

EFFECTO SUBLETAL DEL CADMIO EN LA OSTRAS PERLA DEL CARIBE *Pinctada imbricata* (PTEROIDA: PTERIIDAE) Röding, 1798

SUBLETHAL EFFECTS OF CADMIUM ON THE CARIBBEAN PEARL OYSTER *Pinctada imbricata* (PTEROIDA: PTERIIDAE) Röding, 1798

LIZ VILLEGAS¹, CÉSAR LODEIROS^{1,3}, KATHERINE MALAVÉ¹, JORMIL REVILLA¹, MAIRÍN LEMUS^{2,4}

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, ¹Instituto Oceanográfico de Venezuela, Laboratorio de Acuicultura, ²Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Cumaná, Venezuela, ³Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, ⁴Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador
E-mail: cesarlodeirosseijo@yahoo.es

RESUMEN

El efecto de la dosis subletal de cadmio 0,05 mg/L en la ostra perla del Caribe *Pinctada imbricata* se evaluó en organismos de tres tallas diferentes: juveniles de 10–20 mm, 40–45 y adultos > 75 mm. Los bioensayos estáticos se llevaron a cabo durante 7 días con una renovación del metal en el cuarto día de exposición. Al final del bioensayo, se evaluó la reposición de la concha, masa de tejido, consumo de oxígeno y relación ARN/ADN. No se observaron efectos significativos del cadmio en niveles subletales sobre la masa de tejido, índice de ARN/ADN y consumo de oxígeno, en cada una de las tallas. No obstante, a esta concentración de cadmio se registró una disminución significativamente en la reposición de la concha en los organismos juveniles. La utilización de reposición de concha en juveniles de *P. imbricata* es recomendada como indicador biológico para establecer pruebas de toxicidad.

PALABRAS CLAVE: Ostras perla Akoya, toxicidad, ARN/ADN, consumo de oxígeno, Golfo de Cariaco.

ABSTRACT

The effect of sublethal doses of cadmium 0.05 mg/L in the Caribbean pearl oyster *Pinctada imbricata* was evaluated in three different sizes: juveniles 10-20 mm, 40-45, and adults >75 mm. Static bioassays were conducted for 7 days with a renewal of metal on the fourth day of exposure. At the end of the bioassay, the replacement of the shell, mass of tissue, oxygen consumption and RNA/DNA ratio were evaluated. No significant effects of cadmium at sublethal concentration were observed in the tissue mass, RNA/DNA ratio and oxygen consumption in each of the sizes evaluated. However, at this concentration of cadmium a significant decrease was observed in the shell replacement in juveniles. The use of shell replacement of *P. imbricata* juveniles is recommended as a biological indicator in toxicity testing.

KEY WORDS: Akoya pearl oyster, toxicity, RNA/DNA, oxygen consumption, Golfo de Cariaco.

INTRODUCCIÓN

A partir de mediados del siglo pasado se llevaron a cabo estudios a fin de evaluar el efecto tóxico de xenobióticos en el medio ambiente, particularmente en los ecosistemas acuáticos, debido a la gran vulnerabilidad de los cuerpos de agua como receptores finales de efluentes industriales y domésticos. Muchos han sido los organismos utilizados para estudios ambientales, siendo los moluscos, particularmente las especies de la clase Bivalvia, los más ampliamente utilizados, porque en su mayoría son organismos sésiles o de poco desplazamiento, incorporan gran cantidad de contaminantes en los tejidos, son económicamente importantes y son de fácil adaptación a las condiciones de confinamiento (Nascimento *et al.* 2002, Lemus *et al.* 2010, 2012).

Debido a la capacidad de acumular contaminantes

potenciales, algunas especies de ostras perlas, particularmente las “tipo Akoya” (*Pinctada fucata*, *P. martensii*, *P. radiata* y *P. imbricata*) agrupadas recientemente según su taxonomía y filogenia (Wada y Tëmkin 2008), han sido empleadas como bioindicadores de contaminantes carburantes y metales pesados (Fowler *et al.* 1993, Bou-Olayan *et al.* 1995, Al-Madfa *et al.* 1998, Sarver *et al.* 2003, O’Connor y Macfarlane 2005, Gifford *et al.* 2005, 2006, MacFarlane *et al.* 2006). Adicionalmente, la amplia distribución mundial de las ostras perlas Akoya, provenientes filogenéticamente de un ancestro común y con la posibilidad de estar incluidas en una sola especie, *P. imbricata*, permiten que sean consideradas como una especie cosmopolita (O’Connor y Lawler 2004, Yu y Chu 2006).

