

# METALOTIIONINAS, GLUTATION Y CONSUMO DE OXÍGENO EN EL BIVALVO *Perna viridis* EXPUESTO A CADMIO

## Metallothionein, Glutathione and Oxygen Consumption in *Perna viridis* Exposed to Cadmium

Mairin Lemus<sup>1,3,\*</sup>, Leidys Marín<sup>2</sup>, Aulo Aponte<sup>3</sup> y Kyun Chung<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, telf 0293-4002157 y 04248252008. Venezuela. mlemus88@gmail.com. <sup>2</sup>Escuela de Ciencias, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán. Universidad de Oriente. Venezuela.

<sup>4</sup>Departamento de Biología Marina, Instituto oceanográfico de Venezuela.

### RESUMEN

La evaluación de respuestas fisiológicas y bioquímicas en organismos acuáticos expuestos a metales ha resultado una herramienta valiosa para conocer la salud de los organismos en los ecosistemas. En el presente trabajo se evaluó el efecto crónico del cadmio sobre los niveles de metalotioninas (MTs), glutatión (GSH), proteínas totales y consumo de oxígeno en *Perna viridis*. Se establecieron tres grupos experimentales: control, expuestos a 0,1 mg/L y 1 mg/L de cadmio (Cd) durante 21 días, estos dos últimos con renovación de agua y metal cada 24 horas. Los análisis de MTs y GSH fueron realizados por métodos espectrofotométricos utilizando ácido dinitrobenzoico (DTNB), proteínas totales por el método de Bradford y el consumo de oxígeno por el método de Winkler. Los resultados obtenidos demostraron que se produjo un aumento significativo en la síntesis de MTs y GSH en el hepatopáncreas de los ejemplares expuestos a la concentración de 1 mg/L de Cd, resultados similares fueron obtenidos para el manto. Las MTs del músculo, branquias y el resto de tejidos no fueron afectadas durante la exposición a Cd, a excepción de un aumento significativo de esta proteína en las branquias a la dosis de 0,1 mg/L de Cd. El consumo de oxígeno disminuyó en función a la concentración del Cd. Este metal posiblemente activó la síntesis de MTs y de GSH, particularmente en el hepatopáncreas y manto, para compensar el daño causado por el Cd. Estos mecanismos no comprometieron los niveles proteicos de los tejidos, lo que permite sugerir que los organismos contrarrestan el efecto del metal sin comprometer las proteínas tisulares, particularmente en hepatopáncreas y manto.

**Palabras clave:** Cadmio, estrés oxidativo, glutatión, metalotioninas, *Perna viridis*.

### ABSTRACT

Physiological and biochemical responses in aquatic organisms exposed to metals have proved a valuable tool to determine the health of organisms in ecosystems. The effects of cadmium on metallothionein (MTs), glutathione (GSH), total protein and oxygen consumption in *Perna viridis* were evaluated during chronic exposure to Cd. Three experimental groups were established: control, exposed to 0.1 and 1 mg/L Cd for 21 days, the water and metal were replacement every 24 hours. MTs and GSH were performed by spectrophotometric methods using 5, 5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), total protein by the method of Bradford and oxygen consumption by the Winkler method. The results showed that there was a significant increase in the synthesis of MTs and GSH in the liver of organism exposed to 0.1 and 1 mg/L of Cd, similar results were obtained for the mantle. The MTs of the muscle, gills and rest were not affected except for a significant increase of this protein in gills at the dose of 0.1 mg/L of Cd. Oxygen consumption decreased in relation to Cd. The increase in MTS and GSH, particularly in the hepatopancrea and mantle could ameliorate the damage caused by Cd. These mechanisms did not compromise protein levels in tissues, which may suggest that organisms counteract the effect of metal efficiently without compromising the tissue proteins, particularly in the hepatopancrea and mantle.

**Key words:** Cadmium, glutathione, metallothionein, oxidative stress, *Perna viridis*.

### INTRODUCCIÓN

Los Mytilidos, particularmente *Perna viridis* representa un recurso pesquero de importancia económica para Venezuela en la actualidad y con un alto potencial para el cultivo, aún

cuando es una especie invasora que ha logrado propagarse a muchos de los ecosistemas de las costas orientales del país, desplazando a la especie *Perna perna* [27] la cual ha demostrado ser más sensible a los cambios de salinidades y temperaturas que la primera [28].

Debido a la gran capacidad que presentan algunos organismos, particularmente los bivalvos para incorporar los metales, se han utilizado como biomonitores, tal es el caso de los mejillones que han representado uno de los modelos biológicos más importantes para la evaluación de contaminación en ambientes naturales y su uso bajo condiciones de laboratorio [19, 27]. Estas evaluaciones han permitido establecer, además del grado de impacto causado por metales en los ecosistemas, normar los límites máximos permisibles para el consumo humano.

