

Heavy metals and related biomarkers in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) collected on the coast of Sucre State, Venezuela

Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela

E Zapata-Vívenes^{1*}, L Rojas de Astudillo², G Sánchez³, M Barreto³

¹ Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cerro Colorado, Cumaná, Venezuela.

² Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela.

³ Postgrado en Biología Aplicada, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela.

* Corresponding author. E-mail: edzapata2002@yahoo.com

ABSTRACT. The green mussel *Perna viridis* has been used as a sentinel organism in marine and coastal ecosystem health assessments. In this study the degree of contamination at three sites on the coast of Sucre State (Venezuela) was analyzed using molecular, cellular, and immunological biomarkers in *P. viridis*. Specimens were collected from Chacopata-Guayacán (CG, Araya Peninsula), Río Caribe (RC, Paria Peninsula), and San Antonio del Golfo (SAG, southern Gulf of Cariaco). We determined the concentration of heavy metals in the soft tissue of each individual, as well as the total number, viability, phagocytosis, and stability of the lysosomal membranes in hemocytes. The oxidative damage to lipids (TBARS), sulfhydryl group levels, total proteins, and lysozyme activity were quantified in the digestive gland. The results revealed high concentrations of Zn, Cr, and Cd in the organisms from CG. The total hemolymph cell count was lower in organisms from RC and CG. A slight increase in the number of phagocytes was observed in the organisms from RC and CG relative to those from SAG. The highest percentage of hemocytes with destabilized lysosomal membranes was recorded for the organisms from CG, followed by RC, indicating a weak association with the content of peroxidized lipids (TBARS); these values could be associated with the body loads of heavy metals. According to the results, the mussels from CG show slight signs of contamination by heavy metals, likely originated by human activities. The use of biological markers to estimate the effect of heavy metals on sentinel organisms is recommended.

Key words: antioxidant defenses, hemocytes, lysozymes, heavy metals, *Perna viridis*.

RESUMEN. El mejillón verde *Perna viridis* ha sido usado como organismo biosensor de la salud de ecosistemas marino-costeros. Por tal motivo se procedió a evaluar el grado de contaminación de tres localidades costeras del estado Sucre (Venezuela) determinando biomarcadores a nivel molecular, celular e inmunológico en *P. viridis*. Los ejemplares fueron recolectados en las localidades de Chacopata-Guayacán (CG, península de Araya), Río Caribe (RC, península de Paria) y San Antonio del Golfo (SAG, región sur del golfo de Cariaco). Se determinó la carga de metales pesados en el tejido blando de cada individuo. Además, se valoró el número total, la viabilidad, la fagocitosis y la estabilidad de las membranas lisosomales en los hemocitos. El daño oxidativo de lípidos (TBARS), los niveles de grupos sulfhídricos, las proteínas totales y la actividad de la lisozima fueron cuantificados en la glándula digestiva. Los resultados evidencian altas concentraciones de Zn, Cr y Cd en organismos provenientes de CG. El número de células totales en hemolinfa fue menor en los organismos de RC y CG. En estas últimas zonas los mejillones presentaron un ligero incremento en número de fagocitos con respecto a SAG. El mayor porcentaje de hemocitos con membranas lisosomales desestabilizadas fue encontrado en los organismos de CG, seguido de RC, evidenciándose una débil asociación con el contenido de lípidos peroxidados (TBARS); estos valores podrían tener correspondencia con la acumulación corporal de metales pesados. Los resultados revelan que los mejillones de CG muestran ligeros indicios de contaminación por metales pesados, originados presumiblemente por actividades antropogénicas. Esta investigación sugiere la utilidad de marcadores biológicos destinados a estimar el impacto de metales pesados en organismos centinelas.

Palabras clave: defensas antioxidantes, hemocitos, lisozimas, metales pesados, *Perna viridis*.

INTRODUCTION

The levels of heavy metals in some coastal areas of Sucre State (Venezuela) have recently increased due to human activities (Martínez 2002). Possible sources are urban and industrial effluents, and freshwater flows that transport these metals from areas of intense industrial and mining activity to coastal ecosystems. To assess the health of these areas, the

INTRODUCCIÓN

Los niveles de metales pesados en algunas zonas costeras del estado Sucre (Venezuela) han incrementado recientemente a causa antropogénica (Martínez 2002). Las posibles fuentes son los efluentes urbanos e industriales, inclusive las descargas límnicas que transportan dichos metales desde sitios de intensa actividad industrial y minera hasta los

green mussel *Perna viridis* has been selected as a biosentinel species to estimate the level of contamination. This mytilid has sensitive biological markers that are modulated during sublethal exposure to heavy metals (Zapata-Vivenes and Nusetti 2007, Nusetti *et al.* 2010).

Immune, molecular, and cellular responses in bivalves are important biomarkers for assessing the effects induced by exposure to chemical pollutants. The ingestion and subsequent metabolism of xenobiotics can alter the function and balance of the immune system, producing adverse effects such as immunosuppression, abnormal cell proliferation, and alteration of the host's defense mechanisms against pathogens (Cheng 1988, Cheung *et al.* 2001). The immune defense system in bivalves consists of hemocytes, bacteriolytic molecules, and lysosomal degradation (Sminia 1980).

Likewise, the effects of heavy metals at cellular level can be detected through alterations in the stability of the lysosomal membranes (Lowe 1995). The evaluation of lysosomal membrane integrity indicates possible deleterious conditions associated with drastic and irreversible changes that occur in the environment and can be an alternative in preventive decision-making. This parameter of cell damage can be estimated using the retention capacity of dyes, such as neutral red, which may indicate a proportional relationship between the reduction in die retention time in cells of organisms inhabiting areas impacted by xenobiotics (Fang *et al.* 2008).

Antioxidant molecules and oxidative damage of the membrane lipids have been used frequently as molecular biomarkers of chemical stress, especially pro-oxidant agents such as some heavy metals. The use of responses at different levels of biological organization, from molecular to cellular, provides relevant information about the condition of the organism under study and thus the data needed to understand the mode of action, intoxication, and depuration of xenobiotics.

Perna viridis is an abundant species along the coast of Sucre State, inhabiting natural banks particularly in the areas of Chacopata-Guayacán and Río Caribe. Moreover, a sector interested in the suspended culture of this species has set up small experimental farms on the southern coast of the Gulf of Cariaco, especially at San Antonio del Golfo. The objective of this study was to analyze different biomarkers, including immune, biochemical, and cellular responses, in *P. viridis* collected on the coast of Sucre State in order to establish the health of the organisms and its relation to the body load of heavy metals.

MATERIAL AND METHODS

Study area

Specimens of the green mussel *P. viridis* were collected from three sites on the coast of Sucre State, northeastern Venezuela (fig. 1): Chacopata-Guayacán (CG, 10°43'25" N, 64°52'6" W), in the northern part of the Araya Peninsula; Río Caribe (RC, 10°42'34" N, 63°06'54" W), in the northeastern part of the Paria Peninsula; and San Antonio del Golfo

sedimentos de ecosistemas locales. Para evaluar el estado de salud de estas zonas, se ha seleccionado al mejillón verde *Perna viridis* como especie biosensora para estimar el nivel de contaminación. Este mitílido posee marcadores biológicos sensibles que son modulados bajo exposición subletal a metales pesados (Zapata-Vivenes y Nusetti 2007, Nusetti *et al.* 2010).

