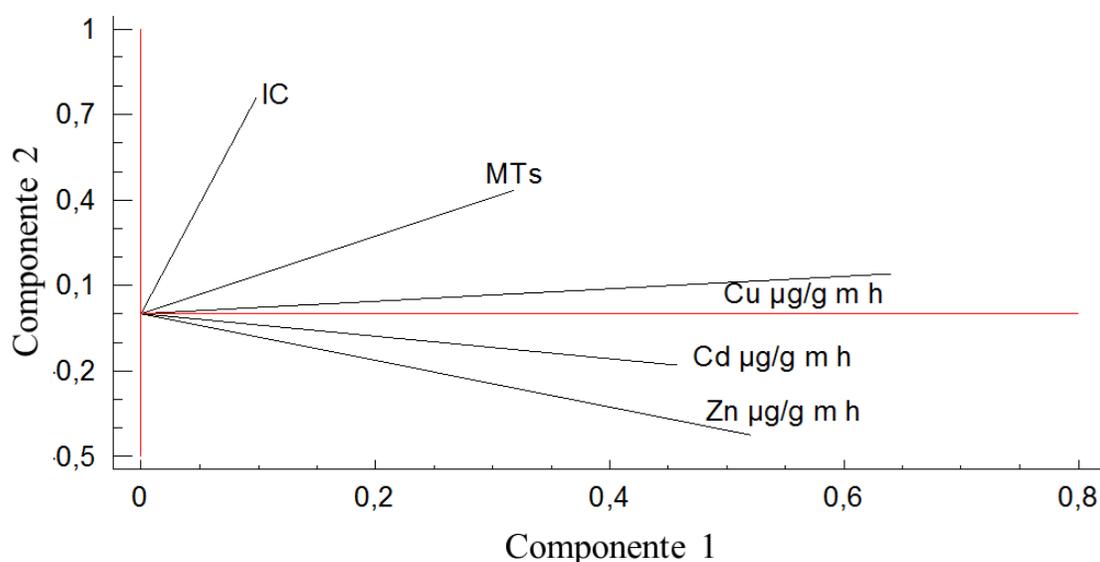


Figura 9. Análisis de componente principal entre contenido de metalotioneínas, el índice de condición (IC) y la concentración de metales pesados en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela.

Por otro lado, contrario a la hipótesis general que el Cd induce la síntesis de MTs, en este estudio no se evidenció la relación entre los niveles de MTs y las concentraciones de metales pesados obtenidas en este trabajo (figura 9), pero si una relación entre el IC con las MTs y entre los metales Cu, Cd y Zn. Varias publicaciones han demostrado la ausencia de inducción de MTs en invertebrados expuestos a metales como el Cd, e incluso un descenso de la concentración de MTs luego de exposición a metal (Amiard *et al.*, 2006). En este trabajo, durante el mes de agosto 2012 se notó el mayor IC y nivel de MTs, pero la menor concentración de Cd el cual es conocido como

un inductor por excelencia de las síntesis de MTs en diferentes especies. En lugares donde metales están presentes a altas concentraciones y biodisponibles, algunas especies de peces no han mostrado incremento en la concentración de MTs (Bervoets y Blust, 2003).

En invertebrados, existen dos mecanismos de detoxificación involucrando ligandos intracelulares: compuestos que enlazan metales incluyendo las metalotioninas y la biomineralización (Marigomez *et al.*, 2002). Dependiendo de la especie, la relevancia de estos dos mecanismos de detoxificación varía considerablemente. Por ejemplo, el poliqueto *Hediste diversicolor* almacena de forma insoluble más del 90% del Cu en su cuerpo cuando está expuesto a alta biodisponibilidad de este elemento en el medio (Berthet *et al.*, 2003). Sólo una fracción citosólica de metales se encuentra unido a metalotioneínas, y el porcentaje de unión varía por cada elemento y de acuerdo al sitio de origen de los especímenes. La participación limitada o insignificante de las metalotioneínas en la unión de metales ha sido reportado para varios bivalvos como *Scrobicularia plana*, *Anodonta cygnea* y *Unio elongatulus*. En la vieira *Pecten maximus*, MTs acomplejan solo el 15% del Cd citosólico. En la ostra *O. edulis* MT solo tiene un rol menor en la captación de Cd, Cu y Zn en sitios altamente contaminados (Langston *et al.*, 1998).

Debido a que las MTs están probablemente involucradas en procesos de detoxificación, es importante comparar poblaciones expuestas crónicamente a metales y poblaciones que viven en sitios considerados no contaminados (Amiard *et al.*, 2006). El oligoqueto *Limnodrilus hoffmeisteri* resistente al Cd, habita en el Río Hudson (New York, USA) contaminado con metales (Cd, Cr, Ni) y produce proteínas similares a las metalotioneínas, al igual que gránulos ricos en metales para el almacenamiento y detoxificación (degradación lisosomal de productos de Cd-MT) de Cd, mientras que gusanos no resistentes al Cd solo producen MT (Wallace *et al.*, 1998).