Estudios preliminares en Venezuela, han sugerido al bivalvo ostra perla, *P. imbricata*, como una especie modelo

para bioensayos ecotoxicológicos, a partir de una selección de 21 especies de importancia ecológica y socioeconómica (Lodeiros 2011); en este estudio, la selección fue debida principalmente al amplio conocimiento de sus aspectos biológicos y reproductivos (Ruffini 1984, Hernández y Gómez 2000, Urban 2000), sensibilidad ante estresores de origen contaminante (Nuseti *et al.* 2004), alta distribución geográfica (Lodeiros *et al.* 1999), disponibilidad de individuos a través del año (León *et al.* 1987, Villalba 1995, Jiménez *et al.* 2000), así como el gran potencial para la acuicultura en el Caribe (Lodeiros y Freitas 2008).

En función del posible establecimiento de la ostra perla *P. imbricata* como especie modelo en pruebas toxicológicas, la presente investigación analizó a través de varios índices de condición fisiológica: regeneración de la concha, masa de tejido, consumo de oxígeno y relación ARN/ADN, la respuesta de la especie en tres grupos de tallas representativas del ciclo de vida de la misma, en un bioensayo de corta duración donde fue sometida a una concentración del xenobiótico Cadmio (Cd).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los individuos de *P. imbricata* se recolectaron mediante buceo autónomo en el banco de Chacopatica, costa norte del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (10°34'33'' N; 63°58'10'' W), y se transportaron en contenedores isotérmicos hasta el Laboratorio de Acuicultura, Extensión Moluscos del Instituto Oceanográfico de Venezuela, de la Universidad de Oriente.

Los individuos fueron separados por tallas (axis antero-posterior de la concha), utilizando un vernier digital de 0,01 mm de apreciación. La separación de las tallas se realizó considerando la inversión energética para el crecimiento, además de su capacidad reproductiva según Ruffini (1984). Las tallas correspondieron a juveniles (10-20 mm) donde la producción es destinada mayoritariamente al crecimiento, tallas medianas (40-45 mm) donde la producción es destinada tanto al crecimiento como a la reproducción, y en adultos (> 75 mm), donde la producción energética mayoritariamente es destinada al proceso reproductivo. Previo a los bioensayos, los mismos fueron mantenidos durante una semana en acuarios a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo 12:12, salinidad 36 ± 1 UPS y oxígeno disuelto de $6,5 \pm 1,3$ mg/L, siendo alimentados *ad libitum* con dieta de microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Testraselmis suecica*.

El bioensayo consistió en observar la reposición de concha al final del estudio, por lo que a todos los individuos

se les sustrajo en la zona ventral 3-5 mm de concha, utilizando un esmeril, siguiendo las recomendaciones de EPA (1996) para la ostra *Crassostrea virginica*. Luego, para cada talla, se condicionó un grupo con tres réplicas expuesto a una concentración subletal de 0,05 mg/L de Cd, estimada previamente según su dosis letal al 50% de la población (Villegas 2000). Otro grupo con el mismo número de individuos fue establecido a las mismas condiciones pero sin contaminante. El bioensayo se mantuvo casi estático en sus condiciones iniciales durante 7 días, con excepción de un recambio de agua a los cuatro días, siguiendo los criterios sugeridos por organizaciones internacionales como la ASTM y FAO (Nascimento *et al.* 2002). El número de individuos por réplica fue de cinco para juveniles, tres para organismos medianos y dos para adultos en contenedores de vidrio de 4 L con mar filtrada (1 μm) y tratada con UV, a las condiciones antes señaladas pero en inanición, en función de mantener una biomasa similar en los grupos experimentales (grupos de tallas). Al final del experimento, se determinó el consumo de oxígeno en cada réplica, posteriormente los individuos fueron sacrificados y se les sustrajo los tejidos, para obtener la masa seca y el índice de ARN/ADN.

