

MODULACIÓN DE LA SINTESIS DE METALOTIIONINAS EN *Perna viridis* PREEXPUUESTOS A COBRE Y EXPUESTOS A CADMIUM**MODULATION OF METALLOTHIONEIN SYNTHESIS IN *Perna viridis* PRE EXPOSED TO COPPER AND EXPOSED TO CADMIUM**MAIRIN LEMUS^{1,3}, EVARISTO EUCARIS¹, RAQUEL SALAZAR-LUGO², KYUNG CHUNG³

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, ¹Departamento de Biología, Laboratorio de Biología Celular; ²Departamento de Bioanálisis, Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad; ³Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Marina, Laboratorio de Ecofisiología y Ecotoxicología, Cumaná, Venezuela. E-mail: mlemus88@gmail.com

RESUMEN

Las metalotioninas (Mts) se han utilizado como biomarcadores debido a que metales tóxicos como Hg, Cd, Cu pueden inducir su síntesis; sin embargo, los factores ambientales y la presencia de otros xenobioticos pueden determinar la magnitud de la respuesta en futuras exposiciones a iones metálicos. En el presente trabajo se evaluó la concentración de Mts en el tejido blando de ejemplares juveniles de *Perna viridis* preexpuuestos a Cu y luego a Cd (Cu/Cd) durante 21 días, para lo cual se establecieron tres grupos experimentales: expuestos a Cd, preexpuuestos a Cu y expuestos a Cd y el grupo control (sin metal). La acumulación de Cd en los tejidos fue significativamente mayor en los organismos preexpuuestos a Cu, con un valor promedio de $6,64 \pm 1,90$ $\mu\text{g/g}$, mientras que en los expuestos a Cd, fue de $4,74 \pm 2,33$ $\mu\text{g/g}$. Las concentraciones de Mts también fueron mayores en el grupo Cu/Cd con un valor de $1,36 \pm 0,52$ $\mu\text{g/g}$ con relación a los expuestos a Cd con un valor de $0,79 \pm 0,47$ $\mu\text{g/g}$ durante los 21 días de exposición. La relación entre los niveles de Mts y la bioacumulación de Cd resultó ser lineal y significativa en el grupo expuesto a Cd, pero no en el expuesto a Cu/Cd. Estos resultados sugieren que el Cu posiblemente actuó como un inductor de Mts en el organismo, lo que propició un aumento de la acumulación de Cd en *P. viridis* y un incremento en la concentración de la Mts, lo que determina que la tolerancia y la bioacumulación de Cd en *P. viridis* está determinado por exposiciones previas y por ende su respuesta en los niveles de MTs también depende de ésto.

PALABRAS CLAVE: Cu, Cd, bivalvo, biotoxicidad por metales.

ABSTRACT

The metallothioneins (Mts) have been used as biomarkers because toxic metals such as Hg, Cd, Cu can induce their synthesis; however, environmental factors and the presence of other xenobiotics can determine the magnitude of the response in future exposures to metal ions. Metallothionein concentration was determinate in the soft tissue of *Perna viridis* juveniles pre-exposed to Cu and exposed to Cd (Cu/Cd) for 21 days. For this, three experimental groups were established: exposed to Cd, pre-exposed to Cu and exposed to Cd and the control group (no metal). Cadmium accumulation in tissues of *P. viridis* was significantly higher in pre-exposed organisms to Cu, with an average value of 6.6 ± 1.9 mg/g, while in those exposed to Cd, was 4.7 ± 2.4 mg/g. Mts concentrations were also higher in the Cu/Cd experimental group, with a value of 1.36 ± 0.52 mg/g in relation to those exposed to Cd which had a value of 0.79 ± 0.47 mg/g. The relationship between Mts and bioaccumulation of Cd was significant in the group exposed to Cd, but not in the exposed Cu/Cd. These results suggest that Cu possibly acted as an inducer of Mts in the body, which led to increased accumulation of Cd in *P. viridis* and increase in Mts concentration. Tolerance and bioaccumulation of Cd in *P. viridis* was determined by previous exposure of the organism and hence its response on levels of MTs also depends on it.

KEY WORDS: Cu, Cd, bivalve, metal toxicity.

INTRODUCCIÓN

La exposición de organismos marinos a metales como el Cu, Cd y Hg induce la síntesis de proteínas de baja masa molecular, ricas en cisteína, las metalotioninas (Mts) (Wolfgang 2000, Lemus *et al.* 2012) a las que se les atribuyen funciones de metabolización y detoxificación de elevadas concentraciones intracelulares de metales pesados. Su inducción ocurre durante exposición a iones metálicos en la células (Mao *et al.* 2012), y muchos autores han propuesto el uso de estas proteínas como indicador bioquímico específico para la bioacumulación de metales en organismos en ambientes contaminados (Bebianno y

Langston 1991, Domouhtsidou *et al.* 2004).