Por ejemplo, las ostras, *C. gigas* acumulan más Cd que *O. edulis* y las proteínas que enlazan metales son diferentes (Frazier y George, 1983). La fisiología de acumulación de metales trazas difiere grandemente entre mejillones y ostras (Rainbow, 1993), es por esto que es de esperar que los factores naturales y los factores de

contaminación que afectan la concentración de MTs no sea la misma en cada especie. Tres especies de bivalvos (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *R. decussatus*) fueron expuestos a la misma concentración de Cd por el mismo período de tiempo (Bebianno y Langston, 1991 y 1992; Bebianno *et al.*, 1993). Una relación lineal fue observada entre las concentraciones de Cd y concentraciones de metalotioneína, el incremento fue más alto en ambas especies de mejillones que en *R. decussatus*. Similarmente Bebianno y Serafim (1998) demostraron que el mejillón *M. galloprovincialis* presenta una mayor concentración de MTs en presencia de Cd que la almeja *R. decussatus*.

Los cangrejos *Carcinus maenas* y *Pachygrapsus marmoratus* son abundantes en el estuario Gironde (Francia) rico en metales. Ambas especies fueron muestreadas en 3 localidades a lo largo de un gradiente de salinidad (Legras *et al.*, 2000). La concentración de MTs y metales (Cd, Cu, Zn) fueron analizadas en hepatopáncreas y branquias. Análisis de regresión fueron aplicados para determinar cuál parámetro fue el más importante en el control de la concentración de MTs a través de factores naturales (salinidad, sexo, estacionalidad, concentración total de proteínas) y factores de contaminación. De acuerdo con los resultados de Pedersen *et al.*, (1997), la concentración de metales acumulado en *C. maenas*, fue el mayor factor estadísticamente relacionado a la concentración de MTs. Sin embargo, en *P. marmoratus* la concentración de MT fue principalmente influenciada por factores ambientales, de hecho los niveles de MTs se han asociado a cambios en el metabolismo general de proteínas que se ven alteradas por diferentes salinidades más que a concentraciones de metales acumulados. Es posible que *P. marmoratus* pueda tener adaptaciones fisiológicas más marcadas a baja salinidad que *C. maenas*, con incremento de los efectos sobre el metabolismo de proteínas. Es de esperar que un cangrejo intermareal con una distribución más hacia el sur y una temperatura del agua más cálida (como *P. marmoratus*) puede experimentar un mayor rango de variables físicas incluyendo salinidad y temperatura que un cangrejo de ambiente templado como *C. maenas* y adaptarse apropiadamente (Legras *et al.*, 2000); esto podría explicar la relación significativa existente entre el IC y los niveles de MTs en la pepitona *A. zebra*, por lo que los últimos estudios indican que la inducción de MTs debería ser considerada

como una respuesta de estrés general, particularmente sensible a los metales pesados (Amiard *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2000), por lo que a la hora de emplear a las MTs como biomarcador de contaminación por metales, es necesario tomar en cuenta parámetros fisiológicos del organismo y ambientales.

CONCLUSIONES

En las muestras recolectadas de *Arca zebra* de la localidad de Guayacán, Venezuela, se evidenció variación estacional de la concentración de metalotioneínas, metales y los valores del índice de condición.

Se determinó que en *Arca zebra* la síntesis de metalotioneínas está asociada primordialmente a aspectos fisiológicos como es el caso del índice de condición, y éste a su vez está influenciado por factores ambientales, particularmente la temperatura.

Los valores promedio de Zn y Cd mostraron valores por encima de los permisibles para el consumo humano según BFL y COVENIN respectivamente.

RECOMENDACIONES

La literatura consultada presenta muchas contradicciones con respecto a la inducción de MTs. El proceso que genera estas inconsistencias necesita ser entendido al igual como la relativa influencia de factores naturales (sexo, índice de condición, índice gonadosomático) y de contaminación en orden de validar el uso de MTs como biomarcadores. Muchos factores, influyen en los valores de MTs, limitando la posibilidad de usar la concentración de MT como un biomarcador de exposición a metales, por lo que se recomienda se realicen estudios de laboratorio, exponiendo los organismos a diferentes concentraciones de Cd, Zn y Cu, y donde se determinen variables intrínsecas como el sexo, el índice de condición y gonadosomático, y se controlen variables extrínsecas como la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y disponibilidad de alimento, en orden de determinar la influencia de éstos en los niveles de MTs y considerar si existen otras moléculas quelantes que predominan sobre las MTs en los procesos de detoxificación.