Las respuestas inmunológicas, moleculares y celulares en bivalvos constituyen biomarcadores importantes en las evaluaciones de efectos inducidos por la exposición a contaminantes químicos. El ingreso y posterior metabolismo de tales xenobióticos puede alterar las funciones y el balance del sistema inmune, resultando en efectos perjudiciales, que incluyen inmunosupresión, proliferación anormal celular y alteración de los mecanismos de defensa del hospedero contra patógenos (Cheng 1988, Cheung *et al.* 2001). El sistema de defensa inmunológico en bivalvos está constituido por hemocitos, moléculas bacteriolíticas y degradación a nivel lisosomal (Sminia 1980).

De igual forma, los efectos de los metales pesados a nivel celular pueden ser detectados por alteraciones de la estabilidad de membranas lisosomales (Lowe 1995). La determinación de la integridad de la membrana lisosomal indica posibles condiciones deletéreas ante cambios drásticos e irreversibles que ocurren en el ambiente y puede ser una alternativa en la toma de decisiones preventivas. Este parámetro de daño celular puede estimarse mediante la capacidad de retención de colorantes, tal como el rojo neutro, lo cual puede indicar una relación proporcional entre la reducción del tiempo de retención del colorante en células de organismos que habitan zonas impactadas por xenobióticos (Fang *et al.* 2008).

Las moléculas antioxidantes y los daños oxidativos a nivel de lípidos de membrana han sido utilizados frecuentemente como biomarcadores moleculares de estrés químico, especialmente por agentes pro-oxidantes como algunos metales pesados. El uso de respuestas a diferentes niveles de organización biológica, desde el nivel molecular hasta el celular, origina información relevante sobre las condiciones del organismo en estudio y provee los datos necesarios para el entendimiento del modo de acción, intoxicación y depuración de xenobióticos.

El mejillón verde *P. viridis* es una especie abundante en las costas del estado Sucre, la cual habita en bancos naturales, particularmente en las zonas de Chacopata-Guayacán y Río Caribe. Adicionalmente, un sector interesado en el cultivo suspendido de la especie ha iniciado pequeños sembrados experimentales en la franja costera sur del golfo de Cariaco, especialmente en la localidad de San Antonio del Golfo. En tal motivo, en esta investigación se contrastan diversos biomarcadores, que incluyen respuestas inmunológicas, bioquímicas y celulares, en *P. viridis* recolectado en las costas del estado Sucre con el fin de establecer la salud de los organismos y su relación con la carga corporal de metales pesados.

(SAG, 10°27'5" N, 63°46'23" W), in the southeastern Gulf of Cariaco. Highly exploitable natural banks of *P. viridis* are found around CG and RC, whereas small-scale mussel farming is carried out at SAG.

Mussels were collected manually by divers at 1 to 2 m depth. At each site, between 60 and 80 unsexed, sexually mature (stage II, unspawned) organisms were selected (Sreenivasan *et al.* 1989), ranging in size from 7.5 to 9.2 cm. The specimens were collected in February and March under homogeneous environmental conditions: temperature, 26.50–27.01 °C; salinity, 36.0–37.0; and pH, 7.55–8.10. They were transported to the laboratory and, prior to analysis, kept for three days in tanks under controlled conditions (temperature, 25 ± 2 °C; salinity, 36 ± 0.1; pH, 7.7 ± 0.2; oxygenation, 90–95%) and fed, *ad libitum*, the microalga *Chaetoceros gracilis*.

Analysis of heavy metals

The determination of heavy metals was performed using a Perkin-Elmer model 5300 inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer (ICP-OES). Soft tissue samples were dried at 60 °C for 3 days, weighed, and pre-digested in 10 mL of concentrated nitric acid at room temperature over 24 h, followed by digestion at 60 °C for 4 h and then at 80 °C for 2 h. The sample was allowed to cool and 10 mL of deionized water were added; the solution was filtered through Whatman No. 42 filter paper and deionized water was added to a final volume of 25 mL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los ejemplares del mejillón verde *P. viridis* fueron recolectados en tres localidades costeras del estado Sucre, situadas al noreste de Venezuela (fig. 1): Chacopata-Guayacán (CG, 10°43'25" N, 64°52'6" O), en la región norte de la península de Araya; Río Caribe (RC, 10°42'34" N, 63°06'54" O), al noreste de la península de Paria; y San Antonio del Golfo (SAG, 10°27'5" N, 63°46'23" O), en el sureste del Golfo de Cariaco. Las zonas CG y RC constituyen bancos naturales extensamente explotables de la especie, y SAG es un área de cultivo de mejillones de baja escala.

La recolección de los bivalvos se realizó manualmente mediante buceo a profundidades de 1 a 2 m. En cada estación de muestreo, se seleccionaron entre 60 y 80 organismos sexualmente maduros (en estadio II, no desovados) (Sreenivasan *et al.* 1989), sin distinción de sexo y con tallas entre 7.5 y 9.2 cm. Los animales fueron recolectados entre febrero y marzo en condiciones ambientales homogéneas: temperatura, 26.50–27.01 °C; salinidad, 36.0–37.0; y pH, 7.55–8.10. Antes de los análisis, los ejemplares fueron transportados al laboratorio y mantenidos durante tres días en acuarios bajo condiciones controladas (temperatura, 25 ± 2 °C; salinidad, 36 ± 0.1; pH, 7.7 ± 0.2; oxigenación, 90–95%) y alimentados *ad libitum* con la microalga *Chaetoceros gracilis*.

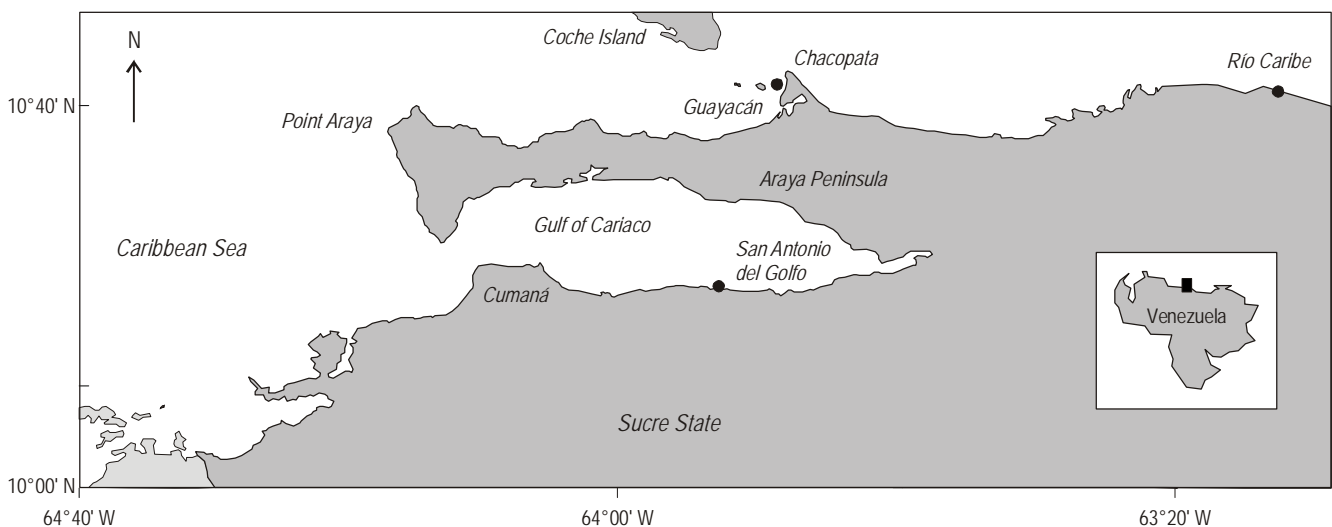


Figure 1. Geographic location of the collecting sites of the green mussel *Perna viridis*: Chacopata-Guayacán, Río Caribe, and San Antonio del Golfo (northeastern Venezuela).

