



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INMUNOTOXICIDAD EN EL
PECTEN *Lima scabra* (Born, 1778) SOMETIDO A FRACCIONES ACUOSAS DE
LUBRICANTES USADOS DE MOTORES DE VEHÍCULOS
(Modalidad: Investigación)

GABRIELA MARÍA SÁNCHEZ ROJAS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Ejemplares y sitio de colecta.....	7
Preparación del contaminante	7
Bioensayos de exposición	8
Extracción de hemolinfa	8
Parámetros citológicos	9
Número total de hemocitos y viabilidad celular	9
Parámetros inmunológicos.....	10
Fagocitosis	10
Lisozima.....	10
Parámetros bioquímicos.....	12
Preparación de los extractos enzimáticos.....	12
Análisis enzimáticos.....	12
Peroxidación de lípidos.....	14
Proteínas totales	15
Análisis estadísticos	15
RESULTADOS.....	17
Parámetros citológicos	17
Contaje celular y viabilidad celular.....	17
Parámetros inmunológicos.....	19
Fagocitosis y actividad de lisozima.....	19
Actividad enzimática.....	19
Superóxido dismutasa (SOD).....	19
Catalasa (CAT).....	21
Glutaciona peroxidasa (GPx).....	24
Glutaciona reductasa (GR).....	25
Glutaciona-S-transferasa (GST)	25
Peroxidación de lípidos (MDA).....	29
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	38
APÉNDICES.....	47

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Edgar Zapata por haber creído en mí desde el primer momento, por apoyarme en este duro y largo camino, a parte de mí asesor, mí jefe es un gran amigo. Gracias por la paciencia, los consejos que me dio a nivel profesional y personal.

Al Prof. Osmar Nusetti por haberme permitido realizar mí tesis en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biología.

A la Prof. Leida Marcano por la colaboración prestada durante la investigación.

A la Prof. Mairin Lemus por toda la colaboración prestada en el laboratorio que está a su cargo, y por toda su amistad, apoyo y sabios consejos a lo largo de toda mí carrera.

Al Departamento de Biología a cargo del Prof. Tania Ramírez por la colaboración prestada.

Al Prof. Miguel Guevara por el suministro de microalgas.

Al Prof. César Graziani por haber creído y confiado en mí desde el primer momento gracias.

A los Profs. Mercedes Acosta, María E. Álvarez, Aracelys Torres, María J. González, Julio Armas, Tania Ramírez, Norys Jordán, Isabel Mímbela, Yusmar Ramos, y José Véliz por todo el apoyo a lo largo de mí carrera y sus sabios consejos.

A mis compañeros que compartieron conmigo a lo largo de mí carrera: Zulay, Saraí, Juan Manuel, Ernesto, Carlos Rabascall, Ángel, Inaydes, Darwin, Karla, entre otros.

A mí amiga Ahieska Liscano quien fue un gran apoyo durante todo el desarrollo de mí investigación, y que siempre estuvo en los buenos y malos momentos.

A mis amigas que siempre estuvieron cuando más las necesite: Dulce, Carla Vanesa, Maríaelena, Esther Nairu, María Virginia, Anahía, Jaise y a mis amigos: Nené, Alejandro y Carmona.

A mis compañeros Rosmary Bolivar, Madargelis Barreto y Victor Acosta por toda la colaboración prestada en la parte experimental.

A Carlos Figueroa y Heidy Márquez por toda su colaboración durante mi trabajo de investigación, por su apoyo y amistad incondicional.

A la señora Eugenia Alfonso por toda la ayuda prestada a lo largo de mí carrera.

A la señora Emelis Malavé por haberme ayudado a lo largo de toda mí vida.

DEDICATORIA

A Díos todopoderoso, a la Virgen del Valle y al Doctor José Gregorio Hernández por haberme dado las fuerzas necesarias para salir adelante en tantos momentos duros y difíciles de mí vida ayudarme a alcanzar una de mis más grandes metas graduarme.

A mí por mí lucha constante y por mí perseverancia a lo largo de toda mí carrera, a pesar de todas las dificultades que se me presentaron.

A mis padres Liduvina Rojas y Julio César Sánchez porque hicieron posible que llegara alcanzar con mucho sacrificio este gran sueño... Gracias.

