

*Research Article*

## **Tolerancia a la anoxia y defensas antioxidantes en el mejillón verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) bajo exposición aguda al cadmio**

**Edgar Zapata-Vívenes<sup>1</sup>, María Tovar-Sánchez<sup>2</sup>, Osmar Nusetti<sup>1</sup>  
Mairin Lemus<sup>1</sup> & Gabriela Sánchez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente  
Av. Universidad, Cerro Colorado, Cumaná, Venezuela

<sup>2</sup>Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente  
Av. Universidad, Cerro Colorado, Cumaná, Venezuela

**RESUMEN.** Se estimó la sobrevivencia a la anoxia del mejillón verde *Perna viridis* después de siete días de exposición a 50 µg L<sup>-1</sup> de cadmio (Cd), seguido de un período de recuperación en el mar durante 21 días. En la glándula digestiva de los organismos experimentales se determinó los niveles de Cd acumulados, y marcadores de estrés oxidativo tales como: metalotioneínas (MT), glutatión reducido (GSH), peroxidación lipídica (TBARS) y las actividades de las enzimas catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST). Los organismos expuestos a Cd mostraron una menor tolerancia al tratamiento anóxico, sin embargo una vez recuperados en el mar presentaron valores de sobrevivencia relativamente mayores en comparación a sus controles. Los organismos expuestos a Cd revelaron un incremento en la concentración de MT y la actividad de CAT, correlacionado al ingreso corporal de Cd. Los organismos transplantados al mar mostraron una disminución del metal acumulado, manteniendo niveles de MT incrementados. Los mejillones tratados y controles no exhibieron diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo determinados (TBARS, GSH, GR y GST). El Cd acumulado posiblemente afectó algunas estrategias bioquímicas relacionadas con la tolerancia a la anoxia de *P. viridis*. Sin embargo, los altos niveles de MT en organismos pre-expuestos y posteriormente recuperados, podría condicionar la protección contra la toxicidad del Cd e indirectamente una mayor tolerancia a la anoxia.

**Palabras clave:** *Perna viridis*, anoxia, cadmio, enzimas antioxidantes, glutatión reducido, lipoperoxidación, metalotioneínas.

## **Anoxia tolerance and antioxidant defences in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) under acute cadmium exposure**

**ABSTRACT.** The survival to anoxia was measured from green-lipped mussel *Perna viridis* after of exposure to 50 µg L<sup>-1</sup> cadmium (Cd) during seven days, followed by a recuperation period in the sea during 21 days. The levels of Cd, and oxidative stress biomarkers as metallothioneins (MT), reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (TBARS), and maximal activities of catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST) were calculated in the digestive gland in experimental organisms. The Cd-exposed organisms showed an anoxia tolerance reduced; however, those organisms recovered in the sea showed a survival time to anoxia major in contrast to control organisms. The Cd-exposed organisms revealed a significant increase of MT and CAT correlated with Cd uptake. The Cd-preexposure and sea-transplanted mussels showed a significant reduction of metal accumulated, whereas the levels of MT was maintain heightened. Both, Cd-depurated and non-depurated organisms did not exhibit significant differences among the biomarkers of oxidative stress: TBARS, GSH and enzymes tested. The uptake Cd possibly affected some biochemical mechanisms related to anoxia tolerance, however the high levels of MT in the pre-exposure and recuperated organisms, could be condition the protection against Cd-toxicity and indirectly a resistance to prolonged anoxia.

**Keywords:** anoxia, cadmium, antioxidant enzymes, reduced glutathione, lipoperoxidation, metallothioneins.

## INTRODUCCIÓN

Una adaptación ventajosa que posee el mejillón verde (*Perna viridis*) es la capacidad de sobrevivir en ambientes con limitada disponibilidad de oxígeno, incluso en ecosistemas costeros influenciados por los cambios en las mareas o procesos de eutrofización. En los mejillones, las condiciones de anoxia pueden ser inducidas por cierre hermético de sus valvas en presencia de depredadores, enterramientos, anhidrobiosis y sustancias contaminantes (Ladare & Storey, 2002). La tolerancia a la anoxia prolongada en los mejillones está asociada a una condición hipometabólica, activación de las rutas anaeróbicas para producción de energía y un eficiente sistema antioxidante (Hochachka & Somero, 2002; Hermes-Lima, 2004); tales ajustes de adaptación bioquímica en bivalvos pueden ser perturbados por procesos de contaminación ambiental por metales pesados (De Zwaan *et al.*, 1995; Kurochkin *et al.*, 2009; Nusetti *et al.*, 2010).