Figura 1. Localización geográfica de las localidades de recolección del mejillón verde *Perna viridis*: Chacopata-Guayacán, Río Caribe y San Antonio del Golfo (Venezuela nororiental).

The ICP-OES conditions for the metal analysis were: exterior argon gas flow rate of 15 L min⁻¹, nebulization gas flow rate of 0.5 L min⁻¹, auxiliary gas flow rate of 0.2 L min⁻¹, radio frequency of 1300 W, and peristaltic pump flow rate of 1.5 L min⁻¹. Each metal was measured at a characteristic wavelength and their detection limits were determined from a calibration curve (Meier and Zünd 1993). The wavelength (nm) and detection limit (µg g⁻¹) for each metal were, respectively, 206,200 and 0.10 for Zn, 327,393 and 0.05 for Cu, 228,802 and 0.04 for Cd, 267,716 and 0.05 for Cr, 238,204 and 0.08 for Fe, and 220,353 and 0.01 for Pb.

Hemolymph extraction

Hemolymph was obtained by directly puncturing the foot and venous sinus using a 1-mL hypodermic syringe with a 20 gauge needle, containing 0.5 mL of sterile filtered seawater (45-µm Millipore filter). The volume of extracted hemolymph (~0.5 mL) was maintained at 10 °C, and then centrifuged at 900 g for 10 min at 10 °C. The precipitate fraction was removed and resuspended in 1 mL of seawater with ethylenediamine tetracetic acid (EDTA, 4 µmol L⁻¹). This fraction was used to evaluate the cytological parameters and immune functions.

Cell viability and total number of hemocytes

These parameters were determined by differential staining with eosin yellow (0.1%) in sterile filtered seawater: 100 µL of the final hemocyte suspension were taken and mixed with an equal volume of the dye; the mixture was resuspended and a 10-µL aliquot was taken for cell counting using a hemocytometer and light microscope (400× magnification) (Goven *et al.* 1996).

Phagocytosis

The total hemocyte count was adjusted to ~2 × 10⁶ cells mL⁻¹. The heat-inactivated yeast *Saccharomyces cerevisiae* (5 mg mL⁻¹ in sterile seawater) was used as antigen (Zapata-Vívenes *et al.* 2005); 200 µL of yeast were taken and diluted in 3 mL of filtered seawater, and 100 µL of the hemocyte suspension and an equal volume of the final yeast suspension were gently mixed and centrifuged at 1000 g for 5 min. The centrifuged samples were incubated for 24 h at 8 °C, and 100 µL of trypan blue (0.4% w/v) were added to the cellular precipitate. A 10-µL aliquot was placed in a hemocytometer for cell counting with a light microscope (400× magnification).

Lysozymes

Lysozyme activity in the digestive gland of *P. viridis* was detected by the lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cell walls, using agarose lysoplates (Goven *et al.* 1994). The gel

Determinación de metales pesados

La determinación de metales pesados se realizó con un espectrofotómetro de emisión óptica con fuente de plasma de inducción (ICP-OES, por sus siglas en inglés), marca Perkin Elmer modelo 5300. Las muestras de tejido blando fueron deshidratadas a 60 °C durante 3 días, pesadas y predigeridas en 10 mL de ácido nítrico concentrado a temperatura ambiente durante 24 h. Seguidamente, las muestras fueron digeridas a 60 °C por 4 h y luego a 80 °C por 2 h. Se dejaron enfriar y se adicionaron 10 mL de agua desionizada; la solución se filtró a través de papel Whatman No. 42 y se completó con agua desionizada hasta un volumen final de 25 mL.

Para la determinación de los metales con el ICP-OES, las siguientes condiciones fueron utilizadas: flujo de gas exterior de argón de 15 L min⁻¹, flujo de gas al nebulizador de 0.5 L min⁻¹, flujo de gas auxiliar de 0.2 L min⁻¹, radio frecuencia de 1300 W y flujo de la bomba peristáltica de 1.5 L min⁻¹. Cada metal se midió a una longitud de onda característica y sus límites de detección se determinaron por medio de una curva de calibración (Meier y Zünd 1993). Para cada metal, la longitud de onda (nm) y el límite de detección (µg g⁻¹) fueron, respectivamente, 206,200 y 0.10 para Zn; 327,393 y 0.05 para Cu; 228,802 y 0.04 para Cd; 267,716 y 0.05 para Cr; 238,204 y 0.08 para Fe; y 220,353 y 0.01 para Pb.

Extracción de la hemolinfa

La hemolinfa fue extraída por punción directa al pie y seno venoso con una jeringa hipodérmica de 1 mL de capacidad con aguja calibre 20 que contenía 0.5 mL agua de mar estéril, filtrada a miliporo (45 µm). El volumen de hemolinfa extraído (~0.5 mL) fue mantenido a 10 °C. Luego se centrifugó a 900 g durante 10 min a 10 °C. Se tomó la fracción precipitada y finalmente se resuspendió en 1 mL de agua de mar con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 4 µmol L⁻¹). Esta fracción fue usada para determinar los parámetros citológicos y las funciones inmunológicas.

Viabilidad celular y número total de hemocitos

Estos parámetros fueron determinados por tinción diferencial con eosina amarilla (0.1%) en agua de mar filtrada y estéril. Se tomaron 100 µL de la suspensión final de hemocitos y se mezclaron con un volumen igual del colorante; se resuspendió la mezcla y luego se tomó una alícuota de 10 µL para hacer el conteo celular en un hemocitómetro por microscopía de luz (magnificación de 400 ×) (Goven *et al.* 1996).

Fagocitosis

El número total de hemocitos se ajustó a ~2 × 10⁶ células mL⁻¹. Se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, inactivada por calor (5 mg mL⁻¹ en agua de mar estéril), como antígeno (Zapata-Vívenes *et al.* 2005). Se tomaron 200 µL de

was prepared using 67 mmol L⁻¹ of potassium phosphate (KH₂PO₄) buffer (pH 6.0), 1% agarose (type II), 0.1% sodium chloride, and 0.4 mg mL⁻¹ of *M. lysodeikticus*. The digestive gland was extracted from 12 bivalves from each site and homogenized in 100 mmol L⁻¹ of KH₂PO₄ buffer (pH 6.24) at 4 °C (20% w/v). The resulting homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min, and the supernatant was used as lysozyme source. A volume equivalent to 40 µL of the extract was placed, under sterile conditions, in each hole of the lysoplate. The lysoplates were incubated in an oven at 37 °C for 48 h. The diameters of the inhibition halos were measured and compared using hen egg-white lysozyme (HEL).

Lysosomal stability

The collected hemolymph was transferred to a siliconized tube and conserved for a maximum of 3–5 min; 40 µL of the tube's content were transferred to the plate and mixed with 40 µL of neutral red dissolved in dimethyl sulfoxide on the plate for 15 min in a humid, dark chamber (Lowe *et al.* 1992). Observations were made using a light microscope (400× magnification) for 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min, and the percentage of damaged hemocytes was quantified.