Los moluscos son los organismos más frecuentemente usados en estudios de toxicidad, debido a la capacidad de incorporación de metales, y su tolerancia a cargas corporales altas. Particularmente los bivalvos han representado importantes biomonitores de metales pesados, debido a su carácter generalmente sésil y bioacumulador, de fácil manejo en el laboratorio y por lo general poseen importancia económica. Un buen ejemplo de ello son los mitílidos, los cuales han sido clásicamente usados en estudios de contaminación (Wang 2001, Narváez *et al.* 2005, Rojas *et al.* 2009,

Lemus *et al.* 2010, Lemus *et al.* 2012, Lemus *et al.* 2013).

Existen divergencias en la literatura sobre el efecto de los metales en la síntesis de Mts en diferentes tejidos del organismo y por lo tanto sobre el papel que juegan las Mts como biomarcador de contaminación. Hamilton y Mehrle (1987) señalan la importancia de las Mts como biomarcadores moleculares, estableciendo relaciones estrechas entre ésta y el estado fisiológico del organismo, resaltando en sus resultados que las concentraciones de Mts no variaron a medida que aumentó la concentración de Cd. Por el contrario, Bebianno y Machado (1997) en *M. galloprovincialis* observaron que existía una alta correlación entre las Mts y los niveles de metales del organismo, principalmente Cu y Cd.

En estudios realizados en ambientes naturales por Hamza-Chaffai *et al.* (2003) en el bivalvo *Ruditapes decussatus*, demostraron que las concentraciones de metales estaban asociadas significativamente a las Mts, lo cual determinó la importancia de las Mts como proteínas asociadas a inactivación, metabolización y desintoxicación de metales en los diferentes tejidos del organismo.

Las relaciones que se establecen entre la proteína y los metales depende de la especie de bivalvo, de factores bióticos, tales como edad, sexo, reproducción, tamaño y de factores abióticos, entre ellos temperatura, pH y salinidad (Webb y Keaugh 2002, Rojas *et al.* 2009, Mao *et al.* 2012). De allí que la historia de vida de un organismo determinará la magnitud de la respuesta. Organismos que pudieron haber estado expuestos a bajas dosis de un xenobiótico responderán diferente a aquellas que no lo han estado. Es necesario llevar a cabo estudios que permitan clarificar la magnitud en las respuestas de proteínas específicas como las Mts cuando los organismos han tenido una exposición previa a un agente estresor.

Perna viridis (familia Mytilidae) es una especie originaria del Indopacífico, conocido comúnmente como mejillón verde que puede alcanzar un tamaño de hasta 200 mm, fue detectada por primera vez en Trinidad en 1990 y se ha extendido hacia la parte oriental de Venezuela, detectándose en el golfo de Paria y norte del estado Sucre, isla de Margarita y golfo de Cariaco (Rylander *et al.* 1996). Por su carácter tropical y su alta fecundidad, esta especie ha colonizado fácilmente la extensión costera de Venezuela y gran parte del Caribe.

El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de preexposiciones de Cu sobre la posterior bioacumulación a Cd y los efectos sobre los niveles de Mts en juveniles de *P. viridis*.

METODOLOGÍA

Obtención del material biológico

Los ejemplares juveniles de *P. viridis*, se recolectaron en un banco natural ubicado en la localidad de Guayacán, entre la cabecera de Coche y el Morro de Chacopata, estado Sucre, ubicado a 10°43'-10°48' N y 63°48'-63°55' W. La recolección se realizó por buceo en apnea y los ejemplares se transportaron en contenedores isotérmicos hasta el laboratorio. Para esta investigación se utilizaron ejemplares con una talla promedio de 18 ± 3 mm de longitud, los cuales fueron mantenidos durante 15 días en acuarios con agua de mar, aireación continua, salinidad 36, temperatura promedio de 25 ± 2°C y alimentados con la microalga *Dunaliella* sp. previo a la realización de los bioensayos.

Determinación del LC₅₀ para Cu y Cd en *Perna viridis*

Una vez transcurrido el periodo de acondicionamiento al laboratorio, se colocaron grupos de ocho organismos por acuario (2 L) para la determinación del límite de tolerancia media (LC₅₀). Estos bioensayos tuvieron una duración de 96 horas y se realizaron por duplicado. Se utilizó CdCl₂ como fuente de Cd y CuSO₄ como fuente de Cu. Los resultados fueron analizados por el método de Logit según el programa propuesto por Stephan (1977).