Recientes monitoreos han revelado ligeros incrementos en los niveles de metales pesados en costas del estado de Sucre (Venezuela), con especial interés el cadmio (Cd). En sedimentos superficiales del golfo de Cariaco se han reportado concentraciones entre 1,20 y 6,21  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Martínez, 2002; Márquez *et al.*, 2005) y valores entre 0,08 y 5,58  $\mu\text{g Cd g}^{-1}$  de peso seco en *P. viridis* colectados en bancos naturales y cultivos artesanales de zonas costeras Sucrenses (Lemus *et al.*, 2010; Zapata-Vívenes *et al.*, 2012). Tales niveles de Cd presentes en mejillones y en su entorno crean expectativas sobre las estrategias bioquímicas de defensa en organismos contaminados, en especial en su adaptación a sobrevivir a la anoxia. Distintos estudios han considerado que el Cd puede provocar daños a nivel molecular en los organismos marinos en bajas concentraciones, conllevando a alteraciones en el transporte a través de las membranas biológicas (Dailianis & Kaloyianni, 2004), actividad enzimática (Canesi *et al.*, 1998; Nusetti *et al.*, 2010), producción energética (Sokolova, 2004) y daños oxidativos (Prakash & Jagannatha-Roa, 1995; Rajkumar & Milton, 2011).

*P. viridis* ha sido utilizado como herramienta biológica en monitoreos de ecosistemas marino-costeros (Chidambaran, 1996; Krishnakumar *et al.*, 1996). Esta especie tiene la capacidad de responder bioquímicamente en presencia de Cd y otros contaminantes de naturaleza metálica, especialmente mediante la síntesis de metalotioneínas (MT) y activación del sistema antioxidante (Verlecar *et al.*, 2007). Las MT son proteínas de bajo peso relativo que se encuentran vinculadas a la captación y depuración de

metales pesados (Ng *et al.*, 2007), y recientemente ha sido demostrada su participación en la protección antioxidante, evitando la peroxidación lipídica (Zapata-Vívenes & Nusetti, 2007). De igual manera, la efectividad antioxidante del tripéptido glutatión y algunas enzimas que lo utilizan como sustrato (glutatión peroxidasa, reductasa y S-transferasa), así como la catalasa, forman parte del conjunto de defensas moleculares que permiten reducir las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno (EROs) y otros radicales libres. Es conocido que tales oxiradicales pueden incrementar su formación en presencia de metales pesados (Wiston, 1991; Di Giulio *et al.*, 1995). De tal manera que la determinación de parámetros bioquímicos en mitílicos forma parte de una gama de respuestas efectivas que han sido usadas como biomarcadores para determinar la salud de ecosistemas marinos costeros (Storey, 1996; Cheung *et al.*, 2004). En esta investigación se evaluaron los efectos que puede provocar el Cd sobre la sobrevivencia del mejillón *P. viridis* a condiciones de anoxia prolongada, y cómo el sistema de defensa antioxidante, incluyendo MT, modula sus respuestas en organismos sometidos al metal, y después de recuperados en su ambiente natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos y tratamiento con Cd

Se colectaron ejemplares juveniles de *P. viridis* (60-80 mm), sin distinción de sexo, en ensenada La Esmeralda (10°26'N, 64°01'W), una localidad costera al noroeste del estado de Sucre, Venezuela. En esta zona costera se registran promedios y rangos anuales en sus factores ambientales de 26,25°C (25,0-28,7), pH 7,72 (7,75-7,97), 4,85 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (3,18-6,39) y salinidad de 37 (36-38). Los organismos se llevaron al laboratorio, limpiados de epibiontes y colocados en acuarios a razón de 1 ind por cada L de agua de mar (filtrada por miliporo-100  $\mu\text{m}$  y esterilizada con luz ultravioleta) bajo condiciones controladas de temperatura (25  $\pm$  1°C), pH (7,8), salinidad (36) y aireación constante (90-92%). Bajo estas condiciones se mantuvo los mejillones durante una semana como período de aclimatación, con recambios de agua mar y alimentados diariamente *ad libitum* con la microalga *Tetraselmis chuii*.

### Exposición al cadmio

Grupos de 20 organismos por acuario fueron expuestos a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd durante siete días. Esta concentración es equivalente a la concentración letal mínima (CL<sub>1</sub>) estimada en bioensayos de exposición preliminares; tal dosis garantizó la sobrevivencia del 100% de los organismos durante el período de experimentación. El

grupo control fue distribuido similarmente bajo las condiciones descritas anteriormente, pero sin estar en contacto con el metal (niveles en Cd contentivos en el agua de mar  $<0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Los acuarios fueron cubiertos con tapas de vidrio para evitar evaporación continua del agua y por ende un aumento en la concentración nominal. Los recambios de agua fueron realizados cada dos días con la finalidad de eliminar impurezas y excreciones. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### Depuración en el mar

Los organismos previamente expuestos a Cd y sus respectivos controles fueron transferidos, durante un lapso de 21 días, a la ensenada de Turpialito (Estación Hidrobiológica de la Universidad de Oriente), una zona localizada en la región sur del golfo de Cariaco ( $10^{\circ}41'N$ ,  $63^{\circ}24'W$ ). Esta localidad presenta condiciones abióticas similares al sitio inicial de colecta:  $26,93^{\circ}C$  ( $23,96-29,30$ ), pH 7,76 ( $7,75-7,98$ ),  $5,41 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  ( $4,8-6,51$ ) y salinidad de 37,5 ( $36-38$ ). Los ejemplares fueron colocados en cestas plásticas colgantes (tipo española), sujetas a una línea de cultivo a 2 m de profundidad. Una vez terminado tanto el período de exposición como de depuración, se tomó cuatro grupos de ocho organismos, a los cuales se les disecó la glándula digestiva y se conservó a  $-40^{\circ}C$  hasta el momento de los análisis. Se estimó la cantidad de Cd acumulado, sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión reducido (GSH) y el contenido de metalotioneínas (MT). Un grupo adicional de seis organismos fueron utilizados para determinar las actividades de las enzimas catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST).