Lipid peroxidation

Lipoperoxidation was analyzed by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa *et al.* 1979). The digestive glands were homogenized in 50 mmol L⁻¹ imidazole-HCl at 15 °C and centrifuged at 1000 g for 20 min. The homogenate was incubated for 10 min at 37 °C with constant agitation, after which 12.5% trichloroacetic acid, 0.8 mol L⁻¹ HCl, and 1% thiobarbituric acid were added in a water bath at 90 °C with constant agitation for 30 min. Each sample was placed in an ice bath for 10 min and then centrifuged at 1500 g for 10 min at 4 °C. The absorbance was measured at 535 nm. The concentration of TBARS was calculated using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard. The values were expressed as nanomoles of TBARS per milligram of protein.

Sulphydryl groups

To determine the thiol (-SH) groups we used the method developed by Ellman (1958), based on the quantification of free or protein-bound thiols by the reaction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), until forming the 2-nitro-5-benzoate anion. A buffer solution containing 30 mmol L⁻¹ HCl-EDTA was prepared and the pH was adjusted to 8.2. Each test tube was filled with 50 µL of the extract, 150 µL of the buffer solution, 800 µL of methanol, and 50 µL of DTNB, and then mixed and allowed to rest for 5 min at room temperature. The samples were then centrifuged at 1000 g for 5 min. Finally, the supernatant was taken and the absorbance was

las levaduras y se diluyeron en 3 mL de agua de mar filtrada. Se mezclaron suavemente 100 µL de la suspensión de hemocitos con un volumen igual de la suspensión final de levaduras y luego se centrifugaron a 1000 g por 5 min. Las muestras centrifugadas se incubaron por un periodo de 24 h a 8 °C. Al precipitado celular se le añadieron 100 µL de azul de tripano (0.4% m/v). Una alícuota de 10 µL se colocó en un hemocitómetro para conteo en microscopio de luz (400 × de magnificación).

Lisozimas

El protocolo empleado para evaluar la actividad de la lisozima en la glándula digestiva de *P. viridis* fue basado en la lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus*, empleando lisoplasmas de agarosa (Goven *et al.* 1994). El gel se preparó con 67 mmol L⁻¹ de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (KH₂PO₄, pH 6.0), agarosa (tipo II) al 1%, cloruro de sodio (NaCl) al 0.1% y 0.4 mg mL⁻¹ de *M. lysodeikticus*. Se extrajeron las glándulas digestivas de 12 bivalvos de cada localidad y, seguidamente, se homogeneizaron en 100 mmol L⁻¹ de una solución amortiguadora de KH₂PO₄ (pH 6.24) a 4 °C (20% m/v). El homogeneizado resultante se centrifugó a 2000 g por 10 min, y el sobrenadante obtenido se empleó como fuente de lisozima. Un volumen equivalente a 40 µL del extracto se sembró, bajo condiciones estériles, en cada orificio de la lisoplasma. Las lisoplasmas fueron incubadas a 37 °C en una estufa durante 48 h. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos y contrastados con lisozima de clara de huevo (HEL) estándar.

Estabilidad lisosomal

La hemolinfa recolectada se transfirió a un tubo siliconizado y se conservó por un máximo de 3–5 min. Se transfirieron 40 µL del contenido del tubo a la lámina y se mezclaron con 40 µL de rojo neutro disuelto en dimetil sulfoxido en la lámina por 15 min en cámara húmeda y oscura (Lowe *et al.* 1992). Las observaciones se realizaron con un microscopio de luz (magnificación de 400 ×) durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min, y se cuantificó el porcentaje de células dañadas.

Peroxidación de lípidos

La lipoperoxidación se determinó por el revelado de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa *et al.* 1979). Las glándulas digestivas fueron homogeneizadas en 50 mmol L⁻¹ de imidazol-HCl a 15 °C y centrifugadas a 1000 g durante 20 min. El homogeneizado se incubó durante 10 min a 37 °C con agitación constante, y posteriormente se le adicionó ácido tricloroacético al 12.5%, 0.8 mol L⁻¹ de HCl y ácido tiobarbitúrico al 1% en un baño de agua a 90 °C con agitación constante durante 30 min. Cada

measured at 412 nm. The concentration of the -SH groups was calculated from a calibration curve prepared using reduced glutathione (GSH) as standard.

Proteins

Total proteins were quantified by the method proposed by Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin.

Statistical analysis

A simple analysis of variance with replication was used and all assumptions were met. Tukey's multiple comparison test (Sokal and Rohlf 1981) was applied. Pearson's correlation analysis was used to estimate the relationship between the molecular and cellular parameters and the body load of heavy metals.

RESULTS

The levels of essential metals varied among the organisms collected. The highest mean levels of Cu and Fe were found in the specimens from the mussel culture rafts at SAG, while increased levels of Zn and Cr were observed in specimens from CG. Likewise, the concentrations of non-essential metals such as Cd and Pb were higher in the mussels collected at CG (table 1).

Hemocytic cell viability did not show statistically significant variations among the organisms collected at the different sites (table 2), ranging from 70% to 100%, with mean values oscillating between 78.50% and 89.40%. Regarding the total number of hemocytes, lower values were recorded for the mussels from CG and RC than for those from SAG (2.02×10^5 cells mL⁻¹). The percentage of phagocytes was significantly higher for the organisms from CG and RC than for those from SAG. Lysozyme activity was slightly higher for the organisms from RC, but there was no significant statistical difference.

The molecular biomarkers examined showed high concentrations of total proteins and -SH groups in the mussels from SAG, indicating the nutritional state and antioxidant (thiol) levels. Conversely, elevated TBARS levels (a marker of oxidative damage) were observed in mussels from CG and RC (table 3).

The percentage of cells with reduced ability to retain neutral red in their lysosomal compartments was significantly high for the organisms from CG ($F_s = 3.59$; $P < 0.05$): cellular effects were observed in the first 15 min of the assay, with 25.60% of damaged hemocytes, and the values continued to increase until reaching 37.70% of damaged hemocytes in 90 min. (fig. 2). The highest mean values for RC were reached in 120 min (26.60%). The organisms from SAG showed highest lysosomal stability, ranging from 86.80% to 95.40% during the course of the assay.

muestra fue colocada en baño de hielo durante 10 min y luego centrifugada a 1500 g durante 10 min a 4 °C. La absorbancia de las muestras se midió a 535 nm. La concentración de TBARS se calculó con 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar. Los valores se expresaron en nanomoles de TBARS por miligramos de proteínas.

Grupos sulfhidrilos

Para la determinación de los grupos tioles (-SH), se aplicó el método desarrollado por Ellman (1958), fundamentado en la cuantificación de tioles libres o asociados a proteínas mediante la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), hasta formar el anión 2-nitro-5-benzoato. Para ello, se preparó una solución amortiguadora compuesta por Tris HCl-EDTA 30 mmol L⁻¹ y se ajustó el pH a 8.2. A cada tubo de ensayo se le adicionaron 50 µL de extracto, 150 µL de la solución amortiguadora, 800 µL de metanol y 50 µL de DTNB, luego se mezcló y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras a 1000 g durante 5 min. Finalmente, se tomó el sobrenadante para medir la absorbancia a 412 nm. La concentración de -SH se calculó por medio de una curva de calibración preparada con glutatona reducida (GSH) como estándar.