Bioensayo de exposición

Se colocaron 15 ejemplares de *P. viridis* con talla promedio de 16,5 ± 3,6 mm de longitud en un acuario de PVC de 2,6 L y fueron expuestos a una dosis 10 veces por debajo del LC₅₀. La concentración subletal utilizada fue de 5,48 µg Cd/L (grupo Cd). El segundo grupo de ejemplares fue preexpuesto a 0,33 µg Cu/L durante 15 días y posteriormente expuesto a Cd (grupo Cu/Cd) y un tercer grupo no expuesto a metales fue considerado como control. Los bioensayos se realizaron durante 21 días, con tomas de muestras a 1, 3, 7, 15 y 21 días. Los valores promedios de los parámetros controlados fueron: temperatura 25 ± 1°C, salinidad 37, O₂ disuelto 6,3 ± 1,2 mg/L; fotoperíodo 12/12. Los bioensayos se llevaron a cabo por triplicado y se tomaron seis organismos durante cada intervalo de tiempo, las concentraciones empleadas garantizaron la sobrevivencia de los organismos con una mortalidad inferior al 5%.

Determinación de Cadmio

Para cuantificar los niveles de Cd en cada organismo, se tomó 1,0 mL de homogenizado realizado para la determinación de Mts y digerido con ácido nítrico (HNO₃). Luego se filtraron las muestras en papel Whatman N° 2 y se diluyó con agua desionizada hasta 10 mL. Finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 228 nm en espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER modelo 3110 con corrector de deuterio y llama de aire acetileno, calibrado con estándares de metal con rango de 0,25-4,00 mg/L. Los valores obtenidos fueron validados con material de referencia certificado (CRMs por las siglas en inglés *Certified Referend Materials*) denominada SRM 1566a en tejido de ostra (*Nacional Institute of Standards and Tecnology*, MD) y en hepatopáncreas de bivalvos (TORT-2) y músculo de peces (DORM-2) provenientes de *National Council of Canadá* (Nova Scotia, Canadá). Los resultados fueron expresados en µg/g masa húmeda.

Determinación de Metalotioninas

El contenido de Mts en *P. viridis* fue estimado de acuerdo al método propuesto por Viarengo *et al.* (2000). Se extrajo el tejido húmedo de cada organismo, se pesó y se homogenizó en frío con 3 mL de buffer Tris-HCl 20 mmol/L y 0,5 mol/L de sacarosa (pH 8,6, leupeptina 0,006 mol/L, fenilmetilsulfóxido (PMSF) 0,5 mmol/L y β-mercaptoetanol al 0,01%) por cada gramo de tejido, usando un homogenizador Polytron modelo Brinkman. El homogenizado fue centrifugado a 30.000 g, a 4°C, durante 20 minutos, y al sobrenadante se le añadió 1,05 mL de etanol frío y 80 µL de cloroformo. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 6.000 g por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron añadidos en 3 mL de etanol frío y almacenados a 20°C por 1 hora para ser nuevamente centrifugados a 6.000 g por 10 minutos. El precipitado fue lavado con una mezcla de etanol, cloroformo y buffer Tris en una proporción de 87:1:12 y luego centrifugado a 6.000 g por 10 minutos y secado bajo atmósfera de nitrógeno. El precipitado fue resuspendido en 300 µL de una mezcla de HCl 5 mmol/L y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mmol/L. Finalmente, se agregó 1 mL de NaCl 2 mol/L que contenían ácido ditionitrobenzoico (DTNB) 0,43 mmol/L y con fosfato de sodio 0,2 mol/L de buffer fosfato, pH 8 (Ellman 1959). Las muestras finalmente se centrifugaron a 3.000 g por 5 minutos y después de 30 minutos se leyó la absorbancia del sobrenadante a 412 nm. La concentración de Mts se estimó utilizando una curva de calibración, usando glutatión reducida (GSH) como estándar. Los resultados fueron expresados en µg/g masa húmeda y en función de las proteínas totales

Determinación de proteínas totales

Las proteínas totales en los tejidos blandos de *P. viridis* fueron determinadas utilizando el método de Bradford (1976). Las muestras fueron leídas a 595 nm, utilizando un espectrofotómetro de luz visible Helios λ modelo 1.0, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1°C. Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica de bovino (20 mg/dL, Sigma) como estándar.

Análisis estadístico

Se aplicó análisis de varianza doble para ver si existían diferencias significativas en las concentraciones de Mts y de Cd con respecto al tiempo de exposición, en los grupos experimentales y el control. Además se realizó análisis de regresión lineal simple para determinar si existe relación entre los niveles de Mts y la bioacumulación de Cd (Sokal y Rohlf 1981).