### Sobrevivencia a anoxia

Veinte organismos por cada tratamiento, los expuestos y no expuestos a Cd, y los posteriormente recuperados en el mar, fueron sometidos a agua anóxica. Esta última fue obtenida por desplazamiento de oxígeno con un flujo continuo de  $N_2$  gaseoso ( $\sim 2$  h) y luego mantenidos en envases sellados herméticamente (salinidad: 36, pH: 7,8; temperatura:  $25 \pm 1^{\circ}C$ , medidos al inicio del experimento). Previamente, se agregó al agua de mar una mezcla de antimicrobianos comerciales ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cloranfenicol,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  estreptomycin y  $50 \text{ mg L}^{-1}$  penicilina tipo G). La sobrevivencia se observó diariamente durante dos semanas. Se estimó el porcentaje de sobrevivencia y el tiempo (en días) donde la anoxia causó el 50% de mortalidad de la población de mejillones experimentales ( $T_{m50}$ ) (Hamilton *et al.*, 1977). Se consideraron organismos muertos aquellos que no respondían a la estimulación mecánica. Al inicio y final del experimento se determinaron los niveles de oxígeno en agua por el método de Winkler ( $0,60$  y  $0 \text{ mg}$

$\text{L}^{-1} \text{ O}_2$ , respectivamente). La tolerancia a la anoxia prolongada ha sido considerada como un índice de estrés por contaminación (Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1991).

### Cadmio

Las glándulas digestivas fueron secadas en una estufa ajustada a  $65^{\circ}C$  por 72 h. Posteriormente, digeridas en ácido nítrico (grado analítico, 69%) a  $40^{\circ}C$  por un máximo de 24 h. El producto de la digestión fue filtrado con un papel Whatman N°42 y enraizado hasta 25 mL de agua bidestilada/desionizada. Las concentraciones de Cd fueron determinadas usando un espectrofotómetro con llama de aire-acetileno y corrector de fondo de deuterio (Perkin Elmer; modelo 3310), tomándose el promedio de tres lecturas. El método fue validado con hepatopáncreas de langosta (TORT-2) y músculo de tiburón (DORM-2), obteniendo valores certificados en el orden de 97-102%.

### Metalotioneínas

Las metalotioneínas fueron determinadas usando el método espectrofotométrico planteado por Viarengo *et al.* (1997), determinando niveles de grupos sulfhidrilos (Ellman, 1958), después de varias precipitaciones de proteínas. La cantidad de MT en *P. viridis* fue definida mediante contenido de 29% de cisteína por cada MT (Khoo & Patel, 1999).

### Peroxidación de lípidos y proteínas totales

La lipoperoxidación fue determinada por la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Zapata-Vívenes & Nusetti, 2007). Las glándulas digestivas fueron homogenizadas (1:4) en una solución tampón de Imidazol-HCl  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  y luego centrifugadas a  $12.000 \text{ g}$  por 20 min; ambas a  $4^{\circ}C$ . Se mezcló  $200 \mu\text{L}$  del sobrenadante con  $200 \mu\text{L}$  misma cantidad de ácido tricloroacético al 20% y HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Adicionalmente, se agregó  $500 \mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico al 1% en baño de agua hirviendo por 10 min y se centrifugó a  $1.500 \text{ g}$  durante 10 min. La absorbancia de las muestras se midió a  $535 \text{ nm}$ . La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.*, (1951), utilizando como estándar albúmina estándar de suero de bovino.

### Determinación de GSH

Esta técnica está basada en un principio de dos reacciones planteado en el kit Bioxytech® GSH-400. Las glándulas digestivas fueron homogenizadas (1:8) en una solución de ácido tricloroacético frío al 20%, luego se realizó una centrifugación a  $3.000 \text{ g}$  a  $4^{\circ}C$  por 10 min. La capa superficial fue colectada y mantenida durante una hora a  $4^{\circ}C$ . Se tomó  $50 \mu\text{L}$  de la muestra, más  $850 \mu\text{L}$  de buffer de potasio a pH 7 y se mezcló con

50  $\mu\text{L}$  de 4-cloro-1-metil-7-trifluorometil-quinolinium-metil sulfato y NaOH al 30%. Posteriormente, fue incubado a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 min en una cámara oscura y se leyó la absorbancia a 400 nm, utilizando GSH como estándar.

### Enzimas CAT, GR y GST

Las glándulas digestivas fueron homogenizadas (25% p/v; a  $4^\circ\text{C}$ ) en una solución de sacarosa  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , EDTA- $\text{Na}_2$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , ditiotritol  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , KCl  $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$  y ácido fenil-metilsulfónico  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ , tamponado con Tris-HCl  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 7,4. Los homogeneizados fueron centrifugados inicialmente a  $5000 \text{ g}$  por 10 min y después los sobrenadantes fueron sometidos a una nueva centrifugación a  $12.000 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$  por 20 min. La fracción citosólica resultante fue usada como fuente de enzimas. Las actividades enzimáticas fueron medidas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 2S acoplado a un programa cinético (Lambda 2). Las actividades máximas fueron determinadas y ajustadas de acuerdo a los procedimientos descritos por Nusetti *et al.* (2004).

Catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6) fue medida a 240 nm, agregando en la cubeta de reacción  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 7,0 más peróxido de hidrógeno ( $\epsilon$ :  $40 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}$ ) a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , iniciando la reacción con 20  $\mu\text{L}$  de extracto. Glutatión reductasa (GR, EC 1.11.1.9) fue medida a 340 nm siguiendo la oxidación de NADPH ( $\epsilon$ :  $6,22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}$ ) por glutatión oxidada (GSSG)  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  en buffer fosfato de potasio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,5. La actividad de glutatión transferasa (GST, EC 2.5.1.18) fue determinada con 1-cloro-2-4-dinitrobenceno (CDNB)  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  y GSH  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , siguiendo la formación del complejo dinitrofenil-glutatión ( $\epsilon$ :  $9,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}$ ) a 340 nm en buffer fosfato de potasio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 6,5.

### Análisis estadísticos

Para el procesamiento de los datos se utilizó un análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis) sólo para determinar las diferencias entre los  $\text{Tm}_{50}$  de sobrevivencia a la anoxia y un análisis de varianza de una vía (Statgraphics Plus versión 5.1 ambiente Window), para determinar las diferencias entre las demás variables bioquímicas. Para contraste *a posteriori* se utilizó una prueba de Bonferroni. Se realizaron análisis de regresión y correlación entre los parámetros (Sokal & Rohlf, 1979).

## RESULTADOS

### Sobrevivencia a anoxia

Los organismos expuestos a Cd mostraron una reducida sobrevivencia a la anoxia mostrando un tiempo medio

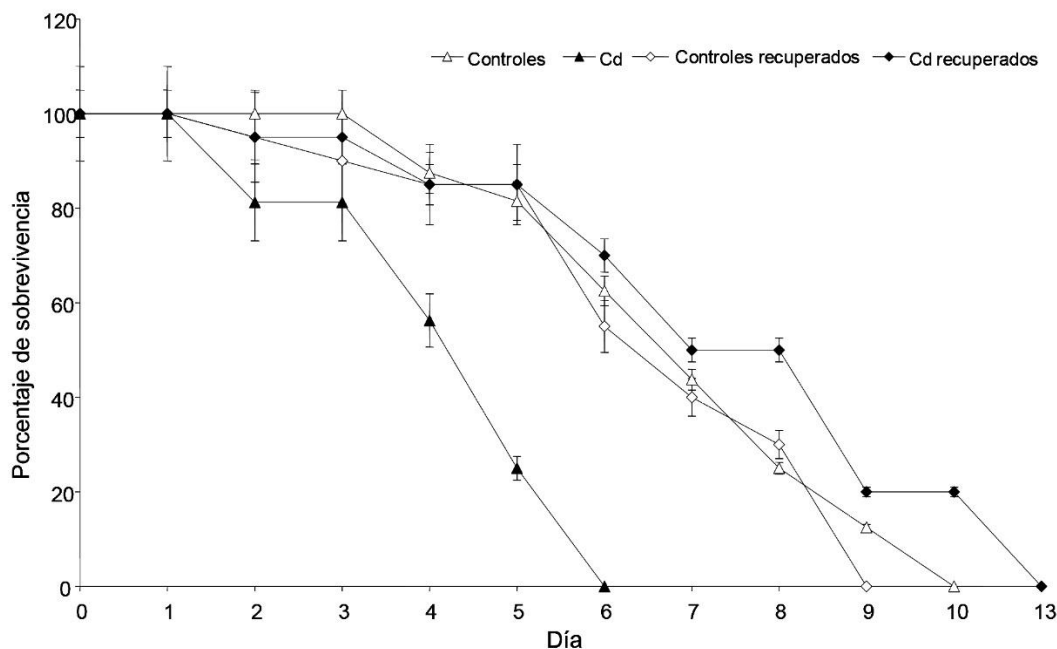
de mortalidad de  $3,84 \pm 0,22$  días, en comparación a su respectivo control ( $6,40 \pm 0,10$  días) ( $\text{KW} = 14,61$   $P < 0,0021$ ) (Fig. 1). Por el contrario, los organismos expuestos a Cd y posteriormente depurados en el mar mostraron mayores valores de tiempo letal medio ( $7,24 \pm 0,42$  días) en contraste a sus respectivos controles ( $6,13 \pm 0,13$  días). El 100% de letalidad fue alcanzado al sexto día de experimentación en los organismos inicialmente expuestos a Cd, y tres días posteriores por sus respectivos controles. Diferencialmente los grupos controles y expuestos pero recuperados en el mar, alcanzaron la mayor letalidad entre los días 11 y 13 de condición anóxica, respectivamente.

