

## Metabolismo aeróbico y anaeróbico en *Perna viridis* (Linnaeus, 1758), pre-expuesto a aceites usado de motor de vehículo

### Anaerobic and aerobic metabolism in *Perna viridis* (Linnaeus, 1758), pre-exposure to used vehicle crankcase oil

Martínez Gil, Iliana C.; Nusetti Cárdenas, Osmar A.

 Iliana C. Martínez Gil  
ilianamartinez@gmail.com  
Universidad de Oriente, Venezuela

 Osmar A. Nusetti Cárdenas  
onusetti@yahoo.com  
Universidad de Oriente, Venezuela

**Ciencia e Ingeniería**  
Universidad de La Guajira, Colombia  
ISSN-e: 2389-9484  
Periodicidad: Semestral  
vol. 10, núm. 1, e8091883, 2023  
revistas@uniguajira.edu.co

Recepción: 22 Octubre 2022  
Aprobación: 17 Febrero 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/690/6904624006/>

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8091883>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

**Resumen:** El mejillón verde *Perna viridis* tiene la capacidad de fluctuar entre el metabolismo aeróbico y anaeróbico para adaptarse al entorno y de bioacumular xenobióticos, por lo que es usado como biosensor ambiental. Su respuesta fisiológica ante cambios de factores abióticos asociada a ambientes contaminados ha sido pobremente estudiada. Aquí, se evaluó el metabolismo aeróbico y anaeróbico en músculo, manto, branquias de *P. viridis* pre-expuesto a dosis subletales de la fracción hidrosoluble de aceite usado de motor de vehículo (FHAUMV). Ejemplares juveniles (2,5 a 4,0 cm) fueron pre-expuestos (7 días) a 1 % y 5 % de FHAUMV, seguido por un periodo de anoxia (48 horas) y recuperación normóxica (72 h). Los niveles de malondialdehído (MDA), glutatión-S-transferasa (GST), piruvato kinasa (PK), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y citocromo-C-oxidasa (CCO) fueron medidos en cada tejido, como indicadores de estrés oxidativo y alteración del metabolismo celular energético. Se obtuvo que FHAUMV incrementó el daño per-oxidativo de membrana y afectó negativamente la actividad de cada enzima, variando la respuesta de cada tejido según sus funciones fisiológicas; no siendo así para la GST, que posee gran variación en su funcionalidad. FHAUMV es potencialmente tóxica sobre el sistema biológico que determina la tolerancia de *P. viridis* a la anoxia y recuperación en normoxia, disminuyendo su sobrevivencia y causando su muerte.

**Palabras clave:** Molusco, Bivalvo, Anoxia, Bio-transformación, Glucólisis.

**Abstract:** The green mussel *Perna viridis*, has the ability to fluctuate between the aerobic and anaerobic metabolism to adapt to the environment; and bioaccumulate xenobiotics, by what is used as a pollution biosensor. Its physiological response to changes in abiotic factors associated with polluted environments has been studied little. By what was evaluated the aerobic and anaerobic metabolism in muscle, mantle, gills of *P. viridis*, pre-exposure sublethal doses of water soluble fraction of used vehicle engine oil (FHAUMV). Juveniles (2,5 – 4 cm), were pre-exposure (7days) to 1 %-5 % of FHAUMV, followed by a period of anoxia (48 hours) and recovery in normoxia (72 h). The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione S-

transferase (GST), pyruvate kinase (PK), phosphoenolpyruvate carboxikinasa (PEPCK) and cytochrome C oxidase (CCO) were measured in each tissue, as indicators of oxidative stress and cellular energetic metabolism alteration. As results were obtained FHAUMV increased the peroxidative damage of membrane and negatively affected the activity of all enzymes, by varying the response of each tissue according to their physiological functions; not so for the GST, enzyme that has great variation in their functional specificity. The FHAUMV is potentially toxic on the biological system that determines the tolerance of *P. viridis* to anoxia and its recovery in normoxia, decreasing its survival and causing its death.

**Keywords:** Mollusk, Bivalve, Anoxia, Biotransformation, Glycolytic.

## INTRODUCCIÓN

El mejillón *Perna viridis* es un molusco bivalvo que pertenece a la familia Mitilidae y debido a sus caracteres morfológicos, es conocido vulgarmente con el nombre de mejillón verde (Lodeiros et al., 1999). Esta especie, nativa de la región del Indo-Pacífico, fue introducida en el Caribe mediante corrientes oceánicas, tráfico marítimo y/o a las actividades humanas, siendo observado por primera vez en Trinidad a mediados del año 1990 y en las costas venezolanas en el año 1993, específicamente en el Golfo de Paria, (Agard et al., 1992; Rylander et al., 1996). En Venezuela se ha distribuido en la costa norte de la Península de Araya, y las costas de la Isla de Margarita (Rylander et al., 1996; Pérez et al., 2007). Las razones que pueden explicar su distribución es el desarrollo de una estrategia energética de reproducción continua (Malave y Prieto, 2005), su amplio rango de tolerancia a factores abióticos como la temperatura (15,0 - 32,5 °C) y la salinidad (20 - 33 UPS) (Agard et al., 1992; Rajagopal et al., 2006; Segnini, 2009), así como la **tolerancia a altas concentraciones de materia orgánica en suspensión** (Rajagopal et al., 2006; Acosta, 2008) y a la anoxia en condiciones naturales (Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007; Nusetti et al., 2010).

En ausencia de O<sub>2</sub>, cesa el bombeo de protones y la reducción a H.O en el complejo citocromo C oxidasa (CCO) (Nelson y Cox, 2006), quedando reducida la membrana y limitada producción de ATP por esta vía, en donde, en condición de normoxia, se producen 36 ATP.mol<sup>-1</sup> de glucosa. Seguidamente, se genera el acoplamiento de la ruta glucolítica a la ruta alterna de fosforilación a nivel del sustrato, para ello el piruvato, que bajo condición hipóxica inicia la formación de lactato, sufre una transaminación para formar alanina al usar un grupo amino transferido desde el aspartato. La desaminación forma oxalacetato que se reduce para formar malato, el cual es convertido en fumarato, succinato y ácido propiónico (Larade y Storey, 2002). Una vez que el aspartato es totalmente consumido, ocurre un cambio metabólico en el que se inhibe la enzima piruvato kinasa (PK), encargada de catalizar la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato por la vía glucolítica (Dailianis y Kaloyianni, 2004); iniciando así la formación directa de oxalacetato a partir de la PEP por medio de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), dando continuidad a la síntesis de succinato. El incremento del succinato permite a la mitocondria permanecer metabólicamente activa e intacta hasta que haya O<sub>2</sub> en el medio e inicie la respiración. La fermentación de glucosa a succinato produce 4 ATP.mol<sup>-1</sup> glucosa, mientras que la producción final de ácido propionico producen 6 ATP.mol<sup>-1</sup> glucosa, comparado con solo 2 ATP.mol<sup>-1</sup> glucosa cuando se genera lactato directamente del piruvato (De Zwaan y Wijsman, 1976; Larade y Storey, 2002; Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007). Ante los cambios producidos, los moluscos restringen la utilización de ATP y disminuyen la tasa metabólica a menos del 10 % de su actividad en normoxia (Larade y Storey, 2002; Babarro y De Zwaan, 2008; Nusetti et al., 2010).