RESULTADOS

Concentración letal media (CL₅₀) de Cu y Cd en *Perna viridis*

Según el método Logit, la concentración letal media estimada para el Cd fue de 54,80 µg/L con límites de confiabilidad al 95% de 22,2 µg Cd/L y 90,4 y para el Cu la CL₅₀ fue de 3,32 µg/L con límites de confiabilidad de 2,56 y 4,24 µg Cu/L.

Bioacumulación de Cd en *Perna viridis*

Los niveles de Cd en el tejido blando de juveniles de *P. viridis* demostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales expuestos a Cd, a Cu/Cd y el grupo control (Fs = 95,98; *p* < 0,001), encontrándose que los organismos en la condición Cu/Cd presentaron una concentración del metal con respecto a los expuestos a Cd solamente y al control. Los valores promedios durante todo el bioensayo para los grupos expuestos a Cu/Cd y a Cd fueron de 6,64 ± 1,90 y 4,74 ± 2,33 µg/g de masa húmeda, respectivamente. Los ejemplares controles presentaron una concentración promedio de 2,19 ± 0,50 µg/g de masa húmeda.

Se determinó que existen diferencias significativas en la bioacumulación de Cd (Fs = 15,19; *p* < 0,001) en juveniles de *P. viridis* en función del tiempo de exposición. En los organismos expuestos sólo a Cd se observó que los niveles del metal se incrementaron en función del tiempo de exposición desde 2,05 ± 0,23 hasta 7,81 ± 1,04 µg/g de masa húmeda. A diferencia del grupo expuesto a Cd, en

los ejemplares preexpuestos a Cu y luego a Cd, alcanzaron su máxima incorporación el día 7 y en los días sucesivos se estabiliza la incorporación (Fig. 1).

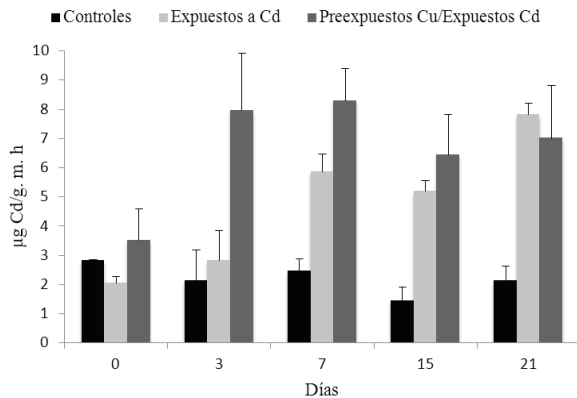


Figura 1. Niveles de Cd ($\mu\text{g/g}$ de masa húmeda) de *Perna viridis* en los grupos controles, expuestos a Cd y preexpuestos a Cu expuestos a Cd, durante los días 0, 3, 7, 15 y 21 del experimento. La barra representa el valor promedio de las muestras y la línea la desviación estándar de $n = 6$. Entre grupos experimentales $F_s = 95,98$; $p < 0,001$. Entre los tiempos de exposición $F_s = 15,19$; $p < 0,001$.

Metalotioninas en *Perna viridis*

Las concentraciones de Mts en el tejido blando de *P. viridis* mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales expuestos a Cd, Cu/Cd y el grupo control ($F_s = 40,67$; $p < 0,001$), encontrándose que los organismos expuestos a Cu/Cd presentaron una mayor concentración de Mts con respecto a los expuestos a Cd solamente, los valores encontrados fueron de $1,36 \pm 0,52$ y $0,79 \pm 0,47 \mu\text{g Mts/g}$ proteínas totales, respectivamente.

El contenido de Mts en *P. viridis* presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo de exposición ($F_s = 13,68$; $p = 0,001$). Sin embargo, en los ejemplares controles los niveles de Mts fueron similares durante los 21 días del experimento ($p > 0,05$). Los valores encontrados para los organismos expuestos sólo a Cd, variaron entre $0,05 \pm 0,02$ y $1,37 \pm 0,45 \mu\text{g Mts/g}$ proteínas totales, evidenciándose un aumento consecutivo del contenido de Mts desde el día 0 hasta el día 21 del bioensayo (Fig. 2). En los ejemplares expuestos a Cu/Cd, los valores de Mts variaron desde $0,12 \pm 0,09$ hasta $3,27 \pm 0,38 \mu\text{g Mts/g}$ proteínas totales, observándose que a partir del día 3 y hasta el día 15 los niveles de la proteínas incrementaron significativamente con relación a la concentración observada al inicio del bioensayo. A los 15 días de exposición se alcanza la concentración máxima (Fig. 2).