### Cd y MT

Los organismos expuestos a Cd mostraron un incremento significativo en los niveles del metal acumulado, ascendiendo en un orden de 19,11 veces en contraste a los valores contenidos en los organismos controles ( $F_s = 92,09$ ;  $P < 0,001$ ). Consecuentemente, las concentraciones de metalotioneínas (MT) en la glándula digestiva incrementaron unas 3,22 veces con respecto a los organismos no expuestos ( $F_s = 25,0$ ;  $P < 0,001$ ). La acumulación de Cd y MT mostraron una relación lineal positiva moderada ( $\text{MT} = 69,96 \text{ Cd} + 240,64$ ) y un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,70 ( $R^2 = 48,8\%$ ). Los mejillones previamente contaminados con Cd y posteriormente trasladados al mar mostraron un descenso de 63,5% del metal acumulado; aunque tales niveles son elevados en comparación a los valores de los organismos controles. Sin embargo, las concentraciones de MT se mantuvieron incrementadas de forma similar a los organismos previamente contaminados con Cd (Tabla 1).

### Antioxidantes y daño oxidativo

En organismos expuestos a Cd se evidenció un incremento significativo en la actividad de CAT ( $F_s = 11,30$ ;  $P < 0,001$ ), para luego presentar promedios similares a los organismos controles recuperados en el mar. La acumulación de Cd y CAT mostraron una relación lineal positiva moderada ( $\text{CAT} = 13,61 \text{ Cd} + 120,71$ ) y un  $r$  de 0,74 ( $R^2 = 54,2\%$ ). Los niveles de TBARS no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ( $F_s = 0,88$ ;  $P > 0,05$ ), oscilando sus valores entre 13,17 y 13,80 nmoles de TBARS/mg de proteínas. Igualmente, la concentración total de GSH en la glándula digestiva no fue modificada significativamente por el tratamiento experimental ( $F_s = 0,89$ ;  $P > 0,05$ ). En las actividades de las enzimas GR ( $F_s = 0,10$ ;  $P > 0,05$ ) y GST ( $F_s = 0,17$ ;  $P > 0,05$ ) no se evidenciaron cambios estadísticamente significativos (Tabla 1).



**Figura 1.** Porcentaje de sobrevivencia a anoxia en *Perna viridis* expuesto a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd y recuperados en el mar.

**Tabla 1.** Niveles de cadmio, metalotioneínas, lipoperoxidación, glutatión reducido, catalasa, glutatión reductasa y S-transferasa en la glándula digestiva de *P. viridis* expuesto a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de cadmio durante siete días y posterior depuración durante 21 días al mar. <sup>1</sup> $\mu\text{g}$  de Cd g peso seco<sup>-1</sup>, <sup>2</sup> $\mu\text{g}$  de MT g peso húmedo<sup>-1</sup>, <sup>3</sup>nmoles de TBARS mg de proteínas<sup>-1</sup>, <sup>4</sup>nmoles de GSH mg de proteínas<sup>-1</sup>, <sup>5</sup> $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ , <sup>6</sup>nmoles de NADPH  $\text{min}^{-1}$ , <sup>7</sup> $\mu\text{moles}$  de GSH-DCBN  $\text{min}^{-1}$ . Las actividades enzimáticas fueron relacionadas con la masa húmeda del tejido. Análisis de rango múltiples al 99,9 %, método de Duncan.

|                     | Tratados           |                               | Recuperados en el mar |                               |
|---------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|                     | Controles          | $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd | Controles             | $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd |
| Cadmio <sup>1</sup> | $0,31 \pm 0,08$    | $6,66 \pm 1,11^b$             | $0,22 \pm 0,07$       | $2,15 \pm 0,77^a$             |
| MT <sup>2</sup>     | $190,20 \pm 22,30$ | $614,00 \pm 187,5^a$          | $176,00 \pm 48,40$    | $571,3 \pm 184,10^a$          |
| TBARS <sup>3</sup>  | $5,88 \pm 1,83$    | $5,83 \pm 1,84$               | $5,28 \pm 0,26$       | $6,08 \pm 0,76$               |
| GSH <sup>4</sup>    | $13,62 \pm 1,50$   | $13,80 \pm 1,56$              | $13,20 \pm 1,49$      | $13,17 \pm 2,51$              |
| CAT <sup>5</sup>    | $133,30 \pm 21,70$ | $209,20 \pm 24,0^a$           | $129,9 \pm 35,50$     | $117,00 \pm 17,60$            |
| GR <sup>6</sup>     | $1,33 \pm 0,42$    | $1,38 \pm 0,20$               | $1,37 \pm 0,27$       | $1,45 \pm 0,59$               |
| GST <sup>7</sup>    | $2,63 \pm 0,43$    | $2,17 \pm 1,09$               | $2,14 \pm 1,04$       | $2,35 \pm 0,79$               |