Para la determinación del consumo de oxígeno, el número total de individuos de cada réplica se colocaron en un contenedor con agua de mar estéril, la cual fue aireada previamente con la intención de establecer la concentración de oxígeno antes de la prueba; la cámara se cubrió con una envoltura plástica transparente para impedir el intercambio de oxígeno con el medio durante un tiempo de 30 min, luego la concentración de oxígeno se determinó nuevamente. El consumo de oxígeno individual promedio para cada grupo de tallas se estimó por la diferencia de la concentración de oxígeno inicial y final. La concentración de oxígeno se determinó por la técnica clásica de Winkler, siguiendo las sugerencias de Senior (1996).

Para determinar la masa de los tejidos, el músculo aductor y el resto de tejido se pesaron con una balanza analítica (0,00001 g), tanto en húmedo como luego del tratamiento de deshidratación en estufa a 60°C durante 72 h (Lucas y Beninger 1984).

El índice ARN/ADN fue determinado de acuerdo a la metodología de Canino y Calderone (1995), a partir de 10 mg del músculo aductor (sustraído previamente durante la disección de los tejidos), el cual fue homogenizado en buffer TRIS 50 mmol, EDTA 0,5 mmol, pH = 7,5, luego se adicionó sarcosina 1% p/v. Una vez digerida la muestra con el detergente, tres alícuotas fueron tomadas para la determinación de los ácidos nucleicos con bromuro

de etidio, utilizando ARNasa 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para determinar ADN. Las lecturas se realizaron en un Fluorómetro Modelo 450 Sequoia-Turner a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 585 nm. Durante el proceso de obtención de los datos, el equipo fue calibrado cada diez mediciones. La determinación de ARN se realizó a través de la sustracción de ácidos nucleicos totales menos el ADN. La curva patrón de ARN se preparó por dilución seriada de ARN 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En todos los organismos se determinó la longitud de concha segregada en la sección de sustraída (reposición de concha) utilizando un analizador de imágenes de video, JAVELIN, adaptado a un microscopio óptico con un micrómetro ocular. En cada individuo, la nueva concha producida, se midió cinco veces, de forma equidistante, utilizándose como dato de medida individual la media de dichas estimaciones.

Al final del experimento los valores de reposición de concha y demás índices fisiológicos estudiados fueron analizados en cada una de las tallas, contrastando los tratamientos de control con el de exposición al Cd mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$), siguiendo las recomendaciones en Zar (1984).

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los valores obtenidos al final del bioensayo de la reposición de concha (mm), masas secas total, músculo y resto de tejido (g), consumo

de oxígeno (mL/L) e índice ARN/ADN. La regeneración de la concha no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los organismos de talla mediana y adultos; sin embargo, los valores promedios de la reposición de la concha de los organismos juveniles no expuestos al metal fue de $1,2 \pm 0,13$ mm, siendo significativamente mayores ($p < 0,05$) que los sometidos al Cd, los cuales presentaron un 42% menos de reposición de concha ($0,7 \pm 0,09$ mm).

El análisis de la masa seca total no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los grupos de tallas expuestas al metal con relación a su control; sin embargo, aún cuando no se observaron efectos significativos en el músculo que pudieran ser atribuidos al Cd se observó que los juveniles de mayor tamaño y los adultos mostraron una tendencia a la disminución. Con relación al resto del tejido, conformado por manto, tejido digestivo y gónadas, no mostraron variaciones atribuidas al metal. La relación ARN/ADN no mostró efectos significativos causados por la exposición al Cd, en cada grupo experimental. Llama la atención el menor índice de ARN/ADN observado para los organismos de mediana talla.

El consumo de oxígeno en los juveniles de menor talla, aunque no mostró diferencias significativas, se puede observar una tendencia a incrementar el consumo del mismo ante la presencia del Cd, mientras que los juveniles de mayor talla y los adultos presentaron tendencia a disminuir la tasa metabólica por disminución del consumo de oxígeno.