Se ha demostrado que ejemplares de *P. viridis*, provenientes de la costa Norte del estado Sucre, Venezuela, presentan niveles de cadmio (Cd) de  $1,20 \pm 0,52 \mu\text{g/g}$  de masa seca como valor promedio en diferentes épocas del año [19], lo cual se considera una concentración significativamente elevada cuando se compara con los estudios llevados a cabo por Rojas-Astudillo y col. [26], quienes reportaron una concentración promedio para localidades cercanas de  $0,16 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$  de peso húmedo (aproximadamente  $0,53 \mu\text{g/g}$  de peso seco) en estudios anteriores. Estos valores demuestran una bioacumulación del metal en los últimos 10 años para esta especie comercial y cuya concentración se encuentra por encima del nivel máximo permitido para consumo humano por La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), pero por debajo de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2003), que establece niveles máximos permisibles para el consumo de mariscos de  $4,0 \mu\text{g/g}$  de peso húmedo [13, 14].

El incremento en la concentración de cadmio en productos marinos representa una de las principales fuentes de incorporación en el ser humano, lo que se traduce en una magnificación de este elemento tóxico, ocasionando alteraciones que van desde efectos a nivel inmunológico y neurológico hasta daños en el ADN, que consecuentemente pueden producir cáncer [17].

Como se ha señalado en numerosos trabajos, el Cd es uno de los elementos más tóxicos, pues tiene una toxicidad similar a la del mercurio; posiblemente se enlace a residuos de cisteína de moléculas, tales como el glutatión (GSH) [7, 16], MTs y otros péptidos que unen selectivamente al Cd [15, 20, 24]. Las MTs y GSH representan una de las primeras líneas de defensa del organismo, no solo porque enlazan los metales sino porque están involucrados en la remoción de especies reactivas de oxígeno [22].

Dada la gran importancia del *P. viridis* como recurso pesquero y la conservación de esta especie, es necesario que los estudios en el área de toxicidad permitan dilucidar los efectos tóxicos, considerando la capacidad de incorporación, com-

partimentación y los efectos fisiológicos y bioquímicos durante exposiciones crónicas al Cd. Los ajustes metabólicos que ocurren en los organismos sometidos a estrés causado por xenobióticos, particularmente los metales pesados, modifican el metabolismo basal y la tasa metabólica. El consumo de oxígeno y la tasa de filtración son dos de los procesos fisiológicos que permiten establecer el estado metabólico en los invertebrados marinos. La alteración de estos procesos fisiológicos son ampliamente usados para detectar alteraciones metabólicas en organismos al ser expuestos a variaciones de factores exógenos, tales como temperatura o salinidad, así como efectos de tóxicos [2, 23].

En este trabajo se evaluó el efecto de dosis subletales de Cd sobre los niveles de MTs, GSH, proteínas totales y el consumo de oxígeno en *P. viridis*, en condiciones de laboratorio durante 21 días (d).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Captura de ejemplares

Los ejemplares de *P. viridis* se colectaron en la localidad de Guayacán, situada en la costa norte de la península de Araya, estado Sucre a  $63^\circ 55' 45 \text{ O}$  y  $11^\circ 35' 21 \text{ N}$  determinadas con un equipo de GPS (Global Positioning System) Garmin Oregon, modelo 450T, España. Estos organismos fueron mantenidos en envases de 3 L de capacidad, conteniendo agua de mar para realizarles su período de aclimatación durante 7 d, éstos fueron alimentados cada 24 h con 3 mL de microalgas cultivadas, *Isocrisis galbana*.

### Tratamiento experimental

Ejemplares con longitud promedio de  $76,19 \pm 15,62 \text{ mm}$  de longitud antero posterior, fueron expuestos a concentraciones subletales de Cd, de  $0,1 \text{ mg/L}$  y  $1 \text{ mg/L}$  durante 21 d. Estos bioensayos fueron realizados por triplicado con su respectivo control, manteniendo una densidad de 1 organismo/L. Los envases se cubrieron con tapas de plástico, se mantuvieron aireados con bombas eléctricas HAILEA, modelo ACO-9903, China, los recambios de agua y metal se realizaron cada 24 h. La salinidad se midió con un conductímetro YSI 3100 Chipre, obteniéndose un valor de 36 ups, y la temperatura fue de  $25,5 \pm 1,50^\circ\text{C}$ .