A la Flía Ríos pero en especial a mí abuelo que en paz descansa Carmelo Ríos, a mí tía Tamara Ríos y mi prima Carla Frailes por toda la ayuda prestada a lo largo de mí vida desinteresadamente y ayudarme a lograr este gran sueño.

A Rommy Rivas por haber aparecido en mí vida cuando más lo necesitaba, gracias por el apoyo, la amistad, el cariño y creer en mí y ayudarme a ser mejor persona cada día de mi vida. Te quiero.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Contaje total de células en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar. 18
- Figura 2. Viabilidad celular en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar. 18
- Figura 3. Porcentaje de fagocitos (%) en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar. 20
- Figura 4. Actividad de lisozima ($\mu\text{g/ml}$) en la glándula digestiva de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar..... 20
- Figura 5. Actividad máxima de superoxido dismutasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B), músculo, (C) branquia.Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar..... 22
- Figura 6. Actividad máxima de catalasa en la glándula digestiva (A), músculo (B) y branquia (C) de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo, (C) branquia.Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar 23
- Figura 7. Actividad máxima de glutaciona peroxidasa en la glándula digestiva, músculo y branquias de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B), músculo, (C) branquia. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar..... 26
- Figura 8. Actividad máxima de glutaciona reductasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días.(A) glándula, (B) músculo, (C) branquia.Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar 27
- Figura 9. Actividad máxima de glutaciona-S- transferasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo, (C) branquia.Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar..... 28

Figura 10. Niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteína) en la glándula, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo (C) branquia Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar 30

RESUMEN

Se evaluaron los parámetros citológicos (contaje y viabilidad celular), las respuestas inmunológicas (fagocitosis y lisozima) en la hemolinfa y glándula digestiva de *Lima scabra*, actividades máximas de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) glutatona peroxidasa (GPx), glutatona reductasa (GR), glutatona-S-transferasa (GST) y niveles de malondialdehído (MDA) como indicador de daño oxidativo en glándula digestiva, músculo y branquia de *Lima scabra*, después de ser expuestos a concentraciones subletales (0,01; 0,1 y 1 %) de una fracción acuosa de uso de motores de vehículos (FALUMV) durante 7 (período agudo) y 13 días (período crónico). Los resultados mostraron diferencias significativas en el conteo celular, actividad fagocítica y actividad de lisozima en ambos periodos de exposición a FALUMV. La actividad de SOD varió significativamente en el músculo y branquia; la actividad de GPx aumentó significativamente en la glándula, músculo y branquia en el período crónico; la actividad de GR varió significativamente en músculo y branquia en ambos períodos de exposición; la actividad de GST varió significativamente en la branquia en ambos periodos de exposición y la actividad de CAT varió significativamente en el músculo. Los niveles de MDA disminuyeron significativamente en la glándula digestiva y branquia; mientras que en el músculo incrementaron los niveles en el período crónico a la mayor concentración. El aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GR, GST, CAT) en los diferentes órganos, indica que se desencadenaron mecanismos de respuesta compensatorios ante el desarrollo de alteraciones en los sistemas en el organismo, asociado con la producción de (EROs). El descenso en los niveles de MDA en la glándula digestiva y branquia indican que la activación de los mecanismos antioxidantes fueron suficientes para contrarrestar el efecto del contaminante sobre las membranas celulares en ambos tejidos; mientras que el incremento en los niveles de MDA en el músculo indica que los mecanismos activados no fueron suficientes para contrarrestar el efecto del contaminante sobre las membranas celulares. En síntesis, los parámetros inmunológicos y bioquímicos determinados en *L. scabra* demuestran su sensibilidad como marcadores biológicos en presencia de dosis subletales de mezclas de xenobióticos, y sugieren su posible uso para estimar ambientes impactados por contaminación química.

Palabras o Frases Claves: Biomarcadores, *Lima scabra*, Inmunotoxicidad, Estrés Oxidativo, Enzimas Antioxidantes.