BIBLIOGRAFÍA

- Acagua, A. 2008. *Variación estacional de Cu, Cd, Cr, Pb, Ni y Zn en Arca zebra (Mollusca: Bivalvia) de la Isla Caribe, estado Sucre, Venezuela*. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Acosta, V. y Lodeiros, C. 2004. Metales pesados en la almeja *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en localidades costeras con diferentes grados de contaminación en Venezuela. *Cienc. Mar.*, 30(2):323-33
- Acosta, V.; Prieto, A. y Lodeiros, C. 2006. Índice de condición de los mejillones *Perna perna* y *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) bajo un sistema suspendido de cultivo en la ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Zootec. Trop.*, 24(2):177-192.
- Alhama, J.; Romero-Ruiz, A.; López-Barea, J. 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *J. Chromatogr. A.* 1107:52-58.
- Alvarado, N.; Quesada, I.; Hylland, K.; Marigomez, I. y Soto, M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills in turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquat. Toxicol.*, 77: 64–77.
- Amiard, J.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aqua. Toxicol.* 76(2):160-202.
- Amiard, J. y Cosson, R. 1997. *Les métallothionéines*. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux. Masson, Paris, pp. 53-66.
- Amiard, J.; Geffard, A.; Amiard-Triquet, C. 1998. La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organs. *J. Rech. Océanogr.*, 23(1):25-30.
- Amiard-Triquet, C.; Altman, S.; Amiard, J.; Ballan-Dufrançais, C.; Baumard, P.; Budzinski, H.; Crouzet, C.; Garrigues, P.; His, E.; Jeantet, A.; Menasria, R.; Mora, P.; Mouneyrac, C.; Narbonne, J.; Pavillon, J. 1998a. Fate and effects of

- micropollutants in the Gironde estuary. France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiol.* 373/374:259-279.
- Amiard-Triquet, C.; Rainglet, F.; Larroux, C.; Regoli, F.; Hummel, H. 1998b. Metallothionein in Arctic bivalves. *Ecotox. Environ. Saf.*, 41:96-102.
- Andersen, V.; Maage, A.; Johannessen, P. 1996. Heavy metals in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the Bergen harbor area, western Norway. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57:589-596.
- Arrieche, D.; Licet, B.; García, N.; Lodeiros, C. y Prieto, A. 2002. Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), del Morro de Guarapo, Venezuela. *Intercien.*, 27 (11):613-619.
- Arteaga, L. 2009. Surgencia del Golfo de Venezuela. *Observatorio Oceanográfico Digital de Venezuela*. http://ood.cbm.usb.ve/wiki/surgencia_golfo_vzla. (30/05/2014).
- Báez, M.; García-Severeyn, Y. y Severeyn, H. 2005. Ciclo reproductivo de *Genkensia dermissa* (Bivalvia: Mytilidae) en la playa de Nazaret, El Mojan, estado Zulia, Venezuela. *Cienc. Mar.*, 31: 111-118.
- Bautista, C. 1989. *Tecnología de los moluscos*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España 166 pp.
- Benedicto, J.; Martínez-Gómez, C.; Campillo, J. 2005. Inducción de metalotioneínas en *Mullus barbatus* como biomarcador específico de contaminación metálica: Estudio de campo en el Mediterráneo occidental. *Ciencias Marinas*, 31(1B): 265-274.
- Bebianno, M. y Machado, L. 1998. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Mar. Pollut. Bull.*, 34(8):666-671.
- Bebianno, M. y Langston, W. 1989. Quantification of metallothionein in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugal Electrochim.*, 7:59-64.
- Bebianno, M. y Langston, W. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.*, 108: 91-96.

- Bebianno, M. y Langston, W. 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103(1):79-85.
- Bebianno, M.; Nott, J. y Langston, W. 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussatus*: the role of metallothioneins. *Aquat. Toxicol.*, 27:315-334.
- Bebianno, M. y Serafim, M. 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* y *Ruditapes decussatus*. *Sci. total Environ.*, 214:123-131.
- Beliaeff, B.; O'Connor, T. y Claisse, D. 1998. Comparison of chemical concentrations in mussels and oysters from the United States and France. *Environ. Monit. Asses.*, 49:87-95.
- Berntssen, M.; Aspholm, O.; Hylland, K.; Bonga, S.; Lundebye, A.; 2001. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) par fed elevated dietary cadmium. *Comp. Bioch. Phys.*, 128: 299–310.
- Berthet, B.; Mouneyrac, C.; Amiard, J.; Amiard-Triquet, C.; Berthelot, Y.; Le Hen, A.; Mastanin, O.; Rainbow, P. y Smith, B. 2003. Accumulation and soluble binding of cadmium, copper, and zinc in the polychaete *Hediste diversicolor* from coastal sites with different heavy metal bioavailabilities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 45:468-478.
- Besada, V.; Andrade, J.; Schultze, F. y González, J. 2011. Monitoring of heavy metals in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast. *Conti. Shelf. Reseach.*, 31:457–465.
- Besada, V.; Andrade, J.; Schultze, F.; Fumega, J.; Cambeiro, B. y González, J. 2008. Statistical comparison of trace metal concentrations in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in selected sites of Galicia and Gulf of Biscay (Spain). *Journal of Marine Science.*, 72: 320–331.
- Bervoets, L. y Blust, R. 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.*, 126: 9–19.