Bajo condiciones anóxicas, también se incrementan los niveles de defensa antioxidante en los organismos, con la finalidad de remover los radicales libres (RL) producidos durante la restitución de las condiciones normóxicas del sistema. La perturbación del balance, por algún contaminante, puede interrumpir el control del metabolismo celular energético, afectando la sobrevivencia en anoxia y recuperación en normoxia (Nusetti et al., 2010; Andreyeva et al., 2022). Cuando la producción de RL excede la tasa de su descomposición por los sistemas antioxidantes, se produce estrés oxidativo, generador del daño del ADN, daño de proteínas y de la peroxidación lipídica (PL), entre otras muchas consecuencias (Maero y Anguiano, 2018).

La PL es un proceso químico de daño celular en animales, basado en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que forman los fosfolípidos de las membranas (membrana plasmática, membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana mitocondrial), cuyo producto final es el malondialdehído (MDA), por medio del cual se cuantifica el deterioro celular (Santillán et al., 1999; Rusdi et al., 2021).

Para evitar la perturbación del balance, ante la presencia de xenobióticos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales pesados, el organismo inicia la transformación del contaminante hacia productos de baja toxicidad celular y de fácil excreción (Suárez, 1995), mediado por los procesos de desintoxicación de las fases I y II y otros sistemas de ciclos redox. En las reacciones de fase I se genera la biotransformación de compuestos endógenos y exógenos a productos hidrofílicos, mediante reacciones de oxido-reducción mediados por la familia de hemoproteínas conocidas como el sistema enzimático de la Citocromo P-450. Una vez transformados por las reacciones de fase I, son conjugados con sustratos endógenos en las reacciones de fase II, que en el caso de los compuestos electrofílicos derivados de hidrocarburos es el glutatión. Esta conjugación es catalizada por medio de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), resultando en productos hidrosolubles: no tóxicos, ionizables y de fácil excreción (Gold-Bouchot y Zapata-Pérez, 2004).

Los aceites usados de motores de vehículos son descargados con frecuencia en sistemas acuáticos. Debido a que su composición química incluye metales pesados (As, Ba, Cd, Cr, Pb, Zn, otros), solventes clorinados, bencenos, toluenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) de bajo y alto peso molecular (GESAMP, 1993; Nusetti et al., 2005; Zapata-Vívenes et al., 2020), puede disminuir la calidad de las aguas y afectar los cultivos y/o bancos naturales de *P. viridis*.

Basados en que el mejillón verde es una especie de importancia en el comercio y la pesca artesanal de la región sucrense venezolana presenta localidades con altas concentraciones de aceites lubricantes y/o HAP (Romero, 2010; Ortiz, 2020), se planteó como objetivo determinar el efecto de pre-exposición a concentraciones subletales de la fracción hidrosoluble de aceite usado de motor de vehículo (FHAUMV) sobre la actividad de enzimas claves del metabolismo aeróbico y anaeróbico, y daño oxidativo, en diferentes tejidos de *P. viridis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Acondicionamiento de *P. viridis*.** El estudio fue realizado con ejemplares juveniles (2,5 a 4,0 cm) de *P. viridis* colectados en Guayacán (10°39'08" N, 63°49'44" W), zona norte de la Península de Araya, estado Sucre, Venezuela.

Los mejillones fueron trasladados en cavas de aislamiento térmico hasta el laboratorio, donde fueron colocados en acuarios de vidrio (32 L de capacidad), con agua de mar (26,5 °C, 36 ‰) y aireación constante, durante una semana. En ese tiempo fueron alimentados con la microalga *Tetraselmis tetrahele*, a una concentración de 8.000 cel.mL<sup>-1</sup>, y se cambió el agua cada 48 h.

**Preparación de FHAUMV.** El aceite usado de motor de vehículo se obtuvo en una estación de servicio y se mezcló con agua de mar filtrada (filtro millipore 45 micras) en una relación 1:9 (Cortez-Mago et al., 2007), para obtener la fracción hidrosoluble madre.

**Bioensayo de toxicidad.** Con el fin de conocer la concentración de FHAUMV en la cual sobreviven el 50 % de los organismos expuestos al contaminante, se realizaron pruebas de toxicidad letal media durante 96 horas ( $LC_{50} - 96$  h), usando cinco concentraciones (5, 10, 20, 50 y 100 %) obtenidas por diluciones a partir de la fracción madre (Nusetti et al., 2004). Con base a los resultados obtenidos, se tomaron dos concentraciones subletales para la pre-exposición de *P. viridis*.

**Bioensayo de pre-exposición.** Para la pre-exposición, se dividió a la población en tres grupos: control; 1ra dosis subletal y 2da dosis subletal, con concentraciones de FHAUMV del 0 %, 1 % y 5 %, respectivamente. Cada grupo fue mantenido durante una semana (**168 h**) con aireación constante, agua de mar (26,5 °C, 36 ‰), y sin alimento, en acuarios de vidrio de 32 L. El agua se cambió cada 48 h

**Sobrevivencia ( $LT_{50}$ ) bajo anoxia.** Al culminar la pre-exposición, se tomaron los mejillones necesarios de cada grupo para realizar un ensayo de  $LT_{50}$  bajo condiciones anóxicas, quedando cada grupo por duplicado con su respectivo control normóxico. Los frascos de 4 L de capacidad contenían agua de mar filtrada que era cambiada cada 48 h, sin alimento. La observación de dio por concluida cuando el 85 % de los mejillones expuestos a la anoxia habían muerto.

Para crear las condiciones de anoxia, el agua fue expuesta a un burbujeo constante con nitrógeno gaseoso al 100 %, siguiendo las recomendaciones de Babarro y De Zwaan (2008), estos frascos se abrieron una vez al día para remover los animales muertos de la forma más rápida posible, manteniendo un flujo continuo de N<sub>2</sub> para evitar la oxigenación del agua.

**Bioensayo de re-oxigenación.** Los mejillones que restaban en los acuarios de pre-exposición (control, 1 % y 5 %) fueron distribuidos en los frascos de 4 L de capacidad, por triplicado. Los frascos contenían agua de mar filtrada en condiciones anóxicas. Pasadas 48 h, se extrajo el 50 % de **mejillones** de cada frasco, obteniendo los tejidos necesarios para las mediciones de PL y enzimas. El resto de ejemplares de *P. viridis*, se trasladaron a frascos con agua de mar filtrada y aireación constante durante 72 h. Al finalizar el tiempo de recuperación en normoxia, se sacrificaron todos los animales, obteniendo los tejidos necesarios para las mediciones antes dichas. Cada tejido, fue preservado a -70 °C por un tiempo no mayor a dos semanas, en el cual se realizaron los análisis.