Proteínas

La cuantificación de proteínas totales se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951), usando como estándar albúmina de suero bovino.

Análisis estadísticos

Se empleó un análisis de varianza sencillo con réplica, cumpliéndose todos los supuestos. Se aplicó una prueba de contraste múltiple de Tukey (Sokal y Rohlf 1981). En adición, se estimó la asociación entre los parámetros moleculares y celulares y el contenido corporal de metales pesados mediante un análisis de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Los niveles de los metales esenciales presentaron variaciones entre los organismos recolectados. Los mayores niveles promedio de Cu y Fe se observaron en los ejemplares provenientes de las balsas de cultivos de SAG, mientras que los niveles de Zn y Cr se incrementaron en los mejillones de CG. Del mismo modo, las concentraciones de los metales no esenciales como Cd y Pb fueron superiores en los ejemplares recolectados en las costas de CG (tabla 1).

La viabilidad celular en hemocitos no presentó variación estadística entre los organismos recolectados entre localidades (tabla 2), con un intervalo de 70% a 100% y promedios que oscilaron entre 78.50% y 89.40%. Con respecto al

Table 1. Heavy metals in the soft tissue of the green mussel *Perna viridis* collected at three sites on the coast of Sucre State (Venezuela). The data are given in microgramos (μg) of metal per gram dry weight (mean \pm standard deviation).**Tabla 1.** Metales pesados en el tejido blando del mejillón verde *Perna viridis* recolectado en tres localidades costeras del estado Sucre (Venezuela). Los datos se expresan en microgramos (μg) de metal por gramo de masa seca (media \pm desviación estándar).

| Metal | Chacopata-Guayacán | Río Caribe | San Antonio del Golfo | <i>F_s</i> | <i>P</i> |
|-------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| Cu | 8.17 \pm 4.03* | 5.67 \pm 0.69* | 11.11 \pm 1.26 | 3.08 | 0.059 |
| Fe | 103.18 \pm 92.69 | 51.10 \pm 10.31* | 138.41 \pm 15.83 | 3.07 | 0.061 |
| Zn | 51.33 \pm 9.98* | 37.78 \pm 10.23* | 13.20 \pm 7.61 | 9.55 | <0.001 |
| Cr | 5.84 \pm 2.73* | 1.36 \pm 0.45 | 3.60 \pm 1.05 | 3.72 | 0.035 |
| Cd | 5.58 \pm 1.62* | 0.12 \pm 0.21 | 0.08 \pm 0.23 | 9.37 | <0.001 |
| Pb | 0.12 \pm 0.20* | <0.01 | <0.01 | 5.12 | 0.012 |

* Indicates significant differences ($\alpha = 0.05$) relative to the reference area (San Antonio del Golfo).**Table 2.** Cytological and immunological parameters of the hemolymph of the green mussel *Perna viridis* collected at three sites on the coast of Sucre State (Venezuela).**Tabla 2.** Parámetros citológicos e inmunológicos en la hemolinfa del mejillón verde *Perna viridis* recolectado en tres localidades del estado Sucre (Venezuela).

| Parameter | Chacopata-Guayacán | Río Caribe | San Antonio del Golfo | <i>F_s</i> | <i>P</i> |
|---|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| Viability (%) | 79.60 \pm 24.39 | 89.40 \pm 6.02 | 78.50 \pm 15.14 | 1.30 | 0.30 |
| Total number of hemocytes ($\times 10^5$) | 1.69 \pm 0.27* | 1.58 \pm 0.24* | 2.02 \pm 0.54 | 3.59 | 0.04 |
| Phagocytosis ^a | 5.57 \pm 2.17* | 6.79 \pm 1.52* | 4.51 \pm 1.50 | 4.23 | 0.02 |
| Lysozyme ^b | 0.85 \pm 0.05 | 0.85 \pm 0.06 | 0.82 \pm 0.04 | 1.89 | 0.17 |

^a Percentage of phagocytic cells. ^b Micromoles of enzyme per gram wet weight.* Indicates significant differences at $\alpha = 0.05$.**Table 3.** Biochemical parameters of the digestive gland of the green mussel *Perna viridis* collected at three sites on the coast of Sucre State (Venezuela).**Tabla 3.** Parámetros bioquímicos en la glándula digestiva del mejillón verde *Perna viridis* recolectado en tres localidades del estado Sucre (Venezuela).

| Parameter | Chacopata-Guayacán | Río Caribe | San Antonio del Golfo | <i>F_s</i> | <i>P</i> |
|---------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| Monoaldehyde ^a | 1.54 \pm 2.03* | 1.13 \pm 0.56* | 0.90 \pm 0.30 | 0.97 | 0.388 |
| Thiol groups ^b | 0.35 \pm 0.13* | 0.12 \pm 0.13* | 0.72 \pm 0.25 | 13.27 | <0.001 |
| Proteins ^c | 19.68 \pm 24.92* | 15.45 \pm 5.49* | 22.34 \pm 6.93 | 0.70 | 0.503 |

^a Nanomoles of MDA per milligram of protein. ^b Micromoles of -SH per milligram of protein. ^c Milligrams of protein per gram wet weight.* Indicates significant differences at $\alpha = 0.05$.

The following correlation coefficients between heavy metals and quantified biological markers showed slightly weak associations: Cu/cell viability (-0.60), Zn/thiol groups ($+0.51$), Cd/thiol groups (-0.45), Cr/TBARS ($+0.58$), and Cd/lysosomal destabilization (-0.40).

DISCUSSION

The Cu and Fe values obtained for *P. viridis* from SAG are likely related to the presence of metals in the cultivation area, as well as to the organism's metabolic requirements to

número total de hemocitos los menores registros se observaron en los mejillones de CG y RC en comparación con los de SAG (2.02×10^5 células mL^{-1}). El porcentaje de fagocitos fue significativamente mayor en los organismos provenientes de CG y RC con respecto a la estación referencial (SAG). Adicionalmente, una ligera elevación en la actividad de la lisozima en la glándula digestiva fue observada en los organismos de RC, pero sin ninguna significación estadística.

Los biomarcadores moleculares examinados muestran concentraciones elevadas de proteínas totales y grupos -SH en los mejillones cultivados en SAG, lo que demuestra su

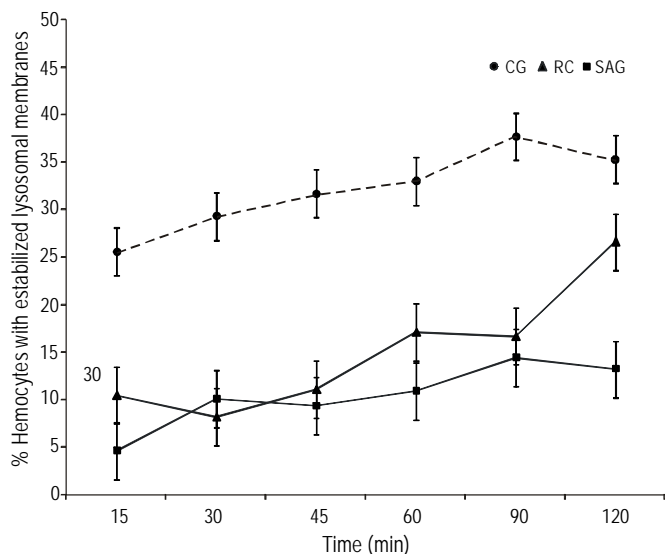


Figure 2. Percentage of hemocytes with destabilized lysosomal membranes in *Perna viridis*.