- Bordin, G.; Cordeiro, F.; McCourt, J.; Rodríguez, A. 1994. Identification de métalloprotéines du type métallothionéine chez un mollusque marin bivalve. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 317: 1057-1064.
- Bordin, G.; McCourt, J.; Cordeiro, F. y Rodríguez, A. 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. *Mar. Biol.*, 129:453-463.
- Brazilian Federal Legislation (BLF). 1975. *Decree-Law N° 1413 establishing controls to be carried out on industrial pollution*. Brasil.
- Bremner, I. 1991. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Method Enzymol.* 205: 25-35.
- Brouwer, M., Winge, D.R., Gray, W.R., 1989. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.*, 35: 289–303.
- Bustamante, P. 1998. *Bioaccumulation, des elements traces chez les mollusques céphalopodes et bivalves pectinidés. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les predateurs*. Tesis de doctorado. Universidad de la Rochelle. p. 291.
- Caballero-Cruz, A.; Cabrera-Peña, J.; Solano-López, Y. 1996. Descripción del crecimiento y madurez sexual de una población de *Crassostrea columbiensis* (Mollusca: Bivalvia). *Biol. Trop.* 44/45: 335-339.
- Cai, L.; Satoh, M.; Tohyama, C.; Cherian, M. 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicol.*, 132: 85–98.
- Carpené, E.; Camatti, A.; Isani, G.; Cattani, O.; y Cortesi, P. 1992. Cd-metallothionein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*): effects of temperature and salinity. *Italian J. Biochem.* 41:273- 282.
- Carral, E.; Puente, X.; Villares, R.; Carballeira, A. 1995. Background heavy metal levels in estuarine sediments and organisms in Galicia (northwest Spain) as determined by modal analysis. *Sci. Total. Environ.* 172: 175–188.
- Castañeda, J. 2006. *Hidrografía y aspectos dinámicos de la plataforma norte de la Península de Paria, durante 2005*. Trabajo para ascender a la categoría de

Profesor Asociado. Departamento de Oceanografía, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

- Castillo, F. *Biotecnología ambiental*. 2005. Editorial Tébar. Madrid. p. 616.
- Cavaletto, M.; Ghezzi, A.; Burlando, B.; Evangelisti, V.; Cerratto, N.; Viarengo, A. 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 447–455.
- Chafik, A.; Cheggour, M.; Cossa, D. y Sifeddine, S. 2001. Quality of Moroccan Atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. *Aquatic Living Resources.*, 14 (4), 239–249.
- Chiu, S.; Lam, F.; Tze, W.; Chau, C. y Ye, D. 2000. Trace metals in mussels from mariculture zones, Hong Kong. *Chemosph.*, 41:101-108.
- Correia, A.; Livingstone, D. y Costa, M. 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Mar. Environ. Res.* 54: 357–360.
- Cosson, R. 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Mol. Cell Biol.*, 46: 295-309.
- Cousins, R. 1985. Absorption, transport, and hepatic-metabolism of copper and zinc - special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.*, 65(2): 238-309.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN).1994. Comisión Venezolana de Normas Industriales. *Pepitonas en conservas*. Norma 1947-94. Min de Fomento. Caracas, Venezuela.
- Cruz, R. 1982. Variación mensual del índice de condición del molusco *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: Arcidae) en Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. *Rev.Biol.Trop.*, 30(1): 1-4.
- Cruz, R. y Villalobos, C. 1993. Monthly changes in tissue weight and biochemical composition of the mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*41: 93-96.