Del tejido blando se disectó el músculo aductor que se encarga de ejercer presión en el cierre de las valvas, las branquias que en los bivalvos posee la habilidad de concentrar altos niveles de contaminantes por ser el principal sitio de ingreso del agua durante la filtración (Lanning et al., 2006), y el manto que recubre todo el tejido blando del organismo.

**Malondihaldehído (MDA).** El daño de membrana se determinó siguiendo la metodología de Livingstone et al. (1990), la cual consiste en hacer reaccionar el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el MDA presente en los tejidos. La muestra fue añadida en una mezcla de ácido tricloroacético 20 % en ácido clorhídrico 1 N y TBA al 1 % en agua. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 532 nm, y la cantidad de MDA formado fue calculado usando una curva patrón realizada a partir de una solución de MDA 10 mmol.L<sup>-1</sup>, y expresada en nmol de MDA por gramo de masa húmeda.

**Ensayos enzimáticos.** Para determinar las enzimas GST, PK y PEPCK, cada tejido fue homogeneizado en una solución tampón de Imidazol-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) a 25 °C, conteniendo ácido etilendiaminotetraacético de sodio (EDTA Na.) 1 mmol.L<sup>-1</sup>, ditioneitol 1 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup> y ácido fenil metil sulfónico (PMSF) 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>. Mientras que para la extracción de CCO se usó una mezcla de reacción que consiste de Imidazol-HCl 75 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) a 25 °C, MgSO<sub>4</sub> 3 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 5 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, Triton X-100 al 0,1 % y PMSF 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>.

Los homogeneizados se centrifugaron a 4000 g por 15 min a 4 °C en el caso de la GST, y a 6000 g por 15 min para las enzimas PK, PEPCK y CCO, obteniendo el sobrenadante a usar como fuente enzimática (Nusetti et al., 2005). La actividad de las enzimas se midió en 1 mL de mezcla de reacción con un espectrofotómetro Lambda 2S UV/VIS Perkin Elmer a 25 °C.

La GST se determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 340 nm (coeficiente de extinción = 9,6 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), usando glutatión reducido (GSH) 50 mmol.L<sup>-1</sup> y 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) 50 mmol.L<sup>-1</sup> como sustrato, en buffer fosfato de potasio 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) a 25 °C, según la metodología descrita por Keen et al. (1976).

La actividad de PK se determinó de acuerdo con la metodología de Bücher y Pfeleiderer (1955), con algunas modificaciones. El descenso de la absorbancia a 365 nm fue medido como resultado de la oxidación de NADH (coeficiente de extinción 3,4 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), en un ensayo acoplado al sistema enzimático lactato deshidrogenasa (LDH). Los reactivos utilizados fueron: buffer imidazol-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>(pH 7,0), MgSO<sub>4</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, PEP 250 mmol.L<sup>-1</sup> (omitido en la mezcla de referencia), ADP 12,5 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 10 mmol.L<sup>-1</sup> y LDH (25 U). La reacción se inició con una alícuota de extracto enzimático.

Mientras que la actividad de PEPCK se determinó midiendo el descenso de la absorbancia a 340 nm como resultado de la oxidación de NADH (coeficiente de extinción 6,22 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), en presencia de buffer Imidazol-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0), MgCl<sub>2</sub> 500 mmol.L<sup>-1</sup>, PEP 200 mmol.L<sup>-1</sup>, NADH 7,05 mmol.L<sup>-1</sup>, inosina difosfato 25 mmol.L<sup>-1</sup>, malato deshidrogenasa 60 U, NaHCO<sub>3</sub> 30 mmol.L<sup>-1</sup> (omitido para el control). La reacción se inició con una alícuota de muestra (Nuseti et al., 2010).

Finalmente, la actividad de CCO fue determinada siguiendo la oxidación del citocromo C reducido a 550 nm (coeficiente de extinción 19,6 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), en una mezcla de reacción conteniendo citocromo C reducido 0,352 mmol.L<sup>-1</sup> y buffer fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) a 25 °C (Wharton y Tzagoloff, 1967). El citocromo C fue reducido con C.H.O. en buffer fosfato 100.mmol.L<sup>-1</sup>. La reacción se inició con una alícuota del homogeneizado y se leyó contra un control de citocromo C oxidado con K.Fe (CN). 100.mmol.L<sup>-1</sup>.

**Análisis estadístico.** Para la determinación de LC<sub>50</sub> y LT<sub>50</sub>, se utilizó el método Trimmed Spearman-Kärber ( $\infty \leq 10\%$ ) propuesto por Hamilton et al. (1978), con sus respectivos intervalos de confianza. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, a través del software STATGRAPHIC plus 5,1. En aquellos tratamientos donde se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), se aplicó el análisis *a posteriori* de las menores diferencias significativas de Fisher (Test LSD de Fisher). Las diferencias se mostraron mediante el uso de gráficas de cajas y bigotes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**LC<sub>50</sub>.** La concentración letal media de la FHAUMV y sus límites de confianza al 95 %, usando *P. viridis* en agua de mar anóxica, fue de 15,33 % (13,16 – 17,86 %) a 96 h de exposición. Lo que llevó a utilizar la concentración del 1 % y 5 % como 1ra y 2da dosis subletal, respectivamente.

El mejillón verde *P. viridis*, fue seriamente impactado por la FHAUMV en normoxia. Se registró una mortandad del 50 % de la población en solo 96 h de exposición, ante una concentración de 15.33 %, concentración letal similar a la reportada por Nuseti et al. (2005) usando el poliqueto *Eurythoe complanata* expuesto al mismo contaminante (LC<sub>50</sub> 13,99 %; I.C.: 8 – 20 %). La LC<sub>50</sub> indica que la mezcla de contaminantes es potencialmente tóxica para los juveniles de *P. viridis*, debido a que su composición química consta principalmente de HAP y metales pesados. En los organismos adultos de esta especie, el alto poder tóxico del aceite lubricante, propicia un desequilibrio en la maquinaria energética de la célula, comprometiendo la sobrevivencia del bivalvo (Cortés, 2006).

**LT<sub>50</sub>.** En la Figura 1 se muestra el efecto que tienen las concentraciones subletales de la FHAUMV sobre la tolerancia del mejillón a las condiciones anóxicas. Los mejillones del grupo control, tuvieron una sobrevivencia del 50 % de la población a los 3,47 d, la cual incrementó a 4,28 d en los mejillones pre-expuestas a la concentración del 1 %; caso contrario observado en las pre-expuestas al 5 %, donde la LT<sub>50</sub> disminuyó a 2,72 d.