INTRODUCCIÓN

El creciente deterioro de los ecosistemas marino costeros por efecto de la contaminación causada por actividades antropogénicas y los posibles efectos sobre la biota circundante, ha sido el motivo principal de las investigaciones ecotoxicológicas. El ambiente marino es considerado uno de los mayores depósitos de contaminantes, los mismos pueden encontrarse biodisponible a la biota. Evaluaciones recientes en ecosistemas marinos han reportado incrementos en las concentraciones de hidrocarburos (Ngabe *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2001), metales pesados (Martínez, 2002), bifenilos clorados (Richardson y Zheng, 1999; Cheung *et al.*, 2002), tanto en agua, sedimentos y alimentos. Estos compuestos contaminantes con frecuencia tienen como fuente principal las descargas de lubricantes usados de vehículos provenientes de autolavados, bombas de servicios, talleres mecánicos, etc.

Los lubricantes usados de motores de vehículos están constituidos por mezclas de sustancias potencialmente tóxicas que se producen por combustión incompleta en el automóvil. Esta combustión resulta en una diversidad de compuestos químicos, principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados, detergentes, solventes clorados y compuestos heteroatómicos polares (Pruell y Quinn, 1988; GESAMP, 1993; ATSRD, 1997), los mismos han sido vinculados con alteraciones fisiológicas y bioquímicas en organismos representativos del medio marino (Hellou *et al.*, 1997; Dyrinda *et al.*, 2000; Nusetti *et al.*, 2004).

Actualmente en los estudios de impacto ambiental se emplean procedimientos experimentales que permiten estimar la toxicidad potencial de mezclas de xenobióticos sobre organismos que habitan un ecosistema determinado (Mozeto y Zagatto, 2006). Para tales propósitos se han desarrollado ensayos de toxicidad subletales basados en la cuantificación de biomarcadores altamente sensibles;

respuestas que frecuentemente se encuentran conservadas filogenéticamente, las cuales proporcionan una medida o relación exposición-efecto de xenobióticos específicos o mezclas de estos (Rand, 1995; Brousseau *et al.*, 2000; Cajaraville *et al.*, 2000; Marigomez *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2006). La determinación de un biomarcador, bioquímico y/o celular, no siempre puede indicar el grado de contaminación en el medio, ya que estas respuestas pueden ser alteradas por factores ambientales (temperatura, salinidad, disponibilidad de oxígeno) y endógenos (metabolismo oxidativo, fagocitosis), siendo imprescindible implementar la integración de baterías de respuestas biológicas con la finalidad de obtener examen preciso del posible riesgo de contaminación (Anderson *et al.*, 1999; Cheung *et al.*, 2001; Marigomez *et al.*, 2004).

Las respuestas inmunológicas se han hecho de uso frecuente en las evaluaciones de ambientes impactados utilizando moluscos bivalvos, por considerarse un sistema altamente sensible a los efectos de xenobióticos (Anderson *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002; Nicholson, 2003). Al igual que en organismos superiores, los bivalvos poseen un sistema inmunológico que reside en la hemolinfa, constituido de un componente celular (inmunocitos o hemocitos), los cuales desempeñan un papel clave durante los procesos de inflamación y fagocitosis de patógenos. Además consta de un componente humoral que comprende la actividad bacteriolítica de lisozimas, factores aglutinantes y hemolisinas (Fisher *et al.*, 1999; 2000; Fournier *et al.*, 2000; Nicholson, 2003). Se ha comprobado que los hemocitos ejecutan distintas funciones dentro del sistema inmune, incluyendo fagocitosis (Cheng, 1988; Adema *et al.*, 1991; López *et al.*, 1997; Beaven y Paynter, 1999).

Es bien conocido que la estabilidad, viabilidad y el número total de hemocitos puede ser afectada por factores ambientales como el estrés (Rewrantz, 1990), patógenos (Oliver y Fisher, 1999) y contaminantes ambientales (Coles *et al.*, 1994; 1995; Pipe *et al.*, 1999). La exposición *in situ* de moluscos como *Mytilus*

galloprovincialis a hidrocarburos clorados, metales pesados u otros xenobióticos produce alteración en el contaje diferencial de hemocitos (Fisher *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Se han descrito alteraciones inmunológicas en diversas especies de bivalvos expuestos a una variedad de xenobióticos (Pipe *et al.*, 1999; Nusetti *et al.*, 2004). Sin embargo, estos aspectos no han sido suficientemente documentados en especies caribeñas, especialmente impactadas por mezclas de xenobióticos.