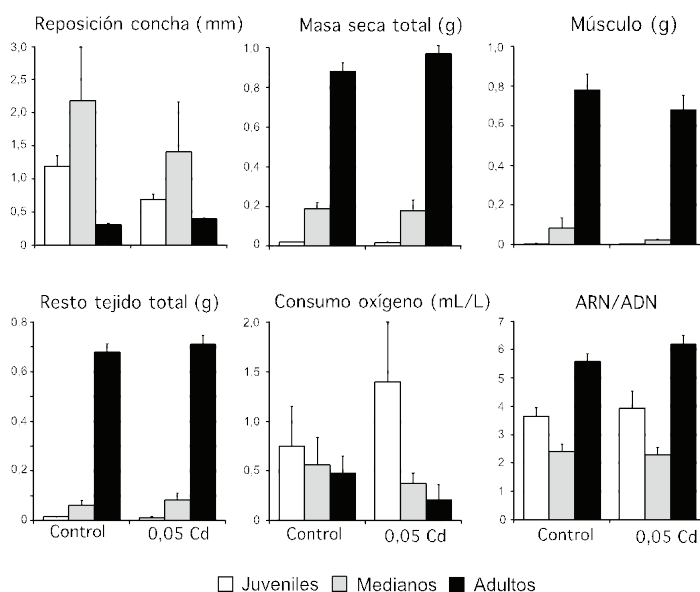


Figura 1. Valores promedios obtenidos al final del bioensayo de la reposición de concha (mm), masas secas (g) total, músculo y resto de tejido, consumo de oxígeno (ml/L) e índice ARN/ADN en las ostra perla *Pinctada imbricata* expuesta a la concentración subletal de 0,05 mg/L y sin el metal (control), durante 7 días.

DISCUSIÓN

Las diferencias de los promedios individuales de la masa de los diferentes tejidos evaluados entre los grupos utilizados, tanto en el tratamiento de exposición al Cd como el de no expuestos, obedecen a la condición establecida en talla de los mismos; de esta manera, los valores absolutos promedios mostrados que la producción de biomasa está relacionada positivamente a la talla. No obstante, la respuesta en tendencia del consumo de oxígeno fue diferente, aunque las diferencias no fueron significativas entre la exposición o no al Cd, en cada uno de los grupos de tallas, los juveniles expuestos al Cd mantienen una mayor tasa respiratoria, asociada a mayor metabolismo oxidativo que pudiera estar relacionado al proceso de metabolización de desintoxicación y depuración del metal. Caso contrario ocurre con los individuos medianos y adultos que mostraron menor tasa respiratoria y una ligera disminución causada por el metal, sugiriendo una disminución en la tasa metabólica. Este comportamiento pudiera estar asociado a una mayor tolerancia, que permite la entrada del metal al tejido y un menor efecto asociado al tamaño del organismo. Se ha determinado que los ejemplares juveniles y en etapa larvaria son mucho más sensibles a los tóxicos, pudiendo activar rápidamente mecanismos de defensa, mientras que los adultos son más tolerantes y permiten mayor incorporación del metal asociado a la mayor cantidad de tejido (Kannupandi *et al.* 2001).

En cuanto al índice de ARN/ADN, la relación positiva en talla es interrumpida por los individuos medianos, los cuales muestran un índice por debajo de los juveniles; es posible que estos individuos demandan mayor energía para satisfacer los estados de crecimiento y reproducción, y al estar en inanición muestran rápidamente un estado de mayor fatiga metabólica, que conduciría a una baja producción enzimática y con ello menor producción de ARN.

Aunque el diseño experimental en los bioensayos supuso un periodo de inanición, ello no limitó la capacidad de regeneración de concha, ya que los individuos mostraron restauración, particularmente en los juveniles y de talla mediana. Este último grupo experimental mostró una gran variabilidad de respuestas, quedando evidenciadas en sus elevados índices de dispersión, que probablemente podrían ser atribuidos a un requerimiento energético dual (crecimiento y reproducción). Ruffini (1984) indicó que la reproducción de *P. imbricata* no es sincrónica y los individuos en un momento dado se encuentran en diferentes estadios reproductivos, de esta

manera, algunos individuos podrían estar en etapas con energía acumulada en sus tejidos o en sus huevos, la cual podrían ser reabsorbida y canalizada para el mantenimiento basal y/o en el crecimiento corporal, a pesar de estar sometido a condiciones de inanición en el presente estudio, mostrando diferentes respuestas y generando la variabilidad observada.