En este estudio se obtuvo que en condiciones de anoxia, *P. viridis* tiene un tiempo de sobrevivencia de 3,47 d, similar a los registrados en los bivalvos *Chamelea gallina* (2,4 d; De Zwaan et al., 2002), *Spicula subtruncata* (5,6 d; Babarro y De Zwaan, 2008), *Mytilus galloprovincialis* (5 d; Babarro et al., 2007), entre otros; y que esta  $LT_{50}$  es afectada por la presencia de la FHAUMV. La exposición a la dosis del 1 % del contaminante incrementó el tiempo de sobrevivencia del mejillón, lo que sugiere que la mezcla del xenobiotico no alcanzó un umbral de toxicidad que afecte los patrones conductuales del organismo (Ej. filtración y agregación en colonias), ni la capacidad de tolerancia a la anaerobiosis. En relación a este resultado, algunos autores señalan que la tolerancia o resistencia a ciertos factores ambientales críticos puede ser incrementada en organismos expuestos a concentraciones subletales de ciertas sustancias contaminantes, expresión que caracteriza al fenómeno biológico denominado hormesis (Chapman, 1998; Calabrese y Baldwin, 2002). Consecuentemente, es probable que el efecto hormesis se haya manifestado en el mejillón expuesto al 1 % FHAUMV, fortaleciendo su sobrevivencia en anoxia. En contraste, la sobrevivencia de los individuos anoxicos expuesto al 5 % FHAUMV disminuyó con respecto al control, causado probablemente por el nivel de toxicidad de esta dosis. Esta toxicidad fue evidenciada en el cambio de conducta de los juveniles de mejillón durante el periodo de pre-exposición del contaminante a la dosis del 5 %, al permanecer disgregados en el fondo del acuario sin una filtración continua, presentando periodos de apertura y de cierre de las valvas, presumiblemente para evadir la irrupción del contaminante.

**Figura 1.** Tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) de la población de *P. viridis* ( $LT_{50}$ ) luego de la pre-exposición a concentraciones sub-letales de FHAUMV y su control no pre-expuesto (n = 16).

**Malondialdehido (MDA).** De los tres tejidos estudiados, el manto presentó los niveles más altos de MDA (260 nmol.g<sup>-1</sup>), seguido por los niveles registrados en branquia (145,19 nmol.g<sup>-1</sup>) y músculo (80,35 nmol.g<sup>-1</sup>). Los niveles de MDA en el músculo de los mejillones bajo la condición de anoxia, no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 2A). Bajo condiciones normóxicas, los niveles de MDA en los organismos expuestos a FHAUMV, incrementaron significativamente en comparación con el control (p < 0,005). El grupo control normóxico, mostró valores significativamente menores a los registrados en anoxia (p ≤ 0,01). El tejido expuesto al 1 % y 5 %, presentó niveles similares de peroxidación de membrana en las dos condiciones de respiración.

**Figura 2.** Niveles de MDA en tejidos de *P. viridis*, expuesto a 48 h de anoxia y 72 h de recuperación en normoxia, y pre-expuestos a dosis subletales de FHAUMV. (\*C - 1 - 5 = diferencia significativa entre los tratamientos; \*\* diferencia significativa entre condición de anoxia y normoxia; n=6). **A. Músculo.** Tratamiento en anoxia p > 0,05; Tratamiento en normoxia p < 0,005. Condición control p ≤ 0,01; Condición 1 % y 5 % p > 0,05. **B. Manto.** Tratamiento en anoxia p > 0,05; Tratamiento en normoxia p < 0,05. Condición control y 5 % p > 0,05; Condición 1 % p ≤ 0,01. **C. Branquia.** Tratamiento en anoxia y normoxia p < 0,01. Condición control y 5 % p < 0,05; Condición 1 % p ≤ 0,01.

En el manto (Figura 2B), el daño de membrana no difiere entre los tratamientos bajo anoxia. Mientras que en condición aeróbica los niveles de MDA disminuyen en los organismos expuestos al 1 %, en comparación con el control (p < 0,05). Los mejillones del control y los expuestos al 5 %, mantienen los niveles de MDA en las dos condiciones de respiración. Solo los expuestos a la dosis del 1 %, registraron una disminución significativa (p ≤ 0,01) de PL en normoxia, en comparación con la condición anóxica.

En condiciones anóxicas, los niveles de MDA en las branquias de los mejillones expuestos al xenobiótico (Figura 2C), disminuyeron junto al incremento de la concentración de la FHAUMV, en comparación con el control (p < 0,01). En normoxia los niveles de MDA incrementaron con la concentración del contaminante, en relación con el control (p < 0,01). La anoxia promovió un mayor estado de estrés oxidativo en las branquias del grupo control y del grupo expuesto al 1 % de xenobiótico, en contraste con el grupo normóxico. Por su parte, la FHAUMV al 5 % resultó en un incremento de la peroxidación de membrana en normoxia y disminución en anoxia.

La FHAUMV que logra ingresar al organismo, inicia un proceso de biotransformación donde se genera un incremento de la producción de RL, y la activación de defensas antioxidantes como SOD y CAT (Nuseti et al., 2005; Cortesía, 2006), las cuales mantienen el estado de oxido-reducción de la célula (Hidalgo et al., 2006). No obstante, una alta carga de RL que sobrepase las defensas antioxidantes a consecuencia de la toxicidad puede originar disfunción fisiológica, daños a la membrana (líperoxidos, MAL) u otras alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo (Zapata-Vívenes et al., 2020; Rusdi et al., 2021), comprometiendo la capacidad de tolerancia del organismo ante factores ambientales de estrés.

En este estudio, la toxicidad no incremento la PL en ausencia de O<sub>2</sub>, ya que los juveniles de mejillón expuestos al xenobiótico bajo el ambiente anóxico presentaron daño de membrana a niveles similares o inferiores a los reportados en los controles, siendo la branquia el tejido más susceptible al daño oxidativo (Figura 2). En cambio, durante la transición de la fase anaeróbica a la aeróbica, la exposición a las dosis subletales del contaminante tuvo efectos diferenciales entre los tejidos, observado en los distintos niveles de MAL. En el caso de los mejillones normóxicos expuestos al 1 % del xenobiótico, el daño disminuyó en manto y branquia, y se mantuvo en el músculo, en comparación con los niveles reportados en anoxia. Lo que refleja la tendencia del bivalvo pre-expuesto a esta concentración, de ajustar su condición fisiológica requerida en condiciones normoxicas, luego de su exposición a anoxia, sin alcanzar una recuperación total en comparación al control. En contraste, la PL aumento durante el periodo de aerobiosis en las branquias pre-expuestas al 5 % FHAUMV, y fue mantenida en manto y músculo a niveles similares a los reportados en anoxia para estos dos últimos tejidos. Dada la importancia que tienen el músculo y branquia en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, es factible que el daño oxidativo disminuya la posibilidad de recuperación en aerobiosis. Probablemente los procesos que estimulan la actividad de los sistemas antioxidantes fueron afectados en estos tejidos, resultando en la desestabilización del estado redóx celular, disparando así anomalías agudas o crónicas en orden bioquímico que comprometen la condición fisiológica del organismo (Turrens, 2003), afirmando la influencia que causa la FHAUMV sobre la LT<sub>50</sub> determinada en este estudio.