## DISCUSIÓN

La reducción de la sobrevivencia a la condición anóxica en organismos contaminados con Cd fue significativa, mostrando una diferencia en el tiempo letal medio aproximadamente de tres días con respecto a sus controles. Una de las causas que fundamentan esta sensibilidad en organismos expuestos a Cd está posiblemente asociada a la alteración de su metabolismo anaeróbico. El ingreso de Cd a la glándula digestiva

puede causar la inhibición de las enzimas claves que regulan el catabolismo de carbohidratos (Canesi *et al.*, 1998; Nusetti *et al.*, 2010). Generalmente, la actividad de las enzimas glucolíticas aumenta bajo condiciones anóxicas, sin embargo en organismos contaminados con Cd tales ajustes bioquímicos son alterados, reduciendo la producción de energía y limitando la capacidad de sobrevivir al estrés anóxico (Nusetti *et al.*, 2010). Diversos estudios realizados en bivalvos han mostrado que la exposición a metales pesados en la

columna de agua merma la capacidad de tolerar normalmente condiciones de anoxia y anhidrobiosis (De Zwaan *et al.*, 2001). Kurochkin *et al.* (2009) demostraron que la misma concentración de Cd usada para este bioensayo afecta los niveles de productos de acumulación de la ruta anaeróbicas en la ostra *C. virginica*, lo que sugiere una reducción en la actividad de las enzimas glucolíticas y actividad mitocondrial. De igual manera, Arias-Díaz & García (2001) muestran que cobre (Cu) y plomo (Pb) alteran las actividades de las enzimas glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa en el mejillón *P. viridis*. Zapata-Vívenes & Nusetti (2007) reportaron que concentraciones de hierro/ascorbato pueden conducir a un descenso en la actividades de las enzimas glucolíticas regulatorias primordiales para la producción energética bajo condiciones anóxicas, reduciendo a su vez la tolerancia a resistir atmósferas anóxicas en esta especie. No obstante, los trabajos anteriormente discutidos no muestran la capacidad de recuperación de las respuestas moleculares de los mejillones en *P. viridis* después de un período de depuración.

Un hallazgo importante en este estudio relaciona el incremento en la tolerancia a la anoxia en *P. viridis* pre-expuestos a Cd y recuperados en el mar. Las concentraciones de metalotioneínas (MT) en estos organismos se mantuvieron elevadas, similares a los mejillones expuestos a Cd durante siete días, pero con una disminuida concentración de Cd corporal, sugiriendo que en la glándula digestiva las MT funcionan como moléculas efectivas en la eliminación corporal del metal durante el período de depuración. Las MT pueden evitar las perturbaciones directas del Cd mediante la unión con el metal, transporte a los compartimiento de acumulación (lisosomas) o excreción, lo que podría permitir a *P. viridis* la elongación de la sobrevivencia a eventos anóxicos. Adicionalmente, se sugiere que las MT pueden evitar daños oxidativos, como la peroxidación lipídica, ya que tales metaloproteínas, pre-inducidas con Cd, pueden proteger de los daños de especies reactivas del oxígeno (EROs) a las enzimas glucolíticas regulatorias que mantienen el balance energético crítico durante la anoxia (Zapata-Vívenes & Nusetti, 2007). Esta protección antioxidante podría garantizar el mantenimiento del flujo glucolítico bajo condiciones de anaerobiosis e hipometabolismo que soportan las condiciones de anoxia.

El mejillón *P. viridis* posee una alta capacidad de acumular Cd en la glándula digestiva (Tewari *et al.*, 2001). La presencia de Cd en *P. viridis* colectados en la localidad de la Esmeralda (0,15-0,38  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) deja en evidencia la disponibilidad del este metal para los organismos que habitan dichos ecosistemas costeros.

Zapata-Vívenes *et al.* (2012) reportan promedios similares en mejillones verdes colectados en bancos naturales y de cultivos artesanales del estado de Sucre, mostrando valores de Cd incrementados en organismos colectados hacia la región norte del estado de Sucre (Chacopata-Guayacán), sin embargo, tales niveles de Cd pueden variar en las diferentes épocas del año (Lemus *et al.*, 2010). En algunos estudios de campo, *P. viridis* ha presentado concentraciones significativamente mayores en la glándula digestiva en comparación con los valores encontrados en el sedimento y agua donde habita (Yan *et al.*, 1995). Los niveles de Cd en *P. viridis* previamente contaminados y posteriormente trasplantados al mar sugieren una efectiva capacidad de remoción y desintoxicación del metal a corto plazo (21 días), tales organismos mostraron un descenso significativo (63,5%) en los niveles de Cd contentivos en la glándula digestiva, aunque tales niveles siguen siendo significativamente altos en comparación a su control. Contrariamente, otros autores sugieren que la eliminación del Cd en estos organismos es escasa, considerando un período efectivo de depuración de al menos seis meses (Yan *et al.*, 1995). Posiblemente, algunas condiciones de la dinámica de Ensenada de Turpialito, tales como la disponibilidad de alimentos, calidad del agua y temperatura, sean factores importantes para potenciar los mecanismos moleculares de excreción del Cd en esta especie.

Los marcadores de estrés oxidativo tales como TBARS, GSH y de las actividades de las enzimas GR y GST en *P. viridis* bajo tratamiento no mostraron variabilidad en los distintos grupos experimentales, sólo CAT presentó un incremento en el período de exposición, no así después de la depuración. La actividad de CAT en los organismos expuestos a Cd es una respuesta de protección que evita una posible condición de daño oxidativo inducida por la exposición a Cd. Es bien conocido que la enzima CAT descompone  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ , limitando la sobreproducción de radicales libre de alta toxicidad, tal como  $\text{OH}^*$  (Storey, 1996). Incluso, investigaciones recientes indican que Cd estimula la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) por alteración de la transferencia de electrones en las mitocondrias (Sokolova, 2004). Se han reportados incrementos en las defensas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, y una súbita producción de lípidos peroxidados, cuando *P. viridis* es expuesta durante 15 y 30 días a concentraciones de Cd superiores a las utilizadas en este estudio (Prakash & Jagannatha-Roa, 1995; Rajkumar & Milton, 2011). Se infiere que las incrementadas concentraciones de MT durante el

período de exposición y depuración garantizan una mayor efectividad, tanto en la protección molecular contra los niveles de Cd contenidos en la glándula digestiva, como en la eliminación de EROs.