Al comparar la respuesta de estos índices en cada una de las tallas expuestas o no al Cd, solo se presentó diferencias significativas en la regeneración de concha de los juveniles. Adicionalmente, aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto al más alto consumo de oxígeno de los juveniles ante la exposición al Cd, lo cual puede indicar mayor actividad metabólica como consecuencia de la actividad antitóxica como es reportado por Acosta y Lodeiros (2004) en efectos del Cu en la almeja *Tivela mactroides*. Posiblemente ello es debido a la activación metabólica de enzimas o proteínas transportadoras de metales como función de contribuir a la homeostasis del Cd, como han sugerido para *Perna viridis* Yang y Thompson (1996). Estudios de exposición al Cd en dosis subletales que incluyan valoraciones del estado metabólico y molecular de dichas proteínas deben ser realizados para verificar las hipótesis antes mencionadas.

Los juveniles, a diferencia de los organismos de mediana talla, mostraron menores índices de dispersión y la regeneración de concha fue significativamente menor cuando los organismos fueron expuestos al Cd, lo cual sugiere que el metal induce un gasto energético relevante como resultado de un proceso metabólico antitóxico y en consecuencia, restando energía utilizada para la deposición de concha. De esta manera, los individuos podrían distribuir la energía acumulada de manera tal, que garantice los procesos fisiológicos básicos, como consecuencia de la exposición al Cd y la carencia de alimento. En el grupo de los individuos adultos (> 75 mm), a diferencia de los juveniles y medianos, la reposición de concha fue mínima y poco homogénea, ya que ocurrió en algunos sectores de la concha (observación personal), lo cual condiciona a no considerar a individuos de esta talla para analizar los efectos tóxicos de contaminantes sobre la deposición de concha.

Aunque se ha estimado que la producción de concha en moluscos bivalvos requiere poca energía (Thompson y MacDonald 1991, Lodeiros y Himmelman 1994), el crecimiento de la concha representa un componente energético significativo de la producción total, la cual disminuye con la edad cuando una proporción importante de la energía es destinada a la producción de gametos

(Widdows 1985). En el caso de *P. imbricata*, Villalba (1995) señala que la producción de materia orgánica de la concha, varía desde 1,4 g de peso seco en los primeros 12 meses de edad hasta 0,03 g a los 3 años, que representan el 26,16% y 2,24% de la producción total anual, respectivamente. Estos resultados corroboran el uso de juveniles en ensayos ante estresores mediante la evaluación de reposición de concha.

Los metales y otros contaminantes acuáticos pueden influir en la mineralización normal y composición histoquímica en las conchas de las ostras, disminuyendo posiblemente la resistencia y estabilidad de las mismas (Rodney *et al.* 2007). Los procesos de biomineralización y secreción de nácar correspondientes a la reposición de la concha pudieran estar siendo retardados en el grupo expuesto al metal, como respuesta a la interacción de dicho elemento con los compartimentos de esta capa, esto corresponde a lo observado por Rousseau *et al.* (2005) que describen un desplazamiento sistemático abierto (de fluido a mineral maduro) en la organización de las filas de este estrato, las cuales están influenciadas por los componentes del agua, las variaciones del pH, entre otros incluyendo los contaminantes.

De los índices fisiológicos estudiados, la regeneración de la concha resultó ser el más apropiado para evaluar la condición fisiológica de la ostra perla *P. imbricata* expuesta al contaminante. El Cd no afectó la reposición de concha en los juveniles, dado que esta aumentó relativamente más que en las otras dos tallas, debido posiblemente a que en el estado juvenil no se producen acumulaciones energéticas que podrían coadyuvar a contrarrestar el estrés dado por el contaminante, lo cual podría enmascarar el verdadero efecto subletal del tóxico. Ello muestra que la utilización de los juveniles como indicadores biológicos es recomendable para establecer pruebas de toxicidad. Se sugiere continuar estudios de reposición de concha en juveniles de *P. imbricata* y otros bivalvos, para ser usados en protocolos estándares para pruebas toxicológicas. Dada la observación no homogénea de reposición de concha en los organismos de este estudio, se recomienda determinar la zona de la concha con una mayor y homogénea producción de cubierta por reposición, para dichos protocolos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente con el proyecto FONACIT-UDO 2011000344. La participación de César Lodeiros y Mairín Lemus se realizó respectivamente, en parte, durante su vinculación al