**Glutación-S-Transferasa (GST).** La actividad de GST registrada en músculo bajo anoxia no varió entre los tratamientos (Figura 3A). En normoxia, solo incrementó en el tejido expuesto al 1 % de la mezcla de xenobióticos, en comparación con el control ( $p < 0,05$ ). La GST fue inhibida en el músculo de los mejillones expuestos al 5 % FHAUMV bajo normoxia, en comparación con la actividad anóxica ( $p \leq 0,01$ ). En la Figura 3B, se observa que los niveles de GST en el manto son similares entre los tratamientos con FHAUMV, y que no variaron con la condición de respiración.

La actividad de GST en branquias, fue la más alta entre los tejidos estudiados. Bajo respiración anóxica (Figura 3C), no presentó variación entre el control y los mejillones expuestos al 1 % del contaminante, pero disminuyó en los organismos expuestos al 5 % ( $p < 0,05$ ). Bajo la condición normóxica, la actividad enzimática disminuye significativamente en el tejido de los mejillones expuestos al 1 % ( $p < 0,005$ ) y aumenta en los pre-expuestos al 5 %, en comparación con el control. La GST en la branquia de las juveniles del grupo control y el grupo expuesto al 1 % del xenobiótico, fue baja en normoxia comparada con su actividad en anoxia ( $p < 0,05$ ). Mientras que en los organismos expuestos al 5 % la actividad de la enzima incrementó en normoxia en comparación a los valores obtenidos bajo la condición anóxica ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3.** Actividad de GST en tejidos de *P. viridis*, expuesto a 48 h de anoxia y 72 h de recuperación en normoxia, y pre-expuestos a dosis subletales de FHAUMV. (\* C – 1 – 5 = diferencia significativa entre los tratamientos; \*\* diferencia significativa entre condición de anoxia y normoxia; n = 6). **A. Músculo.** Tratamiento en anoxia  $p > 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p < 0,05$ . Condición control y 1 %  $p > 0,05$ ; Condición 5 %  $p \leq 0,01$ . **C. Branquias.** Tratamiento en anoxia  $p < 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p < 0,05$ . Condición control y 5 %  $p < 0,05$ ; Condición 1 %  $p \leq 0,01$ .

La actividad de GST bajo condición de anoxia se mantuvo a niveles basales en todos los tejidos estudiados, con la excepción de la branquia expuesta a la concentración del 5 % donde disminuyó (Figura 3). Este resultado sugiere que en anaerobiosis ciertos tejidos mantienen los niveles de GST necesarios para excretar

metabolitos electrofílicos, posiblemente relacionados con la biotransformación del contaminante, y la disminución de su impacto en el daño de membranas (Zapata-Vívenes et al., 2020). En el proceso de recuperación aeróbica los tejidos manifestaron distintos perfiles de la actividad de GST bajo los diferentes niveles de exposición a la FHAUMV. En el músculo la actividad de la enzima presentó una estimulación asociada a la exposición del 1 % FHAUMV, que fue suprimida en los organismos expuestos al 5 % del xenobiótico, esta respuesta metabólica posiblemente resultó de un efecto inhibitorio en los mecanismos que promueven la función enzimática catalítica o biosíntesis. En las branquias, los niveles de GST fueron elevados en comparación con el resto de los tejidos estudiados en las distintas condiciones experimentales; además, la actividad de la enzima fue potenciada significativamente al 5 % del xenobiótico en comparación con el control y el grupo expuesto al 1 % FHAUMV, indicando la activación de procesos de desintoxicación en el tejido, que registró altos niveles de MAL. Y en el manto, la condición de respiración y la exposición del contaminante, no causaron alteración en la actividad enzimática; lo que indica que cada tejido presenta mecanismos determinantes en la regulación de la actividad de GST.

**Piruvato Kinasa (PK).** La actividad de la PK registrada en el músculo de *P. viridis* (Figura 4A) fue mucho mayor que la registrada en el manto (Figura 4B) y en la branquia (Figura 4C). Bajo anoxia, la actividad de PK en el músculo de los mejillones expuestos al xenobiótico, no se diferenció del control. En normoxia, la actividad de PK disminuyó significativamente solo en los organismos expuestos al 5 % ( $p < 0,05$ ), en relación con el control. La condición de respiración no afectó la actividad de PK en los controles y los expuestos al 1 % FHAUMV.

**Figura 4.** Actividad de la enzima PK en tejidos de *P. viridis*, expuesto a 48 h de anoxia y 72 h de recuperación en normoxia, y pre-expuestos a dosis subletales de FHAUMV. (\* C – 1 – 5 = diferencia significativa entre los tratamientos; \*\* diferencia significativa entre condición de anoxia y normoxia;  $n = 6$ ). **A. Músculo.** Tratamiento en anoxia y normoxia  $p < 0,05$ ; Condición control  $p > 0,05$ . Condición 1 %  $p \leq 0,01$ ; Condición 5 %  $p < 0,05$ . **B. Manto.** Tratamiento en anoxia  $p > 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p \leq 0,01$ . Condición control y 1 %  $p > 0,05$ ; Condición 5 %  $p < 0,05$ . **C. Branquia.** Tratamiento en anoxia  $p < 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p < 0,005$ . Condición control  $p < 0,05$ ; Condición 1 %  $p \leq 0,01$ ; Condición 5 %  $p < 0,01$ .

En el manto, la actividad de PK en anoxia no difiere entre los tratamientos. Bajo respiración normoxica, las unidades de PK disminuyeron significativamente en los organismos expuestos al 1 % del xenobiótico ( $p \leq 0,01$ ), en comparación con el control que no se diferenció del expuesto al 5 %. En el control y en los organismos expuestos al 1 % FHAUMV, la actividad enzimática no mostró diferencia entre las dos condiciones de respiración. Los organismos expuestos al 5 % incrementaron su actividad enzimática en normoxia ( $p < 0,05$ ), en comparación con la condición anóxica.

El control y las branquias expuestas al xenobiótico tuvieron una actividad enzimática en normoxia mucho mayor que en anoxia ( $p < 0,05$ ). La actividad de PK fue más alta en los juveniles expuestos al 1 % y 5 % del xenobiótico que en el control, tanto en la condición de respiración aeróbica ( $P < 0,005$ ) como en la anaeróbica ( $p < 0,05$ ).