### Determinación de metalotioninas (MTs)

La extracción de las MTs se realizó empleando la metodología propuesta por Viarengo [32]. El precipitado obtenido fue resuspendido en  $150 \mu\text{L}$  de NaCl  $0,25 \text{ mol/L}$ ,  $150 \mu\text{L}$  de HCl  $1 \text{ mol/L}$  y EDTA  $4 \text{ mmol/L}$  y luego se cuantificó siguiendo la metodología de Ellman [9]. La concentración de grupos -SH (sulfhidrilos) fue estimada utilizando la curva patrón de glutatión reducido (GSH) con concentraciones de 0; 5; 10; 20 y  $30 \mu\text{mol/mL}$ . Para obtener las concentraciones de MTs se consideró que  $1 \text{ mmol GSH} = 0,055 \text{ mmol/L}$  de MTs y fueron expresadas en  $\mu\text{g}$  de MTs/mg proteínas [18].

### Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)

La determinación de la concentración de GSH se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Beutler [3], previa homogenización de tejido en buffer Tris-HCl 20 mol/L a pH 8,6 en una relación 1:3 p/v. Posteriormente, a 2 mL del sobrenadante se le añadieron 8 mL de buffer fosfato 0,2 mmol y pH 7,5 y 1 mL del reactivo DTNB 0,4% en buffer fosfato, y se midieron inmediatamente en un spectronic Milton Roy, modelo 21D, EUA, a 412 nm. Se preparó un blanco de reactivo con 8 mL de buffer fosfato. Se realizó una curva de calibración para GSH reducido de concentraciones comprendidas desde 5 hasta 25  $\mu\text{mol/mL}$ .

### Determinación de proteínas totales

Del homogenizado de cada uno de los tejidos se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  por duplicado y se cuantificaron las proteínas utilizando el método de Bradford [4]. Para la preparación de la curva de calibración se utilizó un estándar de albúmina de suero de Bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) de 50 mg/dL marca Sigma.

### Determinación del consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se determinó por respirometría de sistema cerrado, mediante el método de Winkler [30].

Utilizando frascos de 500 mL con tapa de rosca, de cierre hermético, cada uno de los frascos se llenó con agua de mar filtrada, colocando un animal por frasco de cada condición experimental y dejando uno con agua de mar solamente (Control); una vez introducidos los animales, se taparon los frascos y se sumergieron en un baño María UNIVERSAL, modelo OE3707, México, a la temperatura experimental (26°C) por una hora. Inmediatamente se destaparon los frascos y se extrajeron 50 mL y se le colocó 1,0 mL de solución de sulfato de manganeso y 1,0 mL de la solución de yoduro alcalino, con la finalidad de fijar el oxígeno. Se taparon evitando la formación de burbujas en su interior, mezclando mediante agitación. Luego se dejó que el precipitado formado se depositara en el fondo del frasco. Se agregó 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se tapó y se agitó nuevamente con el fin de que todo el precipitado se disolviera y finalmente se agregaron 5 gotas de la solución indicadora de almidón.

La muestra tratada se colocó en un beaker de 250 mL y se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0,1 N, hasta que el color amarillo del yodo casi desapareciera y se concluye la titulación hasta quedar incolora, tomándose nota de los mililitros gastados.

El consumo de oxígeno ( $\text{O}_2/\text{h}$ ) de cada animal se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

Obtención del oxígeno disuelto ( $\text{O}_2$  dis):

Ecuación del consumo de oxígeno:

$$\text{mg}/\text{LO}_2 \text{ (ppm)} = (800 \times \text{mL tiosulfato} \times \text{normalidad tiosulfato}) / \text{mL muestra titulada}$$

Consumo de  $\text{O}_2 = \text{O}_2$  dis (control) –  $\text{O}_2$  dis Muestra.

### Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas en el contenido de GSH, MTs, proteínas totales y el consumo de oxígeno, entre las dosis del metal aplicadas y el grupo control en los diferentes tejidos del mejillón *P. viridis*, se aplicó un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95%, previo análisis de normalidad de datos y homogeneidad de las varianzas. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico STATGRAPHIC centurión XVI [29].