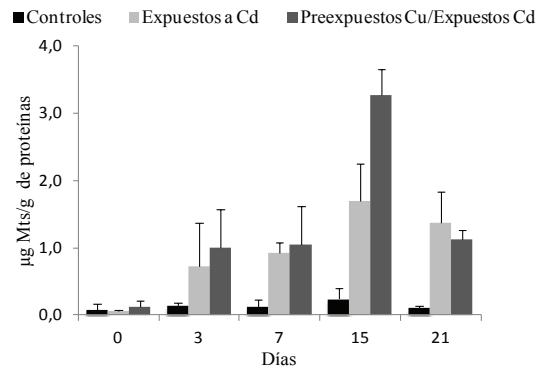


Figura 2. Niveles de Mts ($\mu\text{g/g}$ proteínas totales) en *Perna viridis* en los grupos control, expuestos a Cd, y preexpuestos a Cu/ expuestos a Cd, durante los días 0, 3, 7, 15 y 21 del experimento. La barra representa el valor promedio de las muestras y la línea la desviación estándar de $n = 6$. Entre grupos experimentales $F_s = 40,67$; $p < 0,001$. Entre los tiempos de exposición $F_s = 13,68$; $p < 0,001$.

Relación entre el contenido de Mts y los niveles de Cd en *Perna viridis*

El contenido de Mts mostró una relación positiva y significativa con los niveles de Cd en tejido de *P. viridis* ($r = 0,886$; $F_s = 102,73$; $p < 0,001$), mientras que los organismos previamente expuestos a Cu y luego expuestos a cadmio, no mostraron relación significativa ($r = 0,323$; $F_s = 0,323$; $p = 0,0815$) (Fig. 3).

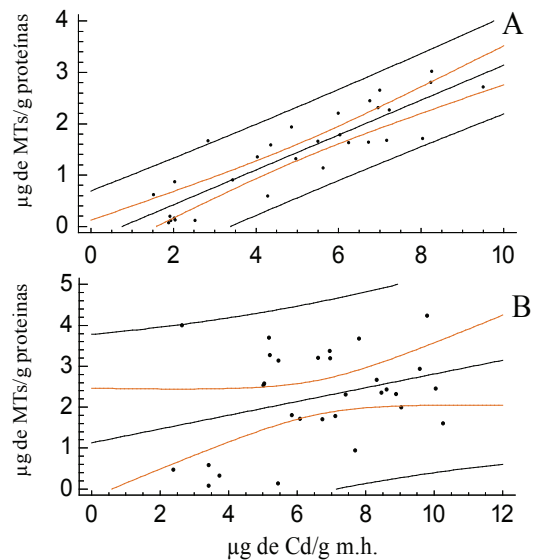


Figura 3. Relación lineal entre el contenido de Mts ($\mu\text{g/g}$ proteínas totales) y los niveles de Cd ($\mu\text{g/g}$ de masa húmeda) en *Perna viridis* durante 0, 3, 7, 15 y 21 días. A: expuestos a Cd ($r = 0,886$; $F_s = 102,73$; $p < 0,001$). B: pre expuestos a Cu y expuestos a Cd ($r = 0,323$; $F_s = 0,323$; $p = 0,0815$).

DISCUSIÓN

En la presente investigación se demostró que juveniles de *P. viridis* con talla promedio de $16,5 \pm 3,6$ mm de longitud fueron mucho más sensibles a Cu que al Cd, presentando un límite de tolerancia (LC_{50}) estimada para Cd de $54,8 \mu\text{g Cd/L}$, mientras que para el Cu fue de $3,32 \mu\text{g Cu/L}$, lo que determina mayor toxicidad para el cobre. Otros resultados en ejemplares adultos de *P. viridis*, señalan valores de $1,57 \text{ mg/L}$ y $0,62 \text{ mg/L}$ para Cd y Cu respectivamente (Chan 1988). En este mismo orden, fueron los señalados por Yap *et al.* (2004), donde determinan que para la misma especie con tallas comprendidas entre 55 y 65 mm el Cu es más tóxico que el Cd, los valores del LC_{50} para esta especie fueron $1,53 \text{ mg/L}$ para Cd, $0,25 \text{ mg/L}$ para Cu. Los valores del CL_{50} determinan que aunque el Cu es un metal bioesencial, resulta ser mucho más tóxico para *P. viridis* que el Cd.