Figura 2. Porcentaje de hemocitos con membranas lisosomales desestabilizadas en de *Perna viridis*.

maintain its growth, reproductive, and spawning rates in suspension cultures. Similar Cu and Fe concentrations have been reported for the brown mussel *Perna perna*, a related species cultivated in the Gulf of Cariaco (Castillo *et al.* 2005). Though Cu and Fe are efficiently regulated essential elements, experiments have shown that many bivalve species are sensitive to low concentrations (Sze and Lee 2000, Zapata-Vivenes and Nusetti 2007, Aanand *et al.* 2010), since they allow the formation of reactive oxygen species by the Fenton and Haber-Weiss reactions (Fridovich 1998). These free radicals are responsible for molecular and structural alterations of biologically important macromolecules, including peroxidation of membrane lipids, protein degradation, and oxidation of nitrogen bases (Winston and Di Giulio 1991).

The higher concentrations of Zn, Cr, and Cd in *P. viridis* from CG are likely due to human activities rather than natural causes. The majority of Zn comes from industrial activities such as mining, residual carbon combustion, and steel processing. Some species show a relationship between Zn values and animal size, which may indicate different metabolic requirements for juveniles and adults (Kennish 1997).

The concentrations of Cd and Cr found in the soft tissue of *P. viridis* from the study sites suggest that it has efficient mechanisms to prevent toxicity and lethality. It is known that Cr and Cd can be toxic even at relatively low concentrations. Static assays using *P. viridis* have shown that the mean lethal concentrations, in water, of Cr and Cd are, respectively, $2.27 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1.94\text{--}2.70 \mu\text{g L}^{-1}$) at 96 h (Vijayavel *et al.* 2007) and $6.24 \mu\text{g L}^{-1}$ at 48 h (Meena and Balakrishnan 1993). Many studies have established a close relationship between

estado nutricional y sus niveles de antioxidantes (tioles). Contrariamente, se observó que los niveles de sustancias que reaccionan con el TBARS (un marcador de daño oxidativo) se incrementaron en los mejillones de CG y RC (tabla 3).

El porcentaje de células con reducida capacidad de retener en sus compartimientos lisosomales el rojo neutro fue significativamente alta en los organismos colectados en CG ($F_s = 3.59$; $P < 0,05$); se observaron efectos celulares en los primeros 15 min de ensayo, con el 25.60% de los hemocitos afectados (fig. 2), que continuaron incrementando hasta alcanzar un 37.70% de hemocitos dañados a los 90 min. Los valores promedio máximos (26.60%) para los organismos recolectados en RC fueron alcanzados en los 120 min. La mayor estabilidad lisosomal fue encontrada en los organismos de SAG, con un intervalo de estabilidad de 86.80% a 95.40% durante el transcurso del ensayo.

Los siguientes coeficientes de correlación entre metales pesados y marcadores biológicos cuantificados presentaron asociaciones ligeramente débiles: Cu/viabilidad celular (-0.60), Zn/grupos tioles ($+0.51$), Cd/grupos tioles (-0.45), Cr/TBARS ($+0.58$) y Cd/desestabilización lisosomal (-0.40).

DISCUSIÓN

Los valores de Cu y Fe encontrados en *P. viridis* en SAG posiblemente se encuentran asociados a la disponibilidad del metal en el área de cultivo, aunado a los requerimientos metabólicos del organismo para mantener su tasa de crecimiento, reproducción y desove en siembras de suspensión. Concentraciones similares de Cu y Fe han sido señaladas para *Perna perna*, una especie afín cultivada en el golfo de Cariaco (Castillo *et al.* 2005). A pesar de que el Cu y Fe son elementos esenciales eficientemente regulados, existen evidencias experimentales que demuestran que un considerable número de especies de bivalvos presentan sensibilidad a bajas concentraciones (Sze y Lee 2000, Zapata-Vivenes y Nusetti 2007, Aanand *et al.* 2010), ya que permiten la formación de especies reactivas del oxígeno mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss (Fridovich 1998). Estos radicales libres son responsables de alteraciones moleculares y estructurales de macromoléculas de importancia biológica que incluyen la peroxidación de lípidos de membrana, degradación de proteínas y oxidación de bases nitrogenadas (Winston y Di Giulio 1991).

El aumento en las concentraciones de Zn, Cr y Cd en *P. viridis* de CG posiblemente se deben a las actividades humanas y no a causas naturales. La mayoría del Zn es adicionado durante actividades industriales como la minería, la combustión de carbón y residuos, y el procesado del acero. En algunas especies parece existir una relación entre los valores de Zn y el tamaño del animal, lo que puede significar requerimientos metabólicos diferentes entre individuos jóvenes y adultos (Kennish 1997).

Las concentraciones de Cd y Cr encontradas en el tejido blando de *P. viridis* en las localidades evaluadas sugieren que

metal levels and oxidative stress, resulting in severe molecular consequences such as direct DNA damage and subsequent disruption of gene expression (Roling *et al.* 2006). Moreover, it has been shown that sublethal levels of Cd can alter the function of enzymes associated with carbohydrate metabolism, mitochondrial respiration, and antioxidant activity (Nusetti *et al.* 2010), anoxia tolerance (Zapata-Viveres and Nusetti 2007), and negatively affect the growth rate and respiration of *P. viridis* (Narváez *et al.* 2005); this can limit its survival in the environment.

The levels of Cd and Pb in mussels from CG can be attributed to continuous motor oil and hydraulic fuel spills from small fishing vessels frequently observed at service stations near the collection site. These petroleum derivatives have high concentrations of heavy metals (Nusetti *et al.* 2005).

Lower hemocytic cell counts were obtained for the mussels from CG and RC than for those from SAG. Even though reference ranges have not been set for parameters that discriminate between healthy and contaminated organisms, available information indicates that a wide variety of pollutants can modify the normal function of the immune system of bivalve molluscs (Pipe *et al.* 1999, Livingstone *et al.* 2000, Nusetti *et al.* 2004). Changes in immunological parameters have been reported for *Mytilus edulis* transplanted to an area impacted by crude oil (Dyrynda *et al.* 2000).

Lysozyme activity did not show significant variations among the mussels from the different sites, which indicates the effectiveness of the humoral immune response despite the concentrations of accumulated metals. Lysozyme activity has been used as a biomarker in immunoassays for predicting the toxicity of xenobiotics. The bacteriolytic action of lysozymes has been amply examined in molluscs exposed to sublethal concentrations of diverse xenobiotic compounds, including heavy metals. Many authors have detected acute toxic effects of different metals (Cu, Zn, Hg) on the activity of the enzyme in mussels (Pipe and Coles 1995, Pipe *et al.* 1999).

The organisms from CG had the highest mean values of TBARS per milligram of protein. These values are related to the formation of reactive oxygen species, such as superoxide anion and hydroxyl radical, which can affect the antioxidant efficiency and lead to oxidative alterations (peroxidation) of the biological membranes. Several studies have analyzed the intermediary role of free radicals in the toxicity of organic pollutants in marine bivalves: *M. edulis* (Livingstone *et al.* 2000), *Mytilus galloprovincialis* (Livingstone 2001), and *P. viridis* (Cheung *et al.* 2001, 2002). The cytotoxic effects include enzyme inactivation, cell membrane lipid peroxidation, DNA deterioration, and cell death, responses that can be induced by heavy metals (Rand and Petrocelli 1985).