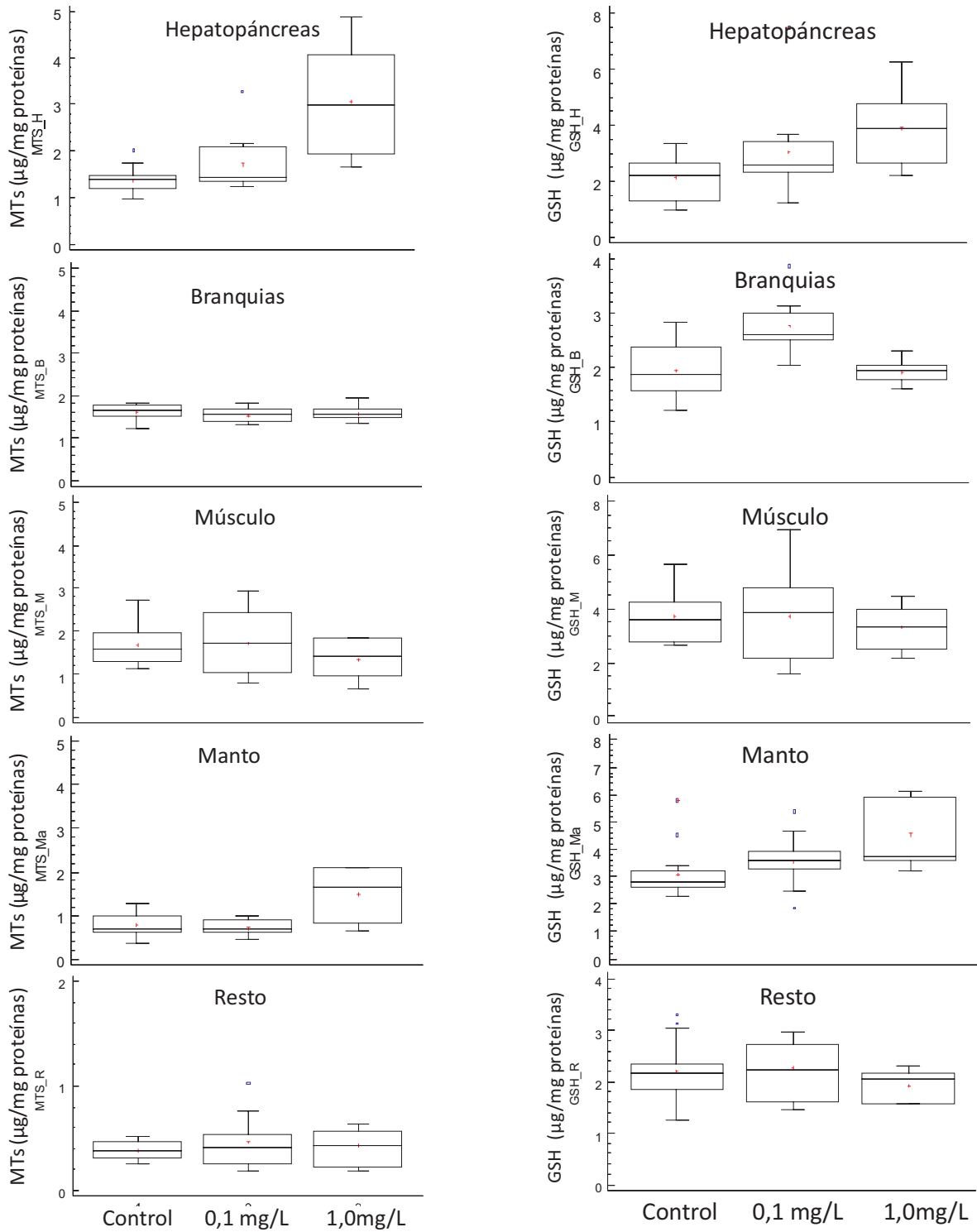
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que, ejemplares de *P. viridis* expuestos a dosis de 0,1 y 1 mg de Cd/L durante 21 d, presentaron alteraciones significativas en los niveles de MTs ( $F_s=14,60$ ;  $P=0,000$ ) y GSH ( $F_s=5,16$ ;  $P=0,012$ ) en el hepatopáncreas y manto (MTs,  $F_s=12,28$ ;  $P=0,0001$  y GSH,  $F_s=5,84$ ;  $P=0,0092$ ). En el hepatopáncreas hubo un incremento significativo de los niveles de MTs desde  $1,623 \pm 0,193$  hasta  $3,071 \pm 0,185$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales a la dosis de 1 mg/L de Cd, lo cual corresponde a aproximadamente dos veces la concentración basal (FIG. 1). Los niveles de GSH se incrementaron en los ejemplares expuestos a Cd, en una proporción similar (FIG. 1). Los valores promedios fueron de  $3,186 \pm 1,662$  y  $3,892 \pm 1,366$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales, para 0,1 y 1 mg/L de Cd respectivamente, mientras que los controles presentaron un valor de  $2,145 \pm 0,798$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales.

En mejillones, el incremento de la producción de MTs es mediado por el ingreso de Cd a la glándula digestiva y esta proteína es capaz de interactuar directamente con metales para promover su inactivación, metabolización o excreción [31, 33]. También neutraliza los radicales libres particularmente los OH [30] que son producidos por la gran afinidad del Cd por muchas moléculas, y su capacidad para la formación de los mismos y de esta forma interfieren con el normal funcionamiento de muchas enzimas [19]. Esta respuesta forma parte del mecanismo para controlar la toxicidad del metal.

Estos resultados demuestran la activa participación de las MTs y el GSH en el tejido hepático en la neutralización de este metal, como ya ha sido planteado en numerosos invertebrados marinos [11, 24].