Un aspecto importante en los organismos marinos de vida aeróbica es el marcado daño que puede ser causado cuando las defensas antioxidantes son sobrepasadas por la acción de radicales libres. Este fenómeno es comúnmente denominado “estrés oxidativo” (Sies, 1988; 1993), y actualmente parece ser la base de diversas anomalías fisiológicas tales como alteraciones metabólicas por inactivación enzimática, daños a macromoléculas celulares como ADN, oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, entre otros (Doyotte *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2001); inmunosupresión, incapacidad de cicatrización, crecimiento celular retardado, incluso carcinogénesis (Klein *et al.*, 1991; Hermes-Lima y Zenteno-Savin, 2004; Nusetti *et al.*, 2004; Zapata-Vivenes *et al.*, 2005). En los últimos años, se ha observado un creciente interés por examinar la influencia de las especies reactivas del oxígeno (EROs) u oxiradicales bajo condiciones exacerbadas de perturbación por xenobióticos (Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 2001).

La biotransformación intracelular de algunos contaminantes (metales pesados, hidrocarburos, compuestos polihalogenados) constituye una fuente generadora de EROs para la célula. Estos mecanismos han sido ampliamente estudiados en invertebrados marinos, en especial moluscos bivalvos. El metabolismo cíclico-redox de una gama de xenobióticos orgánicos en bivalvos involucra una variedad de enzimas biotransformadoras, existiendo una fase inicial de funcionalización (fase I), en la cual actúan las enzimas que catalizan las reacciones donde un grupo funcional polar, tal como el grupo hidroxilo, es introducido dentro del contaminante lipofílico,

haciéndose este hidrofílico. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran el sistema de monoxigenasas de función mixta (MFO), flavoproteínas, epóxidos hidratadas, esterases, sulfatasas, fosfatasas, diacetilasas y otras oxidasas. Seguidamente intervienen las enzimas de la fase de conjugación (fase II), las cuales catalizan reacciones de conjugación del producto de la fase I, con una variedad de moléculas endógenas (GSH, derivados de azúcares, entre otros), resultando en productos hidrosolubles, no tóxicos, ionizables y de fácil excreción para el organismo. Entre las enzimas de la fase II se encuentran glutatona-S-transferasa y UDP-glucuronosiltransferasa (Di Giulio *et al.*, 1995; Cadenas y Davies, 2000; Nascimento, 2006).

En los moluscos bivalvos existen evidencias de estos sistemas enzimáticos involucrados en los mecanismos de defensa celular antioxidante lo que permite al organismo protegerse contra xenobióticos pro-oxidantes, capaces de producir toxicidad por aumento de EROs y otras especies de radicales libres. La acumulación de productos derivados de la fase I de biotransformación puede promover efectos tóxicos a nivel molecular y celular, que incluye desde peroxidación de lípidos, daños en los ácidos nucleicos, apoptosis y hasta lisis celular (Di Giulio *et al.*, 1995; Fridovich, 1998; Anderson *et al.*, 1999; Pipe *et al.*, 1999; Livingstone *et al.*, 2001).

El sistema de defensa antioxidante que protege a las células de la acción perjudicial de EROs, está constituido por un número de compuestos y enzimas específicas capaces de barrer oxiradicales originados por distintos factores. Las enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD, EC 1.1.15.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutatona peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y la glutatona reductasa (GR, EC 1.6.4.2) están encargadas de controlar y llevar a concentraciones fisiológicamente estables a los oxiradicales, constituyendo un mecanismo esencialmente inducible en organismos que habitan en ambientes impactados (Canesi *et al.*, 1999; Porte *et al.*, 2001; De Almeida *et al.*, 2007). Estas enzimas juegan un

papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular, reflejando una inducción específica de respuestas a contaminantes. Un particular interés, posee la determinación de la actividad de la enzima glutatona-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18), la cual cataliza reacciones de conjugación con el tripeptido glutatona y cuantitativamente es la enzima mas importante de la fase II, también juega un papel importante en la protección del estrés oxidativo (Manduzio *et al.*, 2004).