- Egli, D.; Doménech, J.; Selvaraj, A.; Balamurugan, K.; Hua, H.; Capdevila, M. 2006. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metals homeostasis and detoxification. *Genes. Cell.* *11*: 647-58.
- Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* *82*: 70-77.
- Food and Drugs Administration (FDA). 1997. *HACCP Guidelines*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, FDA.
- Frazier, J. y George, S. 1983. Cadmium kinetics in oysters a comparative study of *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, *76*:55-6.
- Geffard, A.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.; Mouneyrac, C.; 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarker.*, *6* (2): 91-107.
- Geffard, A.; Amiard, J. Amiard-Triquet, C. 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers.*, *7*(2):123-137.
- Gutiérrez-Galindo, E. y Muñoz-Barbosa, A. 2003. Variabilidad geográfica de la concentración de Hg, Co, Fe y Ni en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) de la costa de Baja California. *Cienc. Mar.*, *29*(1):21-34.
- Gruber, H. y Valle, B. Introduction to metallothionein. 2000. *Methods in enzymology.* *Biochem.* *205*: 3-7. 2.
- Hamza-Chaffai, A.; Amiard, J.; Cosson, R. 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comp. Biochem. Phystol. C.*, *123*: 153-163.
- Hickman, R.; Illingworth, J. 1980. Condition cycle of the green-lipped mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. *Mar. Biol.*, *60*: 27-38.
- Hylland, K.; Nissen-Lie, T.; Christensen, P. y Sandivk, M. 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder *Platichthys flesus*, L. *Mar. Environ. Res.*, *46*(1-5): 51-55.

- Howard, D. y Smith, C. 1983. *Histological techniques for marine bivalve mollusk. Technical Memorandum NMFS-F/NEC.* pp 25-97.
- Hogstrand, C. y Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol., 100C:* 137–141.
- Hummel, H.; Amiard, J., Amiard-Triquet, C.; Bogaardas, R.; Löhr, A. Coutaud, G. 2001. Subcellular Cd accumulation and Cd-binding proteins in the netted dog whelk, *Nassarius reticulatus* L. *Mar. Environ. Res., 38:*707-714.
- Imber, B.; Thompson, J. y Ward, S. metal-binding protein in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a biochemical environment indicator. *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38:*707-714.
- Isani, G.; Andreani, G.; Kindt, M.; Carpené, E. 2000. Metallothioneins (Mts) in marine mollusc. *Cell. Mol. Biol. 46(2):*311-30.
- Jiménez R. 1999. *Algunas consideraciones sobre la pesquería de la pepitona Arca zebra, en el Oriente venezolano.* Informe Técnico. FONAIAP-Sucre. 6 pp.
- Ke, C. y Wang, W. 2001. Bioaccumulation of Cd, Se and Zn in an Estuarine Oyster (*Crassostrea rivularis*) and a Coastal Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol., 56:* 33-51.
- Knapen, D.; Reynders, H.; Bervoets, L.; Verheyen, E.; Blust, R. 2007. Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. *Aquat. Toxicol., 82:*163-172.
- Langston, W.; Bebianno, M.; Burt, G. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments.* Chapman and Hall, London, pp. 219–283.
- Lanza, V.; Matínez, I.; Vallenilla, O.; Márquez, J.; González, A.; Gamboa, J.; y Alió, J. 2011. Elementos traza detectados por plasma inductivamente acoplado (ICP) en pepitonas, *Arca zebra* (Mollusca, Arcidae) de dos localidades costeras del estado Sucre, Venezuela. *Zootecnia Trop., 29(3):* 261-272.

- Laurent, C. 2009. *Variación estacional de metales pesados en Perna viridis, de la localidad de Guayacán, península de Araya, estado Sucre, Venezuela*. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Legras, S.; Mouneyrac, C.; Amiard, J.; Amiard-Triquet, C. Rainbow, P. 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 246:259-279.
- Lemus, M.; Rojas, R.; Rojas-Astudillo, L. y Chung, K. 2013. Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva. *Biol. Trop.*, 61(2): 701-709.
- Lista, M.; Lodeiros, C.; Prieto, A.; Himmelman, J.; Castañeda, J. García, N. y Velásquez, C. 2006. Relation of seasonal changes in the mass of the gonad and somatic tissues of the zebra ark shell *Arca zebra* to environmental factors. *J. Shellfish Res.* 25(3): 969-973.
- Lista, M.; Prieto, A.; Velásquez, C.; Lodeiros, C. y Hernández, G. 2008. Variación mensual del índice de condición y madurez sexual en la pepitona *Arca zebra*, del banco de Chacopata, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *Saber.*, 20(1): 29-38.
- Manahan, S. 2007. *Introducción a la química ambiental*. Editorial Reverté, Universidad Autónoma de México.
- Marcano, V. 1984. *Aspecto biológico de la reproducción en la ostra perla Pinctada imbricata Röding, 1798 (Mollusca: Bivalvia) de Punta Las Cabeceras, Isla de Cubagua, Venezuela*. Tesis de Licenciatura. Dep. Biología. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. p. 64.
- Marcano, M. 2004. *Histología gonadal de Perna viridis L. 1758 (Bivalvia: Mytilidae) del Morro de Guarapo, Costa Norte del estado Sucre Venezuela*. Tesis de Pregrado. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 54 pp.
- Marigomez, I.; Soto, M.; Carajaville, M.; Angulo, E.; Giamberini, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Technol.*, 56:358-392.

- Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons Ltd., London, pp. 479–608.
- Mora, J. 1985. Distribución por tallas, ciclo gonádico e índice de engorde de la pepitona *Arca zebra*, Boca de Río, Isla de Margarita. Tesis de Pregrado. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 95 pp.
- Mathiessen, P. 2000. *Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM)*. Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Remembrance Avenue, Burham-on-Crouch, Essex CM0 8HA, UK, 24 p.
- Nakal, A. 1979. Contribución a la ecología de la pepitona *Arca zebra* (Swainson, 1833). Aspectos gametogénicos. Tesis de Pregrado. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 85 p.
- Nakal, A. y Prieto, A. 1984. Contribution to the reproductive biology of *Arca zebra* (Swainson) in Sucre state, Venezuela. *J. Shellfish Res.*, 4: 95.
- Nielson, K.; Atkin C.; y Winge, D. 1985. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 5342-5350.
- Olsson, P.; Kling, P.; Hogstrand, C. 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston, W., Bebianno, M. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 321–350.
- Pavicic, J.; Raspor, B.; Marticic, D. 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. *Mar. Biol.* 115:435-444.
- Pavicic, J.; Skreblin, M.; Krebar, I.; Tusek-Zidaric, M.; Stegnar, P. 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 107: 249–257.
- Pedersen, S.; Lundebye, A.; Depledge, M. 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.*, 37:183-200.

- Pérez, A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linne, 1767) (Mollusca: Bivalvia) con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 4: 43-76.
- Pérez-López, M.; Alonso, J.; Nóvoa-Valiñas, M.; Melgar, M. 2003. Assessment of heavy metal contamination of seawater and marine Limpet, *Patella vulgata* L., from northwest Spain. *J. Environ. Sci. Health.*, 38 (12): 2845-2856.
- Prieto, A.; Flores, M.; Lodeiros, C. 1999. Madurez sexual e índice de condición en una población del mejillón de fondo *Modiolus squamosus* (Mollusca: Bivalvia) en Tocuchare, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Ecotropicos.*, 12: 83-90.
- Prieto, A.; Ruiz, L.; García, N.; Álvarez, M. 2001. Diversidad malacológica en una comunidad de *Arca zebra* (Mollusca: Bivalvia) en Chacopata, Estado Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 49(2): 591-598.
- Prieto, A. y Saint – Aubyn, M. 1998. Crecimiento del bivalvo *Arca zebra* (Swainson, 1883) en Chacopata, Estado Sucre, Venezuela. *Saber 10*: 14-19.
- Rainbow, P. 1993. *The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. Ecotoxicology of metals in invertebrates.* Lewis Publishers. Inglaterra.
- Rainglet, F. 1998. *Biomarqueurs spécifiques de pollution: évaluation de l'exposition et des effets precoces des déchets solides (ordures ménagères, machefers) à l'égard du mollusque bivalve Corbicula fluminea (Müller, 1774).* Tesis de doctorado. Universidad de Nantes. p. 221.
- Raspor, B.; Pavicic, J.; Kozar, S.; Kwokal, Z.; Paic, M.; Odzak, N.; Ujevic, I.; Kjakovic, Z.; 1999. *Assessment of metal exposure of marine edible mussels by means of a biomarker.* Birkhäuser, Basel. pp. 629-632.
- Raspor, B.; Dragun, M.; Ivanković, E. y Pavičić, J. 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins?. *Sci. Total. Environ.*, 333:99-108.
- Rodríguez, W. 2010. *Metalotioneínas y metales pesados en el guacuco Tivela mactroides (born, 1778) (Bivalvia), colectado en playa Caicara, estado Anzoátegui,*