Es conocido que la anoxia puede provocar consecuencias moleculares deletéreas propias de una condición de estrés oxidativo, a pesar de no existir oxígeno disponible. En algunos invertebrados marinos existen evidencias que señalan el decrecimiento en la generación de las EROs durante la anoxia, y luego incrementando durante la reoxigenación (Zenteno-Savin *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios recientes muestran que las EROs son producidas continuamente durante la anoxia/hipoxia en diferentes modelos animales. De Oliveira *et al.* (2005) demostraron incrementos en los productos de lipoperoxidación durante la anoxia en el cangrejo del Atlántico *Chasmagnathus granulata* después de 8 h de anoxia, no así se encontró variaciones en las defensas antioxidantes. De Almeida *et al.* (2007) encontraron en el mejillón marrón *P. perna* daños oxidativos en el ADN y lipoperoxidación después de 24 h de exposición a anhidrobiosis. Sánchez (2013) encontró incrementos significativos en los niveles de TBARS en *P. viridis* bajo condiciones de anhidrobiosis y anoxia, tales valores pueden ser aumentados con la exposición a metales pesados como Cu y Cd.

En organismos bajo hipometabolismo inducido por condiciones anóxicas se ha demostrado la elevación de las defensas antioxidantes y/o regulación de genes que codifican tales enzimas (De Almeida & Di Mascio, 2011). Estos mecanismos forman parte de las estrategias bioquímicas de preparación contra los daños de EROs por reintroducción del oxígeno (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2005). Al parecer el incremento de las MT en la glándula digestiva de *P. viridis* pre-expuestos a Cd y depurados en el mar evita la posible alteración del sistema antioxidante (Zapata-Vívenes & Nusetti, 2007). Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que la exposición a corto plazo de Cd reduce significativamente la sobrevivencia de *P. viridis* a la anoxia prolongada. Sin embargo, propicia en organismos depurados indirectamente una mayor tolerancia, mediada posiblemente por niveles de MT elevados. Al parecer, los niveles de MT en organismos pre-expuestos a Cd tienen implicaciones importantes que podrían favorecer al organismo a incrementar su capacidad de sobrevivencia al estrés anóxico.

## REFERENCIAS

Almeida, E.A., A.C. Dias-Bainy, A.L. Dafre, O.F. Gomes, M. Madeiros & P. Di Mascio. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna*

*perna*) exposed to air and re-submersed. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 318: 21-30.

Arias-Díaz, A. & J. García. 2001. Concentración de metales pesados Cu y Pb y su relación con la actividad enzimática de glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa en el mejillón *Perna viridis*. Zootec. Trop., 19(1): 115-129.

Canesi, L., C. Ciacci, G. Piccoli, V. Stocchi, A. Viarengo & G. Gallo. 1998. *In vitro* and *in vivo* effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. Comp. Biochem. Physiol. C, 120: 261-268.

Cheung, C.C.C., W.H.L. Siu, B.J. Richardson, S.B. Deluca-Abbott & P.K.S. Lam. 2004. Antioxidant responses to benzopyrene and Aroclor 1254 exposure in the green mussel, *Perna viridis*. Environ. Pollut., 128: 393-403.

Chidambaran, N. 1996. The green mussel *Perna viridis* as indicator of cadmium pollution. J. Environ. Biol., 17(1): 5-10.

Dailianis, S. & M. Kaloyianni. 2004. Cadmium induce both pyruvate kinase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity through protein kinase C mediated signal transduction, in isolated digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* (L). J. Exp. Biol., 207: 1665-1674.

De Almeida, E.A. & P. Di Mascio. 2011. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. In: A. Nowakowska & M. Caputa (eds.). Hypometabolism: strategies of survival in vertebrates and invertebrates. Research Singpost, Kerala, India, pp. 39-55.

De Almeida, E., A. Dias, A. De Melo, G. Martínez, S. Miyamoto, J. Onuki, L. Fujita, C. Carriao, F. Manso, G. Ronsein, C. Sigolo, C. Barbosa, A. Gracioso, M. Gennari & P. Di Mascio. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidant, lipid peroxidation and DNA damage. Comp. Biochem. Physiol. A, 146: 588-600.

De Oliveira, U.O., A.S.R. Araujo, A. Bello-Klein, R.S.M. Silva & L.C. Kucharski. 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Comp. Biochem. Physiol. B, 140: 51-57.

De Zwaan, A., P.G. Cortesi & O. Cattani. 1995. Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. Sci. Total Environ., 171: 121-125.

De Zwaan, A., P. Cattani, O.G. Vitali & P. Cortesi. 2001. Influence of incubation conditions on the anoxic survival of marine bivalves. Static and semi-static incubations. Mar. Ecol. Prog. Ser., 211: 169-179.