The concentrations of sulfhydryl (-SH) groups in the organisms from CG and RC may be related to an alteration of the molecular responses in antioxidant compensation against the production of reactive intermediaries, experienced by the input and excessive accumulation of heavy metals in the

tales organismos poseen mecanismos eficaces para evitar toxicidad y letalidad. Se conoce que la toxicidad del Cr y Cd puede ser alcanzada a concentraciones relativamente bajas. En ensayos estáticos se ha determinado que la concentración letal media de Cr y Cd para *P. viridis*, en el agua, es de $2.27 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1.94\text{--}2.70 \mu\text{g L}^{-1}$) a las 96 h (Vijayavel *et al.* 2007) y $6.24 \mu\text{g L}^{-1}$ a las 48 h (Meena y Balakrishnan 1993), respectivamente. Existen numerosas referencias que establecen una relación estrecha entre los niveles de metales y el estrés oxidativo, que conlleva a consecuencias moleculares graves como daños directos sobre el ADN y posterior perturbación de la expresión genética (Roling *et al.* 2006). De igual manera, se ha demostrado que niveles subletales de Cd pueden alterar las funciones de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, la respiración mitocondrial y la actividad antioxidante (Nusetti *et al.* 2010) y la tolerancia a la anoxia (Zapata-Viveres y Nusetti 2007), así como causar cambios negativos en la tasa de respiración y crecimiento de *P. viridis* (Narváez *et al.* 2005), limitando su supervivencia en el ambiente.

Las concentraciones corporales de Cd y Pb en los mejillones de CG pueden atribuirse a los continuos derrames de combustibles, aceites hidráulicos y de motores de embarcaciones pesqueras, frecuentemente observados en estaciones de servicios aledañas al sitio de recolección. Se conoce que estos derivados del petróleo poseen elevadas concentraciones de metales pesados (Nusetti *et al.* 2005).

Los menores registros en el número total de hemocitos fueron observados en los mejillones de CG y RC en comparación con los de SAG. A pesar de que no se han planteado intervalos referenciales para los parámetros que discriminen a organismos sanos de contaminados, se tiene información que una gran variedad de agentes contaminantes pueden modular las funciones normales del sistema inmunológico en moluscos bivalvos (Pipe *et al.* 1999, Livingstone *et al.* 2000, Nusetti *et al.* 2004). Se han observado algunos cambios en los parámetros inmunológicos en el mejillón *Mytilus edulis* trasplantado a una zona impactada por petróleo crudo (Dyrynda *et al.* 2000).

No se observaron variaciones en la actividad de la lisozima en los mejillones entre las distintas localidades, lo que demuestra la efectividad de esta respuesta humoral a pesar de las concentraciones de metales acumulados. La actividad de la lisozima ha sido usada como biomarcador en inmunoensayos de biotoxicidad de xenobióticos. Su acción bacteriolítica ha sido ampliamente examinada en moluscos expuestos a concentraciones subletales de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo metales pesados. Muchos autores han encontrado efectos tóxicos agudos de distintos metales (Cu, Zn, Hg) sobre la actividad de la enzima en mejillones (Pipe y Coles 1995, Pipe *et al.* 1999).

Los organismos de CG presentaron los mayores promedios de TBARS por miligramo de proteínas. Estos valores están relacionados con la formación de especies reactivas del oxígeno, tales como el anión superóxido y el radical

organisms inhabiting that area. The concentration of total thiol (-SH) groups has been used to assess heavy metal contamination in different biological systems (Hernández 2006). An increase in the concentration of GSH has been reported as an antioxidant response in *P. viridis* exposed to polychlorate biphenyls, strong inducers of oxidative stress (Cheung *et al.* 2002).

Damage to 50% of the surrounding cells was not observed after 120 min, indicating apparent good health at least of the mussels from RC and SAG. The highest percentage of cells with lysosomes incapable of retaining neutral red was recorded for the organisms from CG. It has been shown that mussels inhabiting potentially impacted areas present frequent abnormalities and a lower retention time of neutral red in the lysosomal compartments. Lysosomes from hemocytes of organisms from areas subject to severe anthropogenic contamination showed signs of membrane damage after 30 to 60 min of staining with the dye (Lowe and Pipe 1994, Harding *et al.* 2004).

In field studies, Talet *et al.* (2009) observed decreased neutral red retention in lysosomes of *M. galloprovincialis* transplanted to areas with high levels of organic pollutants. This response has been associated with exposure to high levels of polycyclic hydrocarbons in *M. galloprovincialis* and *P. perna* (Francione *et al.* 2007, Pereira *et al.* 2007), *P. viridis* (Nicholson and Szefer 2003), and static assays with Cu (Nicholson 2003). The percentage of damaged lysosomes and its association with organisms from CG with high levels of Cd, albeit weak, indicates the environmental quality of this coastal site and represents an early warning of pollution.

We recommend using cellular or biochemical biomarkers in biomonitoring organisms in order to complement environmental studies and thus be able to assess the effects induced by metallic xenobiotics on the physiology of organisms inhabiting marine and coastal ecosystems. The concentrations of heavy metals (especially Cd, Cr, and Pb) accumulated in the soft tissues of mussels from CG, together with reduced lysosomal stability in hemocytes, are indicators of the availability of these elements at the site and their cellular effects.

English translation by Christine Harris.