Cuando se sobrepasa el potencial de defensa antioxidante celular, pueden desencadenarse patologías oxidativas por una producción incrementada de EROs. Los lípidos de membrana por ejemplo constituyen un blanco de acción de oxirradicales, siendo oxidados a lípidos radicales y lípidos peroxidados. La peroxidación de lípidos es conocida como la descomposición y producción de una variedad de sustancias, incluyendo etano, pentano y aldehídos (Sukhotin *et al.*, 2002). La formación excesiva de lípidos oxidados ha sido reconocida como buen marcador de estrés oxidativo (Ribera *et al.*, 1991; Sukhotin *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002; De Almeida *et al.*, 2007).

Los bivalvos han sido ampliamente utilizados en estudios de impacto ambiental. Los mismos poseen amplia distribución geográfica, son fácilmente manipulables, sésiles, se alimentan por filtración y son susceptibles a contaminación en zonas marino costeras, siendo considerados organismos centinelas de contaminación química (Lodeiros *et al.*, 1999; Niyogi *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002; Orbea *et al.*, 2002). En la región oriental de nuestro país existen pocos trabajos ecotoxicológicos en bivalvos, asociados a arrecifes de corales escleractíneos. Un organismo representante de estos sensibles ecosistemas es el pecten *Lima scabra* (Born, 1778), del cual se conoce parte de su biología y proteínas inducibles en presencias de metales pesados (Gómez, 1998 y Martins, 2004), quienes siguieren su papel como indicador de aguas contaminadas, por estas especies químicas. No

obstante, los efectos de mezclas complejas de xenobióticos orgánicos sobre marcadores biológicos permanecen aun sin ser dilucidados.

La asociación de las poblaciones naturales de *Lima scabra* a áreas arrecifales, siguieren a esta especie como posible organismo centinela frente a una situación de contaminación del medio ambiente. En tal contexto, el propósito de esta investigación fue evaluar los efectos causados por fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos sobre algunas respuestas del sistema de defensa inmunológico y antioxidante-enzimático en el pecten *Lima scabra* (Born, 1778); así como los niveles tisulares de malondialdehído (MDA); parámetros que podrían ser alterados en organismos que habitan ecosistemas impactados por xenobióticos.

METODOLOGÍA

Ejemplares y sitio de colecta

Los ejemplares de *Lima scabra* (Born, 1778), con tallas comprendidas entre 5,5 y 6,5 cm, fueron colectados en zonas coralinas de la Bahía de Mochima, (Cumaná, estado Sucre). La colecta de los organismos se realizó de forma manual por buceo libre, a profundidades comprendidas entre los 2 y 5 metros. Los bivalvos fueron transportados en cavas de aislamiento térmico hasta el laboratorio, donde fueron aclimatados por un lapso de una semana, en acuarios contentivos de agua de mar (salinidad 36, pH $7,7 \pm 0,2$, temperatura 25 ± 1 °C y aireación constante).

Preparación del contaminante

La fuente de xenobióticos que se utilizó en los bioensayos estáticos estuvo constituida por una mezcla de aceite lubricante usado de motores y de agua de mar filtrada en una relación 1:9 V/V. Para la realización de esta mezcla se tomó un volumen de 200 ml de la mezcla y se diluyó en un volumen 1 800 ml de agua de mar filtrada (Miliporo), se colocó en un recipiente de vidrio de 3 000 ml de capacidad. La mezcla fue agitada continuamente (con magnetos sobre planchas de agitación) por 24 horas a temperatura ambiente. Posterior a este periodo se pasó la mezcla a través de un sistema de vacío y se filtró en papel Whatman N° 1 para eliminar cualquier remanente de la fase orgánica. Se colectó la fracción acuosa y se utilizó como solución patrón (100%).

Bioensayos de exposición

Se realizaron experimentos preliminares para determinar concentraciones de la mezcla del contaminante, la cual garantizaría a los organismos condiciones fisiológicas aparentemente estables durante un período agudo (7 días) y un período crónico (13 días) de exposición. Se seleccionaron tres concentraciones subletales (0,01; 0,1 y 1%), a las cuales fueron expuestos 6 organismos por acuario de 3 000 ml de capacidad a las distintas concentraciones durante un período de 7 y 13 días; período adecuado para mantener el 100% de sobre vivencia. Los animales fueron alimentados con 100 ml de *Tetraselmis chuii* a una proporción de 16 000 cél/ml de concentración. Se realizaron recambios del agua de mar diariamente, para mantener disponible la concentración del contaminante y remover las pseudoheces y/o productos de desecho provenientes del metabolismo de los organismos.