En relación con las enzimas claves en la ruta glucolítica (PK, PEPCK) y en la cadena transportadora de electrones (CCO), la exposición a FHAUMV se manifestó con modificaciones en sus actividades, lo cual es una limitante en la producción de ATP tanto en anoxia como en normoxia. La actividad de PK registrada en anoxia para músculo y manto no varió con respecto al control, pero aumento en el manto y disminuyó en el músculo de los organismos expuestos al 5 % FHAUMV en normoxia (Figura 4A y 4B); esta última respuesta, coincide con la disminución de PK en la glándula digestiva de individuos adultos de *P. viridis*, expuestos a FHAUMV en condiciones normóxicas (Cortesía, 2006).

En las branquias, la PK tuvo un incremento ante la exposición al xenobiótico y bajo las dos condiciones de respiración, en relación con el control (Figura 4C). El incremento de PK refleja una respuesta compensatoria para el resguardo de las demandas energéticas del metabolismo ante el contaminante, manteniendo así el



buen estado funcional del tejido. Las respuestas específicas de cada tejido ante las distintas condiciones experimentales, esta al menos parcialmente establecida por las diferencias de sus funciones fisiológicas.

**Fosfoenolpiruvato Carboxikinasa (PEPCK).** Al igual que la PK, la actividad de la PEPCK fue mas alta en el músculo que en los otros tejidos aquí estudiados. En condición anóxica, la actividad de PEPCK en el músculo de los mejillones no mostró diferencia entre los tratamientos (Figura 5A). Bajo la condición de normoxia, en el grupo expuesto al 1 % del xenobiótico se registró una actividad de PEPCK significativamente mayor al control ( $p < 0,05$ ), el cual no mostró diferencia con el grupo expuesto al 5 %. El grupo control normóxico mantuvo valores de PEPCK, similares a los reportados en anoxia. En los mejillones expuestos a la FHAUMV, la actividad de la enzima fue más alta en normoxia que en anoxia ( $P < 0,05$ ).

En el manto no hay diferencia significativa para la actividad de PEPCK entre las dos condiciones de respiración, tampoco entre los tratamientos bajo la condición anóxica. Sin embargo, en la condición normóxica, la actividad de la enzima disminuyó en los juveniles de mejillón expuestos al 1 % FHAUMV ( $p < 0,05$ ), en comparación con la actividad del control, que no se diferenció de los organismos expuestos al 5 % (Figura 5B).

La actividad enzimática en las branquias no mostró diferencia entre los tratamientos bajo la condición anóxica ni bajo la condición normóxica (Figura 5C). El grupo control y el expuesto a la dosis del 5 % del contaminante, incrementaron la actividad de PEPCK en normoxia, en comparación con la actividad registrada en anoxia ( $p < 0,005$ ).

**Figura 5.** Actividad de la enzima PEPCK en tejidos de *P. viridis*, expuesto a 48 h de anoxia y 72 h de recuperación en normoxia, y pre-expuestos a dosis subletales de FHAUMV. (\* C - 1 - 5 = diferencia significativa entre los tratamientos; \*\* diferencia significativa entre condición de anoxia y normoxia; n = 6). **A. Músculo.** Tratamiento en anoxia  $p > 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p < 0,05$ . Condición control  $p > 0,05$ ; Condición 1 %  $p \leq 0,01$ ; Condición 5 %  $p < 0,05$ . **B. Manto.** Tratamiento en anoxia  $p > 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p < 0,05$ . Condición control, 1 % y 5 %  $p > 0,05$ . **C. Branquias.** Tratamiento en anoxia y normoxia  $p > 0,05$ . Condición control y 5 %  $p < 0,005$ ; Condición 1 %  $p > 0,05$ .

Respecto a la actividad de PEPCK en condición de anoxia, no se observó el efecto de la toxicidad del contaminante sobre los tejidos estudiados (Figuras 5). PEPCK registrada en anoxia fue similar a la de normoxia en músculo y manto, e incrementó en las branquias. Probablemente la constancia de la actividad enzimática en ambas condiciones de respiración fue suficiente para que en el músculo y manto se realizaran las funciones metabólicas necesarias. Mientras que la potenciación de la enzima en las branquias bajo respiración normóxica, podría ser una expresión de las demandas energéticas de este tejido, no sustentada por la actividad de la PK. Es probable que esta demanda energética sea el resultado del gasto del organismo ante la presencia y biotransformación de FHAUMV, así como del incremento de RL durante la re-oxigenación, probables generadores de los altos niveles de PL reportados en este estudio.

**Citocromo C Oxidasa (CCO).** La actividad de la enzima CCO, registrada en el músculo de mejillones bajo anoxia (Figura 6A), fue significativamente baja en los organismos expuestos al 1 % del xenobiótico, en comparación con el control ( $p < 0,05$ ). La concentración del 5 % no tuvo efecto sobre la actividad enzimática. Este patrón de respuesta de la enzima a la FHAUMV fue similar en normoxia ( $p \leq 0,01$ ). El tejido expuesto al 5 % y el control no mostraron diferencia entre las dos condiciones de respiración, en cuanto a la actividad de la CCO. Los mejillones normóxicos expuestos al 1 % mostraron valores menores a los encontrados en anoxia ( $p < 0,01$ ).

**Figura 6.** Actividad de la enzima CCO en tejidos de *P. viridis*, expuesto a 48 h de anoxia y 72 h de recuperación en normoxia, y pre-expuestos a dosis subletales de FHAUMV. (\* C - 1 - 5 = diferencia significativa entre los tratamientos; \*\* diferencia significativa entre condición de anoxia y normoxia; n = 6). **A. Músculo.** Tratamiento en anoxia  $p < 0,05$ ; Tratamiento en normoxia  $p = 0,01$ . Condición control y 5 %  $p > 0,05$ ; Condición 1 %  $p < 0,01$ . **B. Manto.** Tratamiento en anoxia  $p < 0,05$ ; Tratamiento en normoxia

$p < 0,01$ . Condición control  $p > 0,05$ ; Condición 1 %  $p \leq 0,01$ ; Condición 5 %  $p < 0,05$ . **C. Branquias.** Tratamiento en anoxia y normoxia  $p < 0,005$ . Condición control  $p < 0,05$ ; Condición 1 % y 5 %  $p < 0,01$ .

En el manto bajo anoxia (Figura 6B), los mejillones expuestos al 1 % del xenobiótico mostraron un incremento significativo de CCO en referencia al control ( $p < 0,05$ ); contrario al 5 % que mantuvo una actividad enzimática similar a la del control. Bajo la condición de normoxia, la actividad de la enzima fue baja en los organismos expuestos a las dos concentraciones del contaminante, comparado con el control ( $p < 0,01$ ), siendo el efecto más pronunciado en la concentración del 5 %. En normoxia, los juveniles de *P. viridis* expuestas al contaminante mostraron valores de CCO más bajos que los registrados en anoxia ( $p < 0,05$ ). Mientras que los valores de esta enzima en el grupo control, no mostró variación entre las dos condiciones de respiración.