Los trabajos realizados sobre la incorporación de Cd en el manto y su efecto sobre las MTs y el GSH son escasos. Sin embargo, se halló que los ejemplares expuestos al 1,0 mg/L de Cd incrementaron significativamente los niveles de MTs, a una concentración de  $1,461 \pm 0,583$  con respecto a los ejemplares no expuestos, que presentaron un valor de  $0,781 \pm 0,280$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales (FIG 1). Aún cuando las concentraciones de MTs en el manto son inferiores a las detectadas para el hepatopáncreas, también experimentan una inducibilidad causada por el metal. Por otro lado, se determinó una elevación de los niveles de GSH en este tejido (FIG. 1), mos-



**FIGURA 1. METALOTIONINAS Y GLUTATIÓN (µg/mg PROTEÍNAS TOTALES) EN EL HEPATOPÁNCREAS (H), BRANQUIAS (B), MÚSCULO (M), MANTO (Mto) Y RESTO (R) DE MEJILLONES VERDES *PERNA VIRIDIS* EXPUESTOS A 0,1 mg/L Y 1 mg/L DE CADMIO DURANTE 21 DÍAS. Para MTs en: H, Fs = 14,60\*\*\*; B, Fs = 0,62ns; M, Fs = 1,03ns; Mto, Fs = 12,28\*\*\* y R, Fs = 0,68ns. Para GSH: H, Fs = 5,16\*\*; B, Fs = 13,61\*\*\*; M, Fs = 0,34ns; Mto, Fs = 5,84\*\* y R, Fs = 0,89ns.**

trando un patrón similar al observado para el tejido hepático con concentraciones de  $3,742 \pm 0,793$  y  $4,561 \pm 1,265$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales para para los ejemplares expuestos a 0,1 y 1 mg/L de Cd, respectivamente, en comparación con  $3,081 \pm 0,897$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteínas totales para el control.

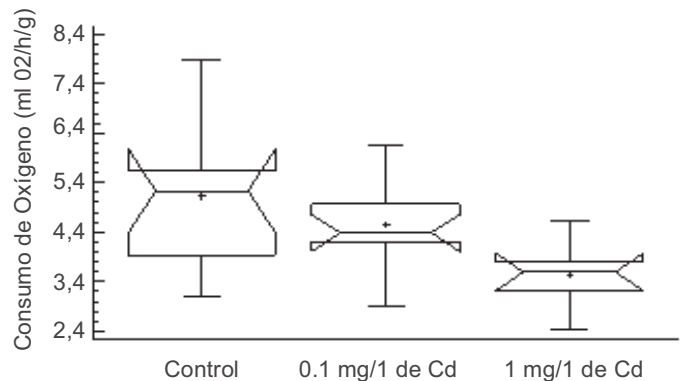
El aumento de las MTs y el GSH en ambos tejidos (hepatopáncreas y manto) sugiere la participación conjunta de ambas moléculas en la toxicidad del Cd. Se ha planteado que el GSH puede enlazar el ión metálico e inactivarlo o transferirlo a las moléculas de MTs para que puedan ser eliminados de la célula. Aunque este mecanismo no se conoce claramente, se ha planteado que el GSH puede fácilmente enlazarse a iones metálicos y de manera estable transferir éste a grupos -SH de las MTs [5].

El GSH parece jugar un papel importante en el manto, aumentando en función de la concentración de Cd. Este tejido tiene como función principal segregar la concha e intervenir en las actividades respiratorias. Se ha demostrado claramente el efecto del Cd a nivel de la cadena transportadora de electrones [25]; el efecto tóxico del metal produce la liberación del Citocromo C y la formación de radicales libres, que también inducirían un aumento de MTs [6, 8, 30]. Por ser un tejido con alta vascularización, posiblemente juegue un papel metabólicamente activo sintetizando MTs y otras proteínas ante la presencia del Cd, al igual que en el hepatopáncreas. Se sabe que el Cd puede sustituir al calcio y es posible que el Cd esté afectando el mecanismo de incorporación del metal en la concha. Por otro lado, se ha establecido que este metal induce una acidosis interna general, una liberación del mismo y una inhibición de la reabsorción de calcio afectando la biomineralización de la concha [12].