Aunque este y otros trabajos han determinado mayor sensibilidad de *P. viridis* para el Cu, la LC_{50} es muy variable entre publicaciones. Muchos son los factores que pueden interferir en el proceso de determinación de la concentración letal de un metal en una especie determinada. Entre estos factores se encuentran la temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, concentración del contaminante, tamaño del organismo, así como también el lugar de procedencia de los ejemplares, tal como fue demostrado por Acosta y Lodeiros (2004), quienes al determinar el LC_{50} de Cu en el bivalvo *Tivela mactroides* procedentes de tres lugares distintos, encontraron una dosis letal media diferente para cada grupo de organismos, lo cual indica la variación en la toxicidad de un metal en la misma especie pero de localidades diferentes.

Por lo que este parámetro, solo permite determinar dosis tóxicas del metal bajo condiciones controladas y concentraciones subletales que no causan la muerte al organismo. En la presente investigación se demostró que dosis subletales 10 veces por debajo del LC_{50} , garantizaron la sobrevivencia de los organismos durante los ensayos subletales.

La bioacumulación de Cd en *P. viridis* fue mayor en los ejemplares preexposados a Cu y expuestos a Cd. Estos resultados sugieren que posiblemente durante el periodo de preexposición, el Cu provocó la activación de mecanismos de defensa contra el incremento del metal incorporado, a través de la inducción de síntesis de Mts, que posteriormente favorecieron el incremento de las concentraciones de Cd en los tejidos, aumentando

de esta manera la tolerancia al metal. Estos resultados se sustentan en las diferentes investigaciones, que han demostrado que los estudios de preexposición a metales pesados determinan su tolerancia a nuevas exposiciones (Figueroa 1988, Zapata-Vivenes y Nusetti 2007).

Durante los días de exposición, los organismos previamente expuestos a Cu, mostraron una máxima incorporación de Cd durante los días 3 y 7 con relación a los organismos no preexposados, poniendo de manifiesto que éstos organismos, probablemente desarrollaron estrategias bioquímicas que le permitieron incorporar el metal (~100%), más que los ejemplares expuestos a Cd solamente durante este intervalo de tiempo. Estas estrategias están relacionadas con un aumento de los niveles de proteínas que enlazan metales pesados como las Mts, donde se ha determinado que el Cu es un inductor de ARMm para la síntesis de Mts como molécula reguladora de este elemento bioesencial (Bebiano y Langston 1992, Vasconcelos *et al.* 2002, Mao *et al.* 2012). A partir de los 15 días se evidenció una ligera disminución de los niveles de este metal en los tejidos. Esta disminución posiblemente esté asociada a la activación de los procesos de depuración del metal y en donde las Mts juegan un papel fundamental en el secuestro, inactivación y expulsión de metales.

Los ejemplares expuestos sólo a Cd, mostraron un incremento sostenido en la bioacumulación del metal en función del tiempo de exposición. La especie incorporó el metal progresivamente y no logró estabilizar los niveles máximos de incorporación de Cd en sus tejidos, alcanzando la máxima concentración a los 21 días. No obstante, resultados similares han sido señalados en diversos trabajos realizados con bivalvos, principalmente mejillones, donde se ha demostrado que estas especies son buenos biomonitores de metales (Otchere 2003, Lemus *et al.* 2010).

La mayor concentración de Mts en el tejido blando de *P. viridis* preexposados a Cu, sugieren que la exposición previa a este metal, posiblemente indujo la síntesis de biomoléculas asociadas directamente al metabolismo de metales pesados. Esta posible pre-inducción preparó al organismo e incrementó sus defensas bioquímicas para contrarrestar la toxicidad de metales pesados no bioesenciales como el Cd. Probablemente, estas moléculas estén vinculadas con la incorporación, posterior acumulación y depuración de Cd en los organismos preexposados a Cu.

Esto queda sustentado porque los organismos Cu/Cd a partir del día 15 se observa un descenso en la

bioacumulación de Cd en los tejidos, cuando ocurre una elevación significativa de las Mts, lo que podría sugerir una activación de los mecanismos de depuración, asociado a niveles elevados de Mts. Se puede inferir que a partir de los 15 días de exposición a Cd, las Mts actuaron como moléculas depuradoras de este metal en las células, regulando la disponibilidad intracelular del mismo y protegiendo a las células contra interacciones potencialmente tóxicas con otras biomoléculas. Todo lo anteriormente planteado, está directamente relacionado con la mayor concentración de Mts durante el día 15. Posiblemente, al disminuir los niveles de Cd en los tejidos, el organismo desarrolló estrategias bioquímicas que le permitieron regular las concentraciones de éstas proteínas en sus tejidos, acumulándolas en forma de agregados insolubles en los lisosomas (Viarengo *et al.* 1989) o posiblemente activando sistemas de degradación de estas proteínas al disminuir el contenido metálico, por lo que podrían ser neutralizados y excretados por Mts (Geffard *et al.* 2002, Domouhsidou *et al.* 2004).