La actividad de CCO registrada en branquias (Figura 6C) bajo respiración anóxica, mostró un incremento en los mejillones expuestos al xenobiótico en comparación con el control ( $p < 0,05$ ), el cual disminuyó con el incremento de la FHAUMV. En normoxia no hubo diferencia entre el grupo control y los organismos expuestos al 1 % del xenobiótico, pero en los expuestos al 5 %, la actividad de la CCO disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ). El grupo control normóxico mostró valores mayores de CCO que los reportados en anoxia ( $p < 0,05$ ). Para los organismos pre-expuestos a dosis subletales, la actividad de la enzima fue baja en normoxia en comparación a lo registrado en anoxia ( $p < 0,01$ ).

Al igual que en las enzimas glucolíticas, la condición de respiración y el contaminante modularon la actividad de CCO entre los tejidos. La actividad de la enzima es menor en anoxia que en normoxia para las branquias del grupo control, lo que muestra su susceptibilidad en el tejido ante la anaerobiosis; mientras que en el músculo y en el manto, no se vio afectada por las condiciones de respiración. La concentración del 1 % del xenobiótico inhibió la actividad de CCO en músculo, y la incrementó en el manto y branquias bajo anoxia. Este aumento tal vez se deba a un ajuste molecular para aumentar la afinidad de la enzima por el oxígeno residual que se pudiera encontrar en el organismo (Larade y Storey, 2002). Ante la concentración del 5 % FHAUMV, es notable la estimulación de CCO en las branquias (Figura 6C), pero a un nivel menor al observado al 1 %, en este estado respiratorio, mostrando un cierto grado de toxicidad sobre el mecanismo de compensación de la enzima por la deficiencia de disponibilidad de oxígeno; toxicidad también reflejada sobre el nivel de actividad enzimática registrado en manto y músculo expuesto al 5 % (Figura 6B y 6A), donde los niveles de CCO fueron similares a los reportados en el grupo control.

En normoxia la actividad enzimática disminuyó en los tejidos estudiados, con el incremento de la concentración del xenobiótico, a excepción del músculo expuesto al 5 % donde la actividad de la enzima no muestra diferencia en relación con el control. Aparentemente, las mitocondrias de manto y branquia son blancas de la toxicidad de la FHAUMV en aerobiosis; lo que trae como consecuencia una disminución de la capacidad de producción de energía para satisfacer las necesidades energéticas de los tejidos afectados. Estas observaciones representan la importancia de la toxicidad de la mezcla de metales de hidrocarburos sobre el metabolismo energético en condiciones normales de oxígeno en *P. viridis*. Este patrón de respuesta ha sido observado a nivel de la glándula digestiva del mejillón verde, bajo las condiciones de respiración dadas (Cortesía, 2006; Nusetti et al., 2010).

De esta manera, se concluye que la toxicidad del aceite lubricante produce estrés oxidativo en los juveniles de *P. viridis*, incrementando el daño de membrana ante la re-oxigenación que se genera durante el cambio de la respiración anaeróbica a la aeróbica, evidenciada por la cuantificación de los niveles de MAL. De igual manera, la presencia de FHAUMV y las condiciones de respiración, afectan a PK, PEPCK, y CCO, lo que altera su capacidad de tolerancia anóxica, llevándolos a una disminución de su sobrevivencia ( $LT_{50}$ ) y en última instancia a la muerte.

La respuesta específica del estudio, evidencio que tiene una estrecha relación con la ubicación morfológica y las funciones fisiológicas de los tejidos, lo que ofrece distintas áreas superficiales de contacto con el xenobiótico, afinidad con los componentes químicos de la FHAUMV y tasas metabólicas de

biotransformación y excreción (Yap et al., 2006). Las branquias tienen un contacto directo con el medio ambiente en una gran área superficial (Almeida et al., 2005), lo que contribuye con su función de filtración y regulación de procesos iónicos, de alto requerimiento energético. El manto es una capa que envuelve los órganos del molusco y tiene un menor contacto con el ambiente por estar dentro de las valvas, y a diferencia de los otros dos tejidos, tiene un metabolismo anabólico y una relación con la movilización del sustrato, por lo que tiene gran consumo de O<sub>2</sub>. Por su parte, el músculo está implicado en el cierre y apertura de las valvas (Segnini, 2009) y en la degradación de los carbohidratos (De Zwaan y Bont, 1975) por lo que en él se observa alta actividad de las enzimas PK y PEPCK.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto recibió financiamiento del Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) en el marco de la Misión Ciencia (Contrato Nro. 200700058). Los autores agradecen a R. Cortez-Mago y M. Guevara, por la ayuda con la microalga *Tetraselmis tetrahele*, a C. Lodeiros-Seijo y N. García, por los juveniles de mejillón, y a L. Troccoli por el apoyo con el análisis estadístico. De igual forma, a los evaluadores anónimos por las sugerencias en el manuscrito.

## NOTAS

**LITERATURA CITADA** Acosta, V. (2008). Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento del mejillón marrón *Perna perna* y el mejillón verde *Perna viridis* (Bivalvia; Mytilidae), bajo sistema de cultivo, en el Golfo de Cariaco (Edo. Sucre), Venezuela. [Trabajo de grado, Doctorado en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente] Repositorio Universidad de Oriente de Venezuela.

Agard, J., Kishore R. y Bayne B. (1992). *Perna viridis* (Linnaeus, 1758): first record of the Indo-Pacific green mussel (Mollusca: Bivalvia) in the Caribbean. *Caribbean Marine Studies*, 3, 59 – 60.

Almeida, E., Dias A. C., Dafre A. L., Gomes O. F., Medeiros M. H. G. y Di Mascio P. (2005). Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318 (1), 21 – 30.

Andreyeva, A. Y., Kladchenko, E. S., y Gostyukhina, O. L. (2022). Effect of hypoxia on immune system of bivalve molluscs. *Marine Biological Journal*, 7(3), 3–16.

Babarro, J. M., y De Zwaan, A. (2008). Anaerobic survival potential of four bivalves from different habitats. A comparative survey. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(1), 108-113.

Babarro, J., Labarta U. y Fernández M. J. (2007). Energy metabolism and performance of *Mytilus galloprovincialis* under anaerobiosis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87 (4), 941-947.

Bücher, T. y Pfeleiderer G. (1955). Pyruvate kinase from muscle. In: Colowick, S. y N. O. Kaplan (Ed). *Methods in Enzymology* (pp.435 – 440). Academic Press.

Calabrese, E. J. y Baldwin L. A. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21, 91 – 97.

Chapman, P. M. (1998). New and emerging issues in ecotoxicology – The shape of testing to come? *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 4, 1 – 7.

Cortés, C. A. (2006). Estrés oxidativo y actividad de las enzimas piruvato quinasa y citocromo c oxidasa en el mejillón *Perna viridis* (L., 1758) expuesto a concentraciones subletales de aceite usado de motor de vehículo. [Trabajo especial de grado. Licenciatura en Biología. Universidad de Oriente] Repositorio Universidad de Oriente de Venezuela.