Transcurrido cada período de exposición al contaminante, seis bivalvos por cada tratamiento fueron sometidos a un procedimiento de extracción de hemolinfa para determinar los parámetros citológicos e inmunológicos. Además, se disectó la glándula digestiva para cuantificar los niveles de lisozima; las branquia, músculo y glándula digestiva fueron almacenados a -40 °C, hasta su uso (7 días) en la cuantificación de los parámetros bioquímicos (enzimas, lípidos peroxidados, y proteínas).

Extracción de hemolinfa

Para la extracción de la hemolinfa se realizó una punción directa del seno venoso, ubicado cerca de la porción fásica del músculo abductor, con la ayuda de una jeringa hipodérmica de 1 ml de capacidad. Se extrajo cuidadosamente el fluido (0,1 ml), el cual se colocó en tubos eppendorf (1,5 ml), mantenidos a una temperatura de

aproximadamente de 4°C. Luego la muestra se resuspendió en 1 ml de agua de mar-EDTA 0,01 mmol/l a pH 7,8 y se conservó a 4°C.

Parámetros citológicos

Número total de hemocitos y viabilidad celular

El número total de células por ml y la viabilidad celular se determinaron por tinción diferencial con el colorante azul tripano (sigma) al 0,4 % siguiendo la metodología indicada en el catálogo Sigma Chemical Co. Un volumen de 3 ml del colorante se colocó en agitación constante por 1 hora, se centrifugó a 1 250 x g por 10 minutos y luego se filtró en papel Whatman N° 1 para eliminar resto de material no solubilizado. Para contar el número total y viabilidad de las células por ml se mezclaron 20 µl de la suspensión final de hemocitos con un volumen igual de azul tripano, se resuspendió y se realizó un conteo de 100 células en una cámara de Neubauer por microscopía de luz, a una magnificación de 400X. Las células vivas se diferenciaron de las muertas porque éstas últimas tomaron una coloración azul, expresándose la viabilidad como el porcentaje (%) de células vivas contadas. El número total de hemocitos por ml se determinó contando el número total de células viables en los cuatro cuadrantes externos de la cámara y aplicando posteriormente la siguiente fórmula propuesta por Goven y Kennedy (1996): Número de hemocitos/ml

$$= \frac{\bar{X}}{2} \times 10^4$$

Parámetros inmunológicos

Fagocitosis

Para evaluar la actividad fagocítica de los hemocitos se ajustó el número total de células a una concentración de 2×10^6 hemocitos/ml. Se empleó como antígeno la levadura comercial inactivada por calor (stock 5 mg/ml de agua de mar), se filtró en papel Whatman N° 1, aplicando vacío con la finalidad de eliminar los aglomerados y disponer de levaduras separadas. Del filtrado de levaduras se tomaron 200 μ l y se diluyó en 3 000 μ l de agua de mar filtrada (Miliporo) para preparar la solución de levaduras a una concentración de 0,3 mg/ml como fuente de antígeno. En un tubo de centrifuga eppendorf de 1,5 ml de capacidad se añadieron 100 μ l de la suspensión de hemocitos y 100 μ l de la solución final de levaduras, se resuspendió suavemente la mezcla y luego se centrifugó brevemente a 1 000 x g por 5 minutos.

Las muestras centrifugadas se incubaron por un período de 20 a 24 horas a 8°C, para que ocurra la fagocitosis. Luego de este período se descartaron 100 μ l del sobrenadante y al precipitado celular se le añadió 100 μ l de azul tripano 0,4%. Se resuspendió con una pipeta Pasteur y finalmente se tomó una alícuota de 10 μ l para hacer el conteo en un hemocitómetro por microscopio de luz a una magnificación de 400X. Para determinar el número de fagocitos se contaron 100 células viables por cada muestra y se estableció una relación porcentual de fagocitos en la muestra analizada. Se consideraron fagocitos, los hemocitos que contenían en el interior de su citoplasma al menos una levadura visible.