Di Guilio, R.T., W.H. Benson, B.M. Sander & P.A. Vanveld. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism,

- adaptation and toxicity. In: G.M. Rand (ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC Editions, New York, pp. 223-255.
- Ellman, G.L. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch. Biochem. Biophys., 74: 443-450.
- Hamilton, M.A., C.R. Russo & R.V. Thurston. 1977. Trimmed Sperm-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. Libr., 11: 714-719.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: K.B. Storey (ed.). Functional metabolism: regulation and adaptation, John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 319-368.
- Hermes-Lima, M., J.M. Storey & K.B. Storey. 1998. Antioxidant defences y metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snail. Comp. Biochem. Physiol., 120: 437-448.
- Hochachka, P.W. & G.N. Somero. 2002. Biochemical adaptations: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, pp. 101-123.
- Khoo, H.W. & K.H. Patel. 1999. Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel, *Perna viridis*. J. Exp. Zool., 284(4): 445-453.
- Krishnakumar, P., P. Asokan & V. Pillai. 1996. Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis*. Aquat. Toxicol., 18(3): 163-1734.
- Kurochkin, I.O., A.V. Ivanina, S. Elier, C. Downs, L.A. May & M. Sokolova. 2009. Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 297: 1262-1272.
- Ladare, K. & K. Storey. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrate. Cell and molecular responses to stress. In: K.B. Storey & J.M. Storey (eds.). Sensing, signaling and cell adaptation. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 1-24.
- Lemus, J., C. Laurent, A. Acagua, M. Cabrera, A. Aponte & K. Chung. 2010. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, península de Araya, Edo. Sucre Venezuela. Biologist, 8: 126-138.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randal. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- Martínez, G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos del golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Universidad de Oriente, 41: 83-93.
- Márquez, A., J. Bonilla, G. Martínez, W. Senior, D. Aguilera & A. González. 2005. Estudio geoquímico de los sedimentos superficiales del litoral nororiental del golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Universidad Oriente, 44(2): 89-103.
- Ng, T.Y., P.S. Rainbow, C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard & W.X. Wang. 2007. Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. Aquat. Toxicol., 84: 153-161.
- Nuseti, O., M.M. Esclapés, S. Nuseti, E. Zapata, L. Marcano & C. Lodeiros. 2004. Defensas inmunológicas y estrés oxidativo en el bivalvo marino *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteriidae) Expuesto a niveles subletales de Fuel Oil No 6. Interciencias, 29(5): 1-6.
- Nuseti, O., M. Tovar & E. Zapata-Vívenes. 2010. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subject anoxic and aerobic conditions. J. Shellfish. Res., 29(1): 203-208.
- Prakash, M.T. & K.S. Jagannatha-Roa. 1995. Modulations of antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalves *Perna viridis* during heavy metal exposure. Mol. Cell. Biochem., 146(2): 107-113.
- Rajkumar, J.S.I. & M.C.J. Milton. 2011. Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under longterm toxicity test. Inter. J. Pharma. Bio. Sci., 2:(83): 50-59.
- Sánchez, G. 2013. Defensas antioxidantes en *Perna viridis* (Bivalvia: Mitilidae) bajo condiciones de anoxia, anhidrobiosis y reoxigenación, previa exposición a metales pesados. Tesis de Magister Scientiarum en Biología Aplicada, mención Ecotoxicología. Universidad de Oriente, Estado Sucre, 102 pp.
- Sokal, R. & F.J. Rohlf. 1979. Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume. Ediciones, Madrid, 872 pp.
- Sokolova, I.M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). J. Exp. Biol., 207: 2639-2648.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res., 29(12): 1715-1733.
- Tewari, A., H.V. Joshi, C. Raghunathan, V.G. Sravan & Y. Khambhaty. 2001. Effect of heavy metal pollution on growth, carotenoid content and bacterial flora in the gut of *Perna viridis* (L.) *in situ* condition. Curr. Sci., 81(7): 819-828.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., D.A. Holwerda & D.I. Zandee. 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. Arch. Environ. Toxicol., 20: 259-265.



- Verlecar, X.N., K.B. Jena & G.B. Chainy. 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem. Biol. Interact.*, 167(3): 219-226.
- Viarengo, A., E. Ponzano, F. Dondero & R. Fabbri. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44: 69-84.
- Winston, G.W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 110: 173-176.
- Yan, M.S., S.T. Chui & M.H. Wang. 1995. Uptake, depuration and cellular distribution of cadmium in various tissues of *Perna viridis*. *Biomed. Environ. Sci.*, 8(2): 176-185.
- Zapata-Vívenes, E. & O. Nusetti. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shellfish Res.*, 26(2): 1-10.
- Zapata-Vívenes, E., L. Rojas-Astudillo, G. Sánchez & M. Barreto. 2012. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) colectado en costas del estado Sucre, Venezuela. *Cienc. Mar.*, 38(3): 517-528.
- Zenteno-Savin, T., R. Saldierna & M. Ahuejote-Sandoval. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 142(3-4): 301-308.

*Received: 1 July 2013; Accepted: 20 May 2014*