En *P. viridis*, la relación entre los niveles de Mts y la concentración de Cd resultó ser lineal y significativa en el grupo expuesto directamente a Cd mientras que en el grupo Cu/Cd no se determinó relación. Esto indica que fue en el primer grupo donde el organismo presentó un comportamiento dosis respuesta, de manera que el mecanismo de unión entre el Cd y la Mts se pudo desarrollar con mayor afinidad, sin que ningún factor secundario pudiera intervenir en el proceso, como ocurrió en el caso de los organismos preexposados, donde se pudo evidenciar una mayor dispersión de los puntos de la recta, asociado posiblemente al efecto conjunto de los metales Cu y Cd, pudiendo estar ocurriendo un desplazamiento de los iones Cu enlazados a la proteína e inducción de la misma, ya que los niveles de esta proteína fueron elevados en los ejemplares bajo esta condición. Ambos metales pueden ocasionar diferentes efectos en el organismo y por ende la respuesta del mismo fue diferente en el grupo preexposado, debido a que la presencia previa del Cu influiría en el proceso de unión de la Mts con el Cd, afectando directamente la relación entre ambos.

Diversas investigaciones han demostrado la relación existente entre las Mts y el Cd. Martins (2004) en el bivalvo *Lima scabra*, encontró que durante una fase de acumulación de Cd en el hepatopáncreas de ese organismo, los niveles de Mts se elevaron significativamente, sin embargo durante la fase de depuración la concentración de la proteína disminuyó pero presentó un mayor enlazamiento de Cd, señalando su importante papel en la

depuración de este elemento.

Bebiano y Langston (1992) y Geffard *et al.* (2002) señalaron que las concentraciones de Cd en cualquier tejido u órgano son reguladas por la presencia de Mts. Vasconcelos *et al.* (2002) demostraron que esta proteína es sintetizada después de la exposición de los organismos a metales, ya que éstos estimulan la activación de genes que codifican para la síntesis de la Mts. Los resultados anteriores coinciden con los reportados por Bebianno y Langston (1991) en el mejillón *M. edulis* y en el bivalvo *Macoma balthica* (Bordin *et al.* 1997), donde se demostró que el incremento de las concentraciones de la proteína estaba directamente relacionada con la acumulación de Cd en los tejidos.

Finalmente, los resultados encontrados en el presente trabajo sugieren que la preexposición de *P. viridis* a una dosis subletal de un metal esencial como el Cu, aumenta la capacidad de incorporación de Cd en tejidos, debido a la inducción de Mts y su posible efecto protector. Esto determina que la historia de vida y la influencia de exposiciones previas a metales en el medio ambiente determinan variabilidad en los niveles de tolerancia de una especie a futuras exposiciones, tal como ha sido señalado para la misma especie por Ng *et al.* (2007) y también para otro miembro de la familia Mytilidae, en la cual se determinó que organismos provenientes de zonas contaminadas incrementaron tres veces la síntesis de Mts con relación a aquellos que no estuvieron expuestos a metales en su ambiente natural (Sheir *et al.* 2013). No obstante, Shi y Wang (2004) no determinaron efectos de preexposiciones a metales sobre la bioacumulación de otros metales en *P. viridis*. Este estudio suministra información de importancia para el uso de bivalvos como biomonitores, particularmente los miembros de la familia Mytilidae que son ampliamente utilizados en evaluaciones ambientales

CONCLUSIÓN

La preexposición de *Perna viridis* a una dosis subletal de un metal esencial como el Cu aumentó la capacidad de incorporación de Cd en el organismo y su tolerancia al metal, sugiriendo un efecto protector de las Mts previamente inducidas por el Cu, al efecto tóxico de una posterior exposición a Cd.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA V, LODEIROS C. 2004. Efectos del cobre en juveniles de bivalvos (*Tivela mactroides*) provenientes de ambientes con diferentes niveles de contaminación. Bol. Centro Invest. Biol. 38(1):375-

381.