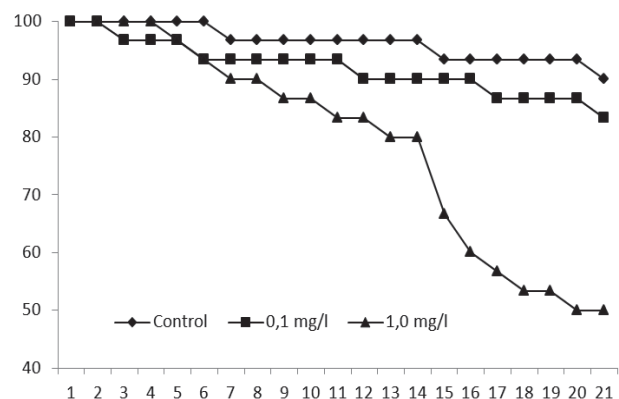
Aunque en las branquias no se observó un incremento en las MTs, el GSH si incrementó en los organismos expuestos a 0,1  $\mu\text{g}$  Cd/L (FIG. 1). Esto indica que, el tejido branquial de *P. viridis*, expuesto a la dosis más baja del metal incrementa la síntesis del tripeptido, para neutralizarlo, sin involucrar la inducción de otros sistemas mas complejos como es el caso de las MTs. Durante exposiciones superiores (1,0  $\mu\text{g}$  Cd/L) no se observa este tipo de respuesta, sino que por el contrario, los organismos recurrieron a estrategias de cierre valvar, que posiblemente minimizó la superficie de exposición al tóxico y por ende, la tasa de incorporación del metal. Esto pudo haber determinado que no se manifestaran efectos en la concentración de MTs y GSH cuando son expuestos a esta dosis.

Estos resultados llevan a plantear que, otros factores están influenciando la inhibición en la producción de MTs en el tejido branquial en ejemplares expuestos a 1 mg de Cd/L y posiblemente el estrés causado por el metal induce la activación del metabolismo anaeróbico como consecuencia del cierre de las valvas. Esto se puede sustentar por la elevada tasa de mortalidad observada en los organismos expuestos a la mayor dosis (FIG 3). Está bien documentado que, cuando existen condiciones extremas en su entorno, los bivalvos actúan ce-

rrando sus valvas y modificando su proceso respiratorio [2]. Un proceso fisiológico similar fue demostrado cuando el bivalvo *Ruditapes decussatus* fue expuesto a metales pesados y mostró una disminución en la tasa respiratoria y cierre valvar, pero cuando fue colocado en depuración recuperó la abertura de las valvas, la extensión del sifón, protrusión del pie e incrementó la excreción de amonio, lo cual fue sinónimo de una buena salud del bivalvo [10].



**FIGURA 2. CONSUMO DE OXIGENO DE LOS MEJILLONES VERDES *PERNA VIRIDIS* EXPUESTOS A 0,1 mg/L Y 1 MG/L DE CD DURANTE 21 DÍAS. FS = 7,0472, P = 0,0294.**



**FIGURA 3. MORTALIDAD DE *PERNA VIRIDIS* EXPUESTOS A 0,1 Y 1 mg/ L DE CD DURANTE 21 DÍAS.**

Lo anteriormente planteado concuerda con la caída en el consumo de oxígeno experimentada por los ejemplares expuestos al Cd (FIG. 2). Esto se le puede atribuir a mecanismos de defensa que fueron adoptados por los organismos para contrarrestar la presencia del tóxico y de esta manera impedir que sus condiciones fisiológicas se debiliten. Otros autores también han observado un decrecimiento en el consumo de oxígeno como resultado del incremento de la concentración de tóxicos. [21,23]. Aunque, hubo una disminución del metabolismo causado por la caída del consumo de oxígeno, no se presentaron diferencias significativas del contenido de proteínas en los tejidos analizados a excepción del músculo (TABLA I) que presentó una concentra-

TABLA I  
**PROTEÍNAS TOTALES ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  DE TEJIDO HÚMEDO) EN HEPATOPÁNCREAS, BRANQUIAS, MÚSCULO MANTO Y RESTO DE *PERNA VIRIDIS* EXPUESTOS A 0,1 y 1,0 mg/L DE Cd DURANTE 21 DÍAS.**

	Hepatopáncreas	Branquias	Músculo	Manto	Resto
Control	219,58 $\pm$ 101,73	131,83 $\pm$ 86,65	19,44 $\pm$ 3,56 <sup>a</sup>	28,91 $\pm$ 10,26	33,00 $\pm$ 16,45
0,1 mg/L Cd	289,47 $\pm$ 124,30	145,19 $\pm$ 68,85	20,40 $\pm$ 4,07 <sup>ab</sup>	23,83 $\pm$ 6,25	30,21 $\pm$ 10,58
1 mg/L Cd	240,19 $\pm$ 87,77	172,27 $\pm$ 46,15	26,32 $\pm$ 5,23 <sup>b</sup>	35,10 $\pm$ 20,08	38,70 $\pm$ 9,52
Prueba Fs	0,24ns	0,73ns	7,07*	2,14ns	2,24ns

\*diferencias significativas  $P > 0,05$ . ns= no hay diferencias significativa.

ción significativamente más elevada en los ejemplares expuestos a 1 mg/L, pudiendo estar asociada a un aumento del metabolismo anaeróbico en el organismo.