CENAIM-ESPOL y a la UTMACH, a través del Proyecto Prometo de la SENESCYT, Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA V, LODEIROS C. 2004. Efecto del cobre en juveniles de *Tivela mactroides* provenientes de ambientes con diferentes niveles de contaminación. Bol. Centro Invest. Biol. Univ. Zulia 38(1):41-52.
- AL-MADFA H, ABDEL-MOATI M, AL-GIMLAY F. 1998. *Pinctada radiata* (pearl oyster): A biomonitor for metal pollution in Qatari waters (Arabian Gulf). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60(2):245-251.
- BOU-OLAYAN A, AL-MATTAR S, AL-YAKOUB S, AL-HAZEEM S. 1995. Accumulation of lead, cadmium, copper and nickel by pearl oyster, *Pinctada radiata*, from Kuwait marine environment. Mar. Pollut. Bull. 30(3):211-214.
- CANINO M, CALDERONE E. 1995. Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. Fish. Bull. 93(1):158-165.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1996. Oyster acute toxicity test (shell deposition). Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Environmental Protection Agency of the United States of America, EPA 712-C-96-115.
- FOWLER S, READMAN J, OREGIONI B, VILLENEUVE J, MCKAY K. 1993. Petroleum hydrocarbons and trace metals in nearshore Gulf sediments and biota before and after the 1991 war: An assessment of temporal and spatial trends. Mar. Pollut. Bull. 27:171-182.
- GIFFORD S, DUNSTAN H, O'CONNOR W, MACFARLANE G. 2005. Quantification of in situ nutrient and heavy metal remediation by a small pearl oyster (*Pinctada imbricata*) farm at Port Stephens, Australia Source: Mar. Pollut. Bull. 50(4):417-422.
- GIFFORD S, MACFARLANE G, O'CONNOR W, DUNSTAN R. 2006. Effect of the pollutants lead, zinc, hexadecane and octocosane on total growth and shell growth in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. J. Shellfish Res. 25(1):159-165.
- HERNÁNDEZ K, GÓMEZ J. 2000. Acondicionamiento e inducción al desove de reproductores de *Pinctada*

- imbricata* Röding (1798) del Caribe colombiano. Scientia (Panamá). 15(1):61-80.
- JIMÉNEZ M, LODEIROS C, MÁRQUEZ A. 2000. Captación de juveniles de la madre perla *Pinctada imbricata* con colectores artificiales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. Caribb. J. Sc. 36(3-4):221-226.
- KANNUPANDI T, PASUPATHI K, SOUNDARAPANDIAN P. 2001. Chronic toxicity bioassay and effect of endosulfan, HCH, copper and zinc on the survival and intermoult duration of larvae of mangrove crab *Macrophthalmus erato* De Man. Indian J. Exp. Biol. 39(8):814-817.
- LEMUS M, LAURENT C, ARLYS A, MERIS C, APONTE A, CHUNG K. 2010. Variación estacional de metales pesados en *Perna viridis*, de la localidad de Guayacán, Península de Araya edo. Sucre, Venezuela. Biologist. 8(2):126-138.
- LEMUS M, BALZA M, MARTÍNS C. 2012. Respuestas fisiológicas y acumulación de cadmio en el bivalvo *Lima scabra* (Born, 1778) (Pterioida: Limidae). Bol. Inst. Oceanogra. Venez. 51(1):54-59.
- LEÓN L, CABRERA T, TROCCOLI L. 1987. Fijación e índice de engorde de la Ostra perla *Pinctada imbricata* Röding 1798 (Mollusca: Bivalvia) en tres bancos naturales del nororiente de Venezuela. Contribuciones Científicas, Univ. Oriente. 12(1):1-44.
- LODEIROS C. 2011. Selección de especies de moluscos bivalvos en el nororiente de Venezuela para ser utilizados en bioensayos de toxicidad. X Congreso SETAC 2011. Cumaná, Venezuela, p. 32.
- LODEIROS C, HIMMELMAN J. 1994. Relation among environmental conditions and growth in the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. Aquaculture. 119(4): 345-358.
- LODEIROS C, FREITES L. 2008. Estado actual y perspectivas del cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela. *En*: Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, No. 12, Roma, Italia, pp. 135-150.
- LODEIROS C, MARÍN B, PRIETO A. 1999. Catálogo de moluscos del nororiente de Venezuela. Clase Bivalvia. Edición APUDONS, Cumaná, Venezuela, 9 Láminas, pp. 109.
- LUCAS A, BENINGER P. 1984. The use of physiological condition indices in marine bivalves aquaculture. Aquaculture. 44(4):187-200.
- MACFARLANE G, MARKICH S, LINZ K, GIFFORD S, DUNSTAN R, O'CONNOR W, RUSSELL R. 2006. The Akoya pearl oyster shell as an archival monitor of lead exposure. Environ. Pollut. 143(1):166-173.
- NASCIMENTO I, SOUSA C, NIPPER M. 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda. Salvador, Brasil, pp. 201.
- NUSETTI O, MARCANO L, ZAPATA E, ESCLAPÉS M, NUSETTI S, LODEIROS C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil No. 6. Interciencia. 29(6):324-328.
- O'CONNOR W, LAWLER N. 2004. Reproductive condition of the pearl oyster, *Pinctada imbricata*, Röding, in Port Stephens, New South Wales, Australia. Aquacul. Res. 35(4):385-396.
- O'CONNOR W, MACFARLANE G. 2005. Quantification of in situ nutrient and heavy metal remediation by a small pearl oyster (*Pinctada imbricata*) farm at Port Stephens, Australia Gifford S., Dunstan H. Mar. Pollut. Bull. 50(4):417-422.
- RODNEY E, HERRERA P, LUXAMA J, BOYKIN M, CRAWFORD A, CARROLL M, CATAPANE E. 2007. Bioaccumulation and tissue distribution of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Crassostrea virginica* grown at two different depths in Jamaica Bay, New York. In Vivo. Fall. 29(1):16-27.
- ROUSSEAU M, LÓPEZ E, COUTÉ A, MASCAREL G, SMITH D, NASLAIN R, BOURRAT X. 2005. Sheet nacre growth mechanism: A Voronoi model. J. Struct. Biol. 149(2):149-157.
- RUFFINI E. 1984. Desarrollo larval experimental de la ostra perla *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) (Mollusca: Bivalvia) y algunas observaciones sobre su reproducción en el banco natural de Punta Las