REFERENCES

- Aanand S, Puroshothaman C, Pal A, Rejendran K. 2010. Toxicological studies on the effect of copper, lead and zinc on selected enzymes in adductor muscle and intestinal diverticula of the green mussel *Perna viridis*. Indian J. Mar. Sci. 39: 299–302.
- Castillo I, Acosta V, Martínez G. 2005. Niveles de metales pesados en gónadas y músculo aductor del mejillón marrón, *Perna perna*, cultivado en la ensenada de Turpialito, golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. Zootecnia Trop. 23: 141–154.
- Cheng T. 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defenses mechanism of *Crassostrea virginica*: Total and differential haemocyte counts. J. Invertebr. Pathol. 51: 207–214.
- hidroxilo, que pueden perturbar la eficiencia antioxidante y causar alteraciones oxidativas (peroxidación) de las membranas biológicas. Diversas investigaciones han demostrado el papel de estos radicales libres como intermediarios en la toxicidad de contaminantes orgánicos en bivalvos marinos: *M. edulis* (Livingstone *et al.* 2000), *Mytilus galloprovincialis* (Livingstone 2001) y *P. viridis* (Cheung *et al.* 2001, 2002). Las consecuencias citotóxicas pueden ser evidenciadas por inactivación enzimática, lipoperoxidación de membranas celulares, deterioro del ADN y muerte celular; tales respuestas pueden ser inducidas por metales pesados (Rand y Petrocelli 1985).
- Las concentraciones de grupos sulfhidrilos (-SH) en organismos provenientes de CG y RC posiblemente correspondan a un desajuste de las respuestas moleculares en compensación antioxidante contra la producción de intermediarios reactivos, experimentada por el ingreso y la acumulación excesiva de metales pesados en los organismos que habitan dicha zona. La determinación -SH totales ha sido utilizada como un marcador de contaminación por metales pesados en distintos sistemas biológicos (Hernández 2006). Se han registrado incrementos en la concentración de GSH como respuesta antioxidante en *P. viridis* sometida a bifenilos policlorados, un fuerte inductor de daño oxidativo (Cheung *et al.* 2002).
- El tiempo en el cual se observa daño en el 50% de las células circundantes no pudo ser alcanzado durante 120 min, lo que sugiere un buen estado de salud aparente, al menos en los mejillones recolectados en RC y SAG. El mayor porcentaje de células con lisosomas incapaces de retener el rojo neutro fue observado en los organismos recolectados en CG. Se ha demostrado que mejillones que habitan áreas potencialmente impactadas presentan frecuentes anomalías y un menor tiempo de retención de rojo neutro en sus compartimientos lisosomales. En áreas con severa contaminación antropogénica, los lisosomas de los hemocitos evidencian daños de sus membranas después de 30 a 60 min de la acción del colorante (Lowe y Pipe 1994, Harding *et al.* 2004).
- En estudios de campo, Talet *et al.* (2009) mostraron un decrecimiento en retención del rojo neutro en lisosomas de hemocitos en *M. galloprovincialis* trasplantados a zonas con altos niveles de polución orgánica. Esta misma respuesta ha sido correlacionada con altos niveles de exposición de hidrocarburos policíclicos en *M. galloprovincialis* y *P. perna* (Francione *et al.* 2007, Pereira *et al.* 2007), *P. viridis* (Nicholson y Szefer 2003), y ensayos estáticos con Cu (Nicholson 2003). El porcentaje de hemocitos con lisosomas dañados y su relación con organismos con elevados niveles de Cd, aunque es débil, permite inferir sobre la calidad ambiental en esta localidad costera y refleja una señal de alerta temprana de contaminación.
- Esta investigación sugiere el uso de biomarcadores a nivel celular o bioquímico en organismos biomonitores para complementar los estudios ambientales y así revelar cambios inducidos por xenobióticos metálicos en la fisiología de los

- Cheung C, Zheng G, Li A, Richardson B, Lam P. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52: 189–203.
- Cheung C, Zheng G, Lam P, Richardson B. 2002. Relationship between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbon (polychlorinated biphenyl and chlorinated pesticides) and antioxidant responses of marine mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 181–191.
- Dyrynda E, Law R, Dyrynda P, Kelly C, Pipe R, Ratcliffe N. 2000. Changes in immune parameter of natural *Mytilus edulis* populations following a major oil spill (*Sea Empress*, Wales, UK). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 206: 155–170.
- Ellman G. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74: 443–450.
- Fang J, Wu R, Zheng G, Lam P, Shin P. 2008. Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 57: 467–72.
- Francione E, Wagener A, Scofield A, Depledge M, Cavalier B. 2007. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 329–338.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: A radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203–1209.
- Goven A, Chen S, Fitzpatrick LY, Venables B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) celomic and celomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.* 3: 607–613.
- Goven A, Fitzpatrick L, Venable B. 1996. Chemical toxicity and host defence in earthworm. *Ann. NY Acad. Sci.* 712: 280–299.
- Harding J, Couturier C, Parsons G, Roos N. 2004. Evaluation of the neutral red retention assay as stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* spp.) in relation to seasonal and environmental conditions. *J. Shellfish Res.* 23: 745–751.
- Hernández A. 2006. Metalotioneínas y lipoperoxidación en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* expuesta a cadmio. BSc thesis, Departamento de Biología, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Kennish M. 1997. *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 524 pp.
- Livingstone D. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656–666.
- Livingstone D, Chipman J, Lowe D, Minier C, Michelmore M, Peters L, Pipe R. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*) and others mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.* 13: 56–91.
- Lowe D. 1995. Lysosomal membrane impairment in blood cells of *Perna viridis*: An *in vitro* marker of contaminant induced damage. *Res. Bull. Phuket Mar. Biol. Cent.* 60: 79–82.
- Lowe D, Pipe R. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: An *in vitro* study. *Aquat. Toxicol.* 30: 357–365.
- Lowe D, Moore M, Evans B. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab, *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 131–140.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- organismos que habitan ecosistemas marino-costeros. Las concentraciones de metales pesados (en especial Cd, Cr y Pb) acumuladas en los tejidos blandos de los mejillones de CG, junto con la reducida estabilidad lisosomal en hemocitos, permiten evidenciar la disponibilidad de tales elementos en las localidades de muestreo y sus efectos celulares.
- Martínez G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos del golfo de Cariaco, edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela (Univ. Oriente)* 41: 83–93.
- Meena KB, Balakrishnan NN. 1993. Effect of certain heavy metals on the survival of mussel *Perna viridis*. *Indian J. Environ. Toxicol.* 31: 11–3.
- Meier P, Zünd R. 1993. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. Wiley, New York, 321 pp.
- Narváez N, Lodeiros C, Nusetti O, Lemus M, Maeda-Martínez A. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Bivalvia). *Cienc. Mar.* 31: 91–102.
- Nicholson S. 2003. Lysosomal membrane stability phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal copper. *Chemosphere* 52: 1147–1151.
- Nicholson S, Szefer P. 2003. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 1040–1043.
- 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: 324–329.
- Nusetti O, Zapata-Viveres E, Esclapés MM, Rojas A. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Environ. Contam. Toxicol.* 48: 1–9.
- Nusetti O, Tovar M, Zapata-Viveres E. 2010. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subjected to anoxic and aerobic conditions. *J. Shellfish Res.* 29: 203–208.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358.
- Pereira C, Abessa D, Baily A, Zaroni L, Gasparro M, Bicego M, Taniguchi S, Furley T, Sousa E. 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from Sao Pablo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 462–469.
- Pipe R, Coles J. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 581–595.
- Pipe R, Coles F, Ramanathan K. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46: 43–54.
- Rand G, Petrocelli S. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Corporation, Washington DC, 665 pp.
- Roling J, Bain L, Gardea-Torresdey J, Bader J, Baldwin W. 2006. Hexavalent chromium reduces larvae growth and alters gene expression in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2725–2733.
- Sze y Lee 2000. Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Biol.* 137: 379–392.

- Sminia J. 1980. Phagocytic cells in molluscs. In: Solomon JB (ed.), *Aspects of Developmental and Comparative Immunology*. Pergamon, London, pp. 125–132.
- Sokal R, Rohlf J. 1981. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 2nd ed. WH Freeman, New York, 859 pp.
- Sreenivasan P, Thangavelu R, Poovannan P. 1989. Biology of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus), cultured in Muttukadu Lagoon, Madras. *Indian J. Fish.* 36: 149–155.
- Talet Z, Behali I, Gherros H, Ykhlef-Allal A, Bachir-Bouia B, Amiar J, Boutibaz B. 2009. Monitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus edulis*. *Oceanologia* 51: 63–84.
- Vijayavel K, Gopalakrishnan S, Balasubramanian M. 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere* 69: 979–986.
- Winston G, Di Giulio R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137–161.
- Zapata-Vívenes 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: 1–10.
- Zapata-Vívenes E, Nusetti O, Marcano L, Esclapés MM, Arredondo L. 2005. Immunological responses and wound healing in the polychaete *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidæ) exposed to copper. *Cienc. Mar.* 31: 1–9.

*Received August 2011,
received in revised form April 2012,
accepted June 2012.*