- BEBIANNI M, LANGSTON W. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.* 108(1):91-96.
- BEBIANNI M, LANGSTON W. 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium. *Mar. Biol. Assoc. Unit. King.* 72(2):329-342.
- BEBIANNI MJ, MACHADO LM. 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Coast of Portugal. *Mar. Pollut. Bull.* 34(8):666-671.
- BORDIN G, MCCOURT F, CORDEIRO A, RODRIGUEZ R. 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: Seasonal variations and induction upon metal exposure. *Mar. Biol.* 129(3):453-463.
- BRADFORD M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1):248-254.
- CHAN HM. 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48:295-303.
- DOMOUHTSIDOU G, DAILIANIS S, KALOYIANNI M, DIMITRIADIS V. 2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers combination with trace metal concentrations. *Mar. Pollut. Bull.* 15(5-6):1-15.
- ELLMAN G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82(1):70-77.
- FIGUEROA L. 1988. Acumulación de cobre y cadmio en *Oreochromis mossambicus* (Peters) 1852 (Pisces:Cichlidae). Efectos subletales sobre el crecimiento medidos en función de ARN/ADN. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- GEFFARD A, GEFFARD O, HIS E, AMIARD J. 2002. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae or *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233:131-142.
- HAMILTON S, MEHRLE P. 1987. Evaluation de metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Transac. Amer. Fish. Soc.* 116(4):551-560.
- HAMZA-CHAFFAI A, PELLERIN J, AMIARD JC. 2003. Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussates* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ. Inter.* 28(7):609-617.
- LEMUS M, CAROLINA L, ACAGUA A, CABRERA M, APONTE A, CHUNG K. 2010. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, península de Araya estado Sucre, Venezuela. *Biologist.* 8:126-138.
- LEMUS M, MARÍN L, APONTE A, CHUNG K. 2012. Metalotioninas, glutation y consumo de oxígeno en el bivalvo *Perna viridis* expuesto a cadmio. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 22(4):376-380.
- LEMUS M, ROJAS N, ROJAS-ASTUDILLO L, CHUNG K. 2013. Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva. *Rev. Biol. Tropical.* 61(2):701-709.
- MAO H, WANG DH, YANG WX. 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111:208-213.
- MARTINS C. 2004. Acumulación y depuración de cadmio en relación con el perfil de enlazamiento de metaloproteínas en el hepatopáncreas del bivalvo *Lima scabra*. Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiarum en Biología Aplicada mención Ecología y Ecotoxicología Ambiental. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- NARVÁEZ N, LODEIROS C, NUSETTI O, LEMUS M, MAEDA-MARTINEZ A. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L., 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Cien. Mar.* 31(1A):91-102.
- NG TY, RAINBOW PS, AMIARD-TRIQUET C, AMIARD JC, WANG WX. 2007. Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 84(2):153-161.

- OTCHERE F. 2003. Heavy metals concentrations and burden in the bivalves (*Anadara (senilis) senilis*, *Crassostrea tulipa* and *Perna perna*) from lagoons in Ghana: model to describe mechanism of accumulation/excretion. *Afric. J. Biotechnol.* 2(9):280-287.
- ROJAS N, LEMUS M, ROJAS DE ASTUDILLO L, GREGORIO M, RAMOS Y, CHUNG K. 2009. Contenido de mercurio en *Perna viridis* en la costa norte del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas.* 25(1):91-99.
- RYLANDER K, PÉREZ J, GÓMEZ J. 1996. The distribution of the brown mussel, *Perna perna* and the green mussel *P. viridis* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) in North eastern Venezuela. *Caribb. Mar. Stud.* 5:86-87.
- SHEIR SK, HANDY RD, HENRY TB. 2013. Effect of pollution history on immunological responses and organ histology in the marine mussel *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64(4):701-716.
- SOKAL R, ROLFH F. 1981. Introducción a la bioestadística. De Reverte, S. A. España. pp. 362.
- STEPHAN E. 1977. Methods for calculating LC₅₀. In: Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM SPT 634. MAYER F, HAMILINK J. (Eds). American Society for Testing Material, Philadelphia. pp. 65-84.
- VASCONCELOS MH, TAM SC, HESKETH JE, REID M, BEATTIE JH. 2002. Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182(2):91-97.
- VIARENGO A, PERTICA M, CANESI L, MAZZUCOTELLI A, ORUNESU M, BOUQUEGNEAU JM. 1989. Purification and biochemical characterisation of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharmacol. Toxicol.* 93(2):389-395.
- VIARENGO A, BURLANDO B, CARATTO N, PANFOLI I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46 (2):407-417.
- WANG W. 2001. Comparison of metal uptake rate and absorption efficiency in marine bivalve. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(6):1367-1373.
- WEBB A, KEAUGH M. 2002. Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): a comparison of techniques. *Mar. Pollut. Bull.* 44(3):222-229.
- WOLFGANG M. 2000. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *Amer. Soc. Nut. Sc.* 130(5S Suppl.):1455S-1458S.
- YAP CK, ISMAIL A, OMAR H, TAN SG. 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International.* 29(8):1097-1104.
- ZAPATA-VIVENES E, NUSETTI O. 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):335-344.