- Venezuela. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Rodríguez-Ortega, M.; Alhama, J.; Funes, V.; Romero-Ruiz, A.; Rodríguez-Ariza, A.; López-Barea, J. 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-Spanish littoral. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 542–549.
- Ruiz, E.; Cabrera, J.; Cruz, R.; Palacios, J. 1998. Crecimiento y ciclo reproductivo de *Polymesoda radiata* (Bivalvia: Corbiculidae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 46: 643-648
- Roeva, N.; Sidorov, A.; Yurovitskii, Y. 1999. Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biol. Bull.* 26 (6): 617–622.
- Roméo, M.; Sidoumou, Z. y Gnassia-Barelli, M. 2000. Heavy metals in various mollusc from the Mauritanian Coast. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65:269-276.
- Ross, K.; Cooper, N.; Bidwell, J.; Elder, J. 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 671–679.
- Ryvolova, M.; Krizkova, S.; Adam, V.; Beklova, M.; Tmkova, L.; Hubalek, J.; Kizeki, R. 2011. Analytical Methods for Metallothionein Detection. *Current Analytical Chemistry*, 7: 243-261.
- Scelzo, M. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) *Invest. Mar. Valparaiso.*, 25: 177-185.
- Segovia-Zavala, J.; Delgadillo-Hinojosa, F.; Vidal-Talamantes, R.; Muñoz-Barbosa, A. y Gutiérrez-Galindo, E. 2003. *Mytilus californianus* transplanted as upwelling bioindicators to two areas off Baja California, México. *Cienc. Mar.*, 29(4B):665-675.
- Segura, B. 2006. *Determinación de metales en los moluscos y camarón de mayor consumo en Puerto la Cruz, estado Anzoátegui*. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

- Sreenivasan, P.; Tangelu, R. y Poovannan, P. 1989. Biology of the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus) culture in Muttukadu Lagoon, Madras. *Indian J. Fish.*, 36: 149-155.
- Templeton, D. y Cherian, M.; 1991. Toxicological significance of metallothionein. *Meth. Enzymol.* 205: 11–24.
- Torres, W. y Ruiz, A. 2003. *Monitoreo de focos de surgencia en las costas venezolanas*. VII Jornadas Técnicas Instituto de Ingeniería.
- Vélez, A. 1975. Estudio de la reproducción de la ostra de mangle *Crassostrea rizophorae* de la Bahía de Mochima. *Bol. Inst. Oceanog.*, 15: 65-72.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Ceratto, N.; Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol. Biol.* 46 (2): 407–417.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, Y. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ.* 44: 69-84.
- Wallace, W.; López, G.; Levinton, J. 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 172:225-237.
- Zorrilla, N. 2003. *Presencia y variación mensual de metales pesados esenciales y no esenciales en el oligoqueto intermareal Pontodrilus litoralis Grube, 1855 (Oligochaeta: Acanthodrilidae) y en el sedimento donde habita*. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

APÉNDICES

Apéndice I. Valores máximos permisibles de los metales Zn, Cu, Pb y Cd en bivalvos para el consumo humano $\mu\text{g/g}$ masa húmeda.

Metal	Promedio	FAO	FDA	BFL	COVENIN
Zn	57,46	-	-	50	-
Cu	0,94	10	-	30	10
Pb	0,108	2	1,7	20	2
Cd	5,80	1	4	1	0,1

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; FDA: Food and Drugs Administration; BLF: Brazilian Federal Legislation; COVENIN: Comisión Venezolana de Normas Industriales.

Apéndice II. Valores promedio del IC, concentraciones de metales (Zn, Cu, Pb y Cd) y metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ masa húmeda) en individuos de *Arca zebra*, recolectados en la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela. ($X \pm \text{DE}$)

Meses	Zn	Cu	Pb	Cd	IC	METS
Enero	34,82 \pm 6,15	0,48 \pm 0,11	0,008 \pm 0,014	1,23 \pm 0,51	19,91 \pm 1,68	14,60 \pm 7,47
Febrero	28,26 \pm 8,42	0,32 \pm 0,08	0,012 \pm 0,019	1,98 \pm 0,83	20,75 \pm 6,89	19,31 \pm 4,30
Marzo	24,17 \pm 7,53	0,59 \pm 0,21	0,108 \pm 0,047	3,12 \pm 1,90	21,53 \pm 1,61	14,26 \pm 7,62
Mayo	57,46 \pm 20,30	0,52 \pm 0,14	0,073 \pm 0,041	3,13 \pm 1,20	21,31 \pm 3,51	23,69 \pm 8,67
Junio	36,95 \pm 15,10	0,49 \pm 0,19	0,023 \pm 0,044	1,32 \pm 0,53	19,49 \pm 1,51	32,96 \pm 31,61
Julio	33,29 \pm 4,76	0,66 \pm 0,23	0,089 \pm 0,060	2,77 \pm 1,18	20,38 \pm 3,61	27,51 \pm 6,17
Agosto	34,40 \pm 15,95	0,56 \pm 0,31	0,017 \pm 0,029	1,16 \pm 0,57	23,87 \pm 1,30	64,98 \pm 24,25
Septiembre	53,99 \pm 10,38	0,61 \pm 0,17	0,090 \pm 0,083	1,47 \pm 0,53	17,47 \pm 1,47	30,80 \pm 5,36
Octubre	38,38 \pm 14,62	0,94 \pm 0,56	0,087 \pm 0,168	5,80 \pm 3,91	19,47 \pm 2,75	34,58 \pm 10,05
Noviembre	41,52 \pm 10,67	0,40 \pm 0,10	0,018 \pm 0,020	2,84 \pm 1,30	17,17 \pm 1,91	19,05 \pm 3,62
Diciembre	28,57 \pm 4,66	0,33 \pm 0,07	0,005 \pm 0,010	1,96 \pm 0,98	20,16 \pm 1,76	19,56 \pm 2,57
KW	71,34*	59,28*	69,46*	91,00*	76,51*	93,43*
P	2,43x10 ⁻¹¹	4,93x10 ⁻⁹	5,62x10 ¹¹	0,0	2,41x10 ⁻¹²	0,0
K-W:	Kruskal-Wallis;	X:	Media;	DE:	Desviación	Estándar.