La disminución del consumo de oxígeno podría estar relacionada con la capacidad que presenta el Cd, de asociarse a muchas proteínas del epitelio branquial inactivando enzimas claves de la fosforilación oxidativa. Estudios llevados a cabo en el bivalvo *P. perna* y *Donax trunculus* expuestos a metales bajo condiciones de laboratorio han demostrado una inhibición de la citocromo oxidada y una reducción en la tasa de consumo de oxígeno, respectivamente [2,23].

Por otro lado, diversos estudios han señalado que el Cd, a niveles subletales, en los tejidos de vertebrados e invertebrados inducen alteraciones de diversas respuestas enzimáticas y de señales de transducción que modulan los procesos de fosforilación y defosforilación (inhibición o estimulación de proteínas kinasas o fosfatasa) importantes en el control de diversas funciones fisiológicas [1].

En síntesis, *P. viridis* es capaz de inducir respuestas bioquímicas, como fue el incremento de MTs y GSH en el tejido hepático y el manto, cuando está expuesto a dosis de 0,1 y 1 mg/L de Cd. En branquias por el contrario, sólo el GSH parece ser el mecanismo contra la toxicidad a bajas dosis de Cd. Estos mecanismos activados afectan el metabolismo de organismos causando una disminución del consumo de oxígeno con una respuesta dosis efecto. El cierre valvar parece ser una estrategia en el comportamiento de estos bivalvos para minimizar la incorporación de cadmio a la dosis de 1 mg de Cd/L, siendo esta concentración muy tóxica (FIG. 3), pues solo el 50% de los organismos sobrevivieron durante 21 d de exposición.

## CONCLUSIONES

Se demostró que el cadmio es un metal altamente tóxico para *P. viridis* en dosis iguales o superiores a 0,1 mg/L, causando no solo inducción de MTs y GSH en el tejido hepático y el manto como respuestas bioquímicas, sino que causó un 50% de mortalidad a la dosis de 1 mg/L durante exposiciones crónicas. Esto se vió reflejado en una disminución en el consumo de oxígeno, comprometiendo la salud de los organismos por un incremento energético producto del metabolismo anaeróbico. Consecuentemente, la presencia de cadmio compro-

mete el recurso pesquero y a su vez la salud humana, como consumidor.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, T.; SAYDAM, N.; STEINER, F.; SCHAFFNER, W.; FREEDMAN, J. Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. **Environ. Health Perspect.** 110: 813-817. 2002.
- [2] ANADRAJ, A.; MARSHALL, D.; GREGORY, M.; MCCLURG, T. Metal accumulation, filtration and O uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . **Comp. Biochem. Physiol.** 132: 355-363. 2002.
- [3] BEUTLER, E.; DURON, O.; MIKUS, B. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** 61: 882-888. 1963.
- [4] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254. 1976.
- [5] BROUWER, M.; BROUWER-HOEXUM, T.; CASHON, R. A putative glutathione binding site in CdZn-metallothionein identified by equilibrium binding and molecular modelling studies. **Biochem.** 294: 219-225. 1993.
- [6] BUICO, A.; CASSINO, C.; DONDERO, F.; VERGANI, L.; OSELLA, D. Radical scavenging abilities of fish Mt-A and mussel Mt-10 metallothionein isoforms: An ESR study. **J. Inorg. Biochem.** 102(4): 921-92. 2008.
- [7] CANESI, L.; VIARENGO, A.; LEONZIO, C.; FILIPPELLI, M.; GALLO, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquat. Toxicol.** 46(1): 67-76. 1999.
- [8] CHELOMIN, V.P.; ZAKHARTSEV, M.V.; KURILENKO, A.V.; BELCHEVA, N.N. An *in vitro* study of the effect of reactive oxygen species on subcellular distribution of deposited cadmium in digestive gland of mussel *Crenomytilus grayanus*. **Aquat. Toxicol.** 73(2): 181-189. 2005.
- [9] ELLMAN, G. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7: 88-95. 1958.