Cortez-Mago, R., Guevara M., Vásquez A. y Lodeiros-Seijo C. (2007). Influencia del petróleo crudo en el crecimiento de microalgas del nororiente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41 (4), 471 – 483.

Dailianis, S. y Kaloyianni M. (2004). Cadmium induces both pyruvate kinase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity t protein kinase C mediated signal transduction, in isolated digestive gland *Mytilus galloprovincialis* (L.) *The Journal of Experimental Biology*, 207(10), 1665-1674.

De Zwaan, A. y Bont A. M. (1975). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from adductor muscle tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of Comparative Physiology*, 96(2), 85 – 94.

De Zwaan, A. y Wijsman T. C. M. (1976). Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca) Characteristics of anaerobic metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 54 (3), 313-323.

- De Zwaan, A., Babarro J. M. F., Monari M. y Cattani O. (2002). Anoxic survival potential of bivalves: (arte) facts. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 131 (3), 615 - 624.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). (1993). Impact of oil and related Chemicals and wastes on the Marine Environment. Reports and Studies GESAMP, (50).
- Gold-Bouchet, G. y Zapata-Pérez O. (2004). Contaminación, ecotoxicología y manejo costero. En: Rivera A., E. (Ed). El manejo costero en México (pp. 277 - 286). Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México.
- Hamilton, M. A., Russo R. C. y Thurston R. V. (1978). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 12 (4), 417-417.
- Hidalgo, M. E., Fernández E., Cabello A., Rivas C., Fontecilla F., Morales L., Aguirre A. & Cabrera E. (2006). Evaluación de la respuesta antioxidante en *Chiton granosus* Frembly, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) a contaminantes oxidativos. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 46 (1), 79 - 76.
- Keen, J. H., Habing W. H. y Jakoby W. B. (1976). Mechanism for several activities of the glutathione s-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183 - 6188.
- Lanning, G., Flores J. F. y Sokolova I. M. (2006). Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology*, 79(3), 278 - 287.
- Larade, K. y Storey K. B. (2002). A Profile of the Metabolic Responses to Anoxia in Marine Invertebrates. In: Storey, K. B. & J. M. Storey (Eds.). *Cell and Molecular Responses to Stress*, Vol.3 (pp 27 - 46). Elsevier.
- Livingstone, D. R., García-Martínez P., Michel X., Narbonne J., O'Hara S., Rivera D. y Winston G. (1990). Oxyradical generation a pollution-mediated mechanisms of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* (L), and other molluscs. *Functional Ecology*, 4, 415 - 424.
- Lodeiros, C., Marin B. y Prieto A. (1999). Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalvia. APUDONS.
- Maero, E., y Anguiano, O. L. (2018). Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en diferentes poblaciones de adultos de *Cydia pomonella* de la Patagonia argentina. *AgriScientia*, 35(1), 35-42.
- Malave, C. J. y Prieto A. S. (2005). Producción de biomasa en el mejillón verde en una localidad de la Península de Araya, Venezuela. *Interciencia*, 30 (11), 699-705.
- Nelson, D. L. y Cox M. M. (2006). Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. En: Lehninger Principios de Bioquímica 4ta edición (pp. 690 - 750). OMEGA.
- Nusetti, O., Marcano L., Zapata E., Esclapés M., Nusetti S. y Lodeiros C. (2004). Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil N° 6. *Interciencia*, 29 (06), 324 - 328.
- Nusetti, O., Tovar M. y Zapata-Vívenes E. (2010). Piruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmiun exposed *Perna perna* subjected to anoxic and aerobic conditions. *Journal of Shellfish Research*, 29 (1), 203-208.
- Nusetti, O., Zapata-Vivenes E., Esclapés M. y Rojas A. (2005). Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomididae) exponed to used Vehicle crankcase oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48 (4), 509 - 514.
- Ortiz, C. (2020). Aguas residuales aceitosas generadas en autolavados de cumana, Venezuela. *Revista INGENIERIA UC*, 27 (2), 200-210.
- Pérez, J. E., Alfonsi C., Salazar S. K., Macsotay O., Barrios J. y Martínez R. (2007). Especies marinas exóticas y criptogénicas en las costas de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 46 (1), 79 - 96.
- Rajagopal, S., Venugolopan V. P., Van Der Velde G. y Jenner H. A. (2006). Greening of the coast: a review of the *Perna viridis* success story. *Aquatic Ecology*, 40, 273 - 297.
- Romero V., D. C. (2010). Distribución y comportamiento de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas organoclorados en sedimentos superficiales del sector oriental del Golfo de Cariaco, Venezuela. [Trabajo de grado, Maestría en Ciencias Marinas, mención Oceanografía Química. Universidad de Oriente] Repositorio Universidad de Oriente de Venezuela.
- Rusdi, Ratna K y Tyas P. U. (2021); Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in green mussel (*Perna viridis* L.) at Jakarta Bay, Indonesia. *AIP Conference Proceedings*, 2331 (1), 050007.
- Rylander, K., Perez J. y Gomez J. A. (1996). Status of the green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae), in north-eastern Venezuela. *Caribbean Marine Studies*, 5, 86 - 87.
- Santillán, D. P., Sotres A., Jasso V. R., Olmos J. R., Gaxiola M. O., Pedraza A. M. y Arreola J. L. (1999). Actividad de superóxido dimutasa y las concentraciones de glutatión y malonandehído en los tejidos pulmonar y cardiaco post (perfusión, preservación y repercusión) del bloque cardiopulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, 12 (1), 13 - 18.
- Segnini de B., M. I. (2009). Respuestas termohalinas de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura II* (pp. 673 - 682).

- Suárez, S. 1995. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios, [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis/Salud/Suarez\\_C\\_S/introd.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis/Salud/Suarez_C_S/introd.htm).
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552 (2): 335 – 344.
- Wharton, D. C. y Tzagoloff A. (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. En: Colowick, S.P. y Kaplan N.O. (Eds.) *Methods in enzymology* Vol. 10 (pp 245 – 250). Academic Press
- Yap, C. K., Ismail A., Edward F. B., Tan S. G. y Siraj S. S. (2006). Use of different soft tissues of *Perna viridis* as biomonitors of bioavailability and contamination by heavy metals (Cd, Cu, Fe, Pb, Ni and Zn) in a semi-enclosed intertidal water, the Johore Straits. *Toxicological e Environmental Chemistry*, 88: 683 – 695.
- Zapata-Vivenes E, Nusetti O, Marcano L, Sánchez G y Guderley H. (2020). Antioxidant defenses of flame scallop *Ctenoides scaber* (Born, 1778) exposed to the water-soluble fraction of used vehicle crankcase oils. *Toxicology Reports*, 25 (7), 1597-1606.
- Zapata-Vivenes, E. y Nusetti O. (2007). Protection on glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *Journal of Shellfish Research*, 26 (2), 335 – 34.