- Cabeceras, Isla de Cubagua, Venezuela. Cumaná: Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departameto de Biología. pp. 51.
- SARVER D, SIMS N, HARMON V. 2003. Pearl oysters as a sensitive, sessile monitor for non-point source heavy metal pollution. SPC Pearl Oyster Inform. Bull. 16:13-14.
- SENIOR W. 1996. Guía práctica de análisis químico de aguas naturales y de mar. Cumaná: Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela [Manual del Curso de Crucero Oceanográfico, Maestría en Ciencias Marinas]. pp. 32.
- THOMPSON R, MACDONALD B. 1991. Physiological integrations and energy partitioning. *In*: SHUMWAY SE (Ed). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 347-376.
- VILLEGAS L. 2000. Efectos tóxicos del cadmio en la ostra perla *Pinctada imbricata* Röding, 1798 (Mollusca: Bivalvia). Cumaná: Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Postgrado en Ciencias Marinas [Maestría en Ciencias Marinas]. pp. 58.
- YU D, CHU K. 2006. Species identity and phylogenetic relationship of the pearl oysters in *Pinctada* Röding, 1798 based on ITS sequence analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 34(3):240-250.
- URBAN HJ. 2000. Culture potential of the pearl oyster *Pinctada imbricata* from the Caribbean. II. Spat collection, and growth and mortality in culture Systems. *Aquaculture.* 189(3-4): 375-388.
- VILLALBA W. 1995. Biomasa de los compartimientos específicos de la producción secundaria en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Röding 1798) de la localidad del Guamache, edo. Sucre, Venezuela. Cumaná, Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología [Trabajo de Grado Licenciado Biología]. pp. 92.
- WADA K, TEMKIN I. 2008. Taxonomy and Phylogeny. *In*: The Pearl Oyster. Southgate PC, Lucas LS (Eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 37-76.
- WIDDOWS J. 1985. Physiological procedures. Chapter 7. *In*: BAYNE B, BROWN D, BURNS K, DIXON D, IVANOVICI A, LIVINGSTONE D, LOWE D, MOORE M, STEBBING A, WIDDOWS J (Eds.). The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger Press, New York, USA. pp. 161-178.
- YANG M, THOMPSON J. 1996. Binding of endogenous copper and zinc to cadmium-induced metal-binding proteins in various tissues of *Perna viridis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30(2):267-273.
- ZAR J. 1984. Biostatistica Analysis. Segunda Edición. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA. pp. 718.