HOJA DE METADATOS

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

Título	VARIACIÓN ESTACIONAL DE METALOTIONEINAS EN LA PEPITONA <i>Arca zebra</i> (Bivalvia: Arcidae) Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE METALES Y EL ÍNDICE DE CONDICIÓN EN LA LOCALIDAD DE GUAYACÁN. EDO. SUCRE, VENEZUELA.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
CAROLINA M., LAURENT S.	CVLAC	16.701.037
	e-mail	carolinalaurent@gmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Metalotioneinas
<i>Arca zebra</i>
Biomonitor
Biomarcados

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología Aplicada
	Ecotoxicología

Resumen (abstract):

Las metalotioneínas (MTs), son proteínas ubicuas, no enzimáticas, de baja masa molecular y de alto contenido de cisteína. Los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína permiten a las MTs unir metales particulares por lo que son usadas como biomarcador en programas de monitoreo de contaminación, basándose en la premisa de que el aumento de los niveles de MTs se debe principalmente a la exposición metálica. Sin embargo, factores naturales como la temperatura, el índice de condición y el sexo pueden influir en la síntesis de MTs; por lo que en el presente trabajo se evaluó la relación entre las MTs, el índice de condición (IC) y la concentración de metales en organismos del bivalvo *Arca zebra* de la localidad de Guayacán, Edo. Sucre, Venezuela. Los niveles de MTs fueron determinados en muestras recolectadas desde enero hasta diciembre 2012, por un método de cuantificación colorimétrica empleando reactivo de Ellman, el IC fue calculado utilizando la ecuación $IC = (Masa\ seca / Masa\ húmeda) * 100$ y los metales fueron evaluados en el tejido blando seco digerido con ácido nítrico a través de espectrofotometría inductivamente acoplado a plasma (ICP). La pepitona *A. zebra* presentó una variación estacional significativa de los valores de MTs, IC y metales. De acuerdo a los valores promedios obtenidos en *A. zebra*, las concentraciones de Zn sobrepasan los valores permisibles para el consumo humano, el cual corresponde a 50 µg/g de masa húmeda según “Brazilian Ministry of Health”, de igual forma el Cd por encima de los valores permisibles (0,1 µg/g) para el consumo humano establecidos por las normas COVENIN. Por otro lado, se observó que las MTs y el IC presentaron una relación positiva significativa, donde los valores más altos fueron durante el mes de agosto de 2012, mientras que por el contrario no se evidenció correlación entre la concentración de metales tóxicos (Pb y Cd) y el nivel de MTs, pero sí con los niveles de Cu, demostrándose que los factores ambientales y fisiológicos deben ser tomados en cuenta a la hora de determinar la fuente inductora de MTs en el organismo.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL/ Código CVLAC / e-mail	
Dra. Mairim Lemus	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6.429.405
	e-mail	mlemus88@gmail.com
	e-mail	
Msc. Leida Marcano	ROL	CA <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	8.219.437
	e-mail	leimar0501@gmail.com
	e-mail	
Msc. Carmen Martins	ROL	CA <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	11.376.329
	e-mail	betatrizmh17@hotmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2014	06	26
------	----	----

Lenguaje: spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G -laurentc.doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial : **Nacional** **(Opcional)**

Temporal: **Temporal** **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: Magister Scientiarum en Biología Aplicada
Mención Ecotoxicología

Nivel Asociado con el Trabajo: Magister Scientiarum

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.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE	
SISTEMA DE BIBLIOTECA	
RECIBIDO POR	<i>[Signature]</i>
FECHA	5/8/09
HORA	5:30

Cordialmente,

[Signature]
JUAN A. BOLANOS CUMBELO
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 Telemática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJOS DE GRADO (Vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) “Los Trabajos de grado son exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizadas a otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien lo participara al Consejo Universitario”

Lcda. Laurent Carolina

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials and a surname, positioned above a horizontal line.

Autor

Dra. Lemus Mairim

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials and a surname, positioned above a horizontal line.

Asesor