- [10] EL-SHENAWY, N.S. Heavy-metal and microbial depuration of the clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. **Environ. Toxicol.** 19: 143-153. 2004.
- [11] FARIA, M.; CARRASCO, L.; DIEZ, S.; RIVA, M.C.; BAYONA, J.M.; BARATA, C. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metal. **Comp. Biochem. Physiol.** 149(3): 281-288. 2009.
- [12] FAUBEL, D.; LOPES-LIMA, M.; FREITAS, S.; PEREIRA, L.; ANDRADE, J.; CHECA, A.; FRANK, H.; MATSUDA, T.; MACAHADO, J. Effects of Cd on the calcium metabolism and shell mineralization of bivalve *Anodonta cygnea*. **Mar. Freshwat. Behav. Physiol.** 4:131-146. 2008.
- [13] FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Compilation of legal limits for hazardous substance in fish and fishery products. FAO.102 pp. 1983.
- [14] FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). National shellfish sanitation program. Guide for the control of molluscan shellfish US department of health and human services. Public health services. Interstate shellfish sanitation. Conference USA. 427 pp. 2003.
- [15] GAGNÉ, F.; GÉLINAS, M.; GAGNON, C.; ANDRÉ, C.; BLAISE, C. Change in metallothionein phosphorylation state in *Mya arenaria* clams: implication in metal metabolism and oxidative stress. **Invert. Survival J.** 7:22-31. 2010.
- [16] GÉRET, F.; JOUAN, A.; TURPIN, V.; BEBIANNO, M.J.; COSSON, R.P. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). **Aquat. Living. Resour.** 15(1): 61-66. 2002.
- [17] GODT, J.; SCHEIDIG, F.; GROSSE-SIESTRUP, C.; ESCHÉ, V.; BRANDENBURG, P.; REICH, A.; GRONEBERG, D. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **J. Occup. Med. Toxicol.** 10: 1-22. 2006.
- [18] GRUBER, H.; VALLE, B. Introduction to metallothionein. Methods in enzymology. **Biochem.** 205: 3-7. 2000.
- [19] LEMUS, J.; LAURENT, C; ACAGUA, A.; CABRERA, M.; APONTE, A.; CHUNG, K. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayaacán, península de Araya, Edo. Sucre Venezuela. **Biologist (Lima)**. 8: 126-138. 2010.
- [20] MA, W.L.; WANG, L.; HE, Y.; YAN, Y. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. **Environ. Toxicol.** 23(3): 393-400. 2008.
- [21] MIZRADI, L.; ACHITUV, Y. Effects of Cd, Hg and Zn on the metabolism of the gastropod *Nassarius gibulosa* UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with toxicity of pollutants on marine organisms. MAP. Technical Reports Series N° 79. UNEP, Athens.79-90 pp. 1994.
- [22] MOONJOO, K.; HEE-JOUNG, K. The effects of metallothionein on the activity of enzymes involved in removal of reactive oxygen species. **Bull. Korean Chem. Soc.** 22 (4): 362-366. 2001.
- [23] NEUBERGER-CYWIAK, L.; ACHITUV, Y.; GARCÍA, E.M. Effects of Zinc and Cadmium on the Burrowing Behavior, LC<sub>50</sub>, and LT<sub>50</sub> on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia-Donacidae). **Bull. Environ. Cont. Toxicol.** 70(4): 713-722. 2003.
- [24] PERCEVAL, O.; COUILLARD, Y.; PINEL-ALLOUL, B.; BONNERIS, E.; CAMPBELL, P.G. Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter-impacted region. **Sci. Total Environ.** 369(1-3): 403-418. 2006.
- [25] RISSO-DE FAVERNEY, C.; ORSINI, N.; DE SOUSA, G.; RAHMANI, R. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. **Aquat. Toxicol.** 69(3): 247-58. 2004.
- [26] ROJAS-ASTUDILLO, L.; CHANG, Y.; AGARD, J.; BEDEL, I.; HUBBARD, R. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oyster (*Crassostrea* spp) from Trinidad and Venezuela. **Environ. Cont. Toxicol.** 42: 410-415. 2002.
- [27] ROJAS, N.; LEMUS, M.; ROJAS, L.; MARTINEZ, G.; RAMOS, Y.; CHUNG, K. Mercury levels in *Perna viridis* from the north coast of Sucre State, Venezuela. **Cien. Mar.** 35(1): 91-99. 2009.
- [28] SEGNINI, M.; K. CHUNG, K.; PÉREZ, J. Salinity and temperature tolerances of the green and brown mussels, *Perna viridis* and *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae). **Rev. Biol. Trop.** 46 (Supl. 5): 121-125. 1998.
- [29] STATPOINT TECHNOLOGIES INC. Statgraphics® centurion XVI, User Manual. Estados Unidos On line [Http://www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com). EUA, 296 pp. 2010.
- [30] STRICKLAND, J.; PARSONS, T. A practical handbook of sea water analysis. **Bull. Fish Biol.** 16: 167-315. 1968.
- [31] VIARENGO, A.; CANESI, L.; PERTICA, M.; LEVINGSTONE, D. R. Seasonal variation in the antioxidants defenses systems and lipids proxidation of the digestive gland of mussel. **Comp. Biochem. Physiol.** 100 (1/2): 187-190. 1991.
- [32] VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, Y. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and Antarctic molluscs. **Mar. Environ.** 44: 69-84. 1997.
- [33] VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CARATTO, N.; PANFOLI, I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cell. Mol. Biol.** 46 (2): 407-417. 2000.