Lisozima

El protocolo empleado para evaluar la actividad de lisozima en la glándula digestiva de *Lima scabra* fue propuesto inicialmente por Mc Henery *et al.* (1979),

modificado para la especie en estudio, el cual se basa en la lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus* (sustrato de lisozima), empleando lisoplacas de agarosa. Para la preparación de los geles se utilizó: buffer fosfato de potasio (KH_2PO_4) 67 mmol/l pH 6,0; agarosa Sigma (tipo II) al 1%, cloruro de sodio (NaCl) 0,1% y *Micrococcus lysodeikticus* a 0,4 mg/ml; todos los reactivos de Sigma Chemical Co. Se añadieron los reactivos en el buffer fosfato pH 6,0 y bajo agitación constante se disolvieron por calentamiento hasta que la mezcla se hizo homogénea y comenzó a ebullición. Se dejó enfriar la mezcla hasta 45°C aproximadamente, se colocaron volúmenes de 8 ml en placas de Petri plásticas (5 cm de diámetro), se dejó solidificar y se guardaron a 4°C hasta su posterior uso. Cada placa se perforó simétricamente en cuatro puntos diferentes, y cada orificio fue de aproximadamente de 5 mm de diámetro.

A un grupo de 6 bivalvos por cada tratamiento se le extrajo la glándula digestiva para los ensayos de lisozima, seguidamente se pesó y homogenizó en buffer fosfato 100 mmol/l pH 6,24 a 4°C, en una relación 1:8 masa de tejido/volumen de buffer extracción. El homogenizado resultante se centrifugó a 1 250 x g por 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue empleado como fuente inmediata de lisozimas. Un volumen equivalente a 40 μl del extracto de lisozima se colocó en cada orificio de la placa, por réplica. Las lisoplacas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 horas, período en el cual se hicieron claramente visibles los halos de inhibición correspondientes a la lisis de la pared bacteriana por acción de la lisozima. Los diámetros de los halos de inhibición de la lisis fueron medidos con una regla (con divisiones en mm) y se compararon con los producidos por la lisozima estándar de clara de huevo de gallina (HEL), utilizando un análisis de regresión lineal propuesto por Goven *et al.* (1994), según la siguiente ecuación: $\text{HEL } \mu\text{g/ml} = \text{Antilog}_{10} [a+b (\text{diámetro en mm}) \times 1\ 000]$.

Parámetros bioquímicos

Preparación de los extractos enzimáticos

La glándula digestiva, branquia y músculo del organismo experimental *Lima scabra* se homogenizaron de 0-4 °C, a una relación 1:4 masa de tejido/volumen de buffer extracción. El buffer de extracción para las preparaciones enzimáticas estuvo compuesto de Tris-HCl 20 mmol/l (hidroximetilamina) a pH 7,6 conteniendo: EDTA (ácido etilendiamino-tetracetato) 1 mmol/l, DDT (ditiotreitól) 1 mmol/l, sucrosa 500 mmol/l, KCl (cloruro de potasio) 150 mmol/l, justo antes de la homogenización se le añadieron 10 µl de PMSF (ácido metil-fenil sulfoxido) 100 mmol/l diluido en alcohol isopropílico). El homogenizado resultante fue centrifugado inicialmente a 1 100 x g por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada. El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 2 200 x g durante 20 minutos. Del sobrenadante final se tomaron 2 ml que se utilizaron como fuente de enzimas.

Análisis enzimáticos

Las actividades máximas de las enzimas antioxidantes se determinaron en un espectrofotometro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1 °C. Los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado en un volumen final de la mezcla de 1 ml. Los resultados fueron expresados en actividad específica (U/g.m.h.), donde U es la cantidad de enzima necesaria para catalizar 1 micromol de sustrato en un minuto.

Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.1.1.1). La actividad enzimática se determinó mediante la utilización de un Kit Bioxytech SOD-525; el cual está basado en la medición del incremento de la tasa de autooxidación de 5,5,6^a, 11b- tetrahidro-

3,9,10-trihidrobenzo[c] fluoreno (TTF), mediado por la SOD en solución acuosa alcalina para producir un cromógeno con un máximo de absorbancia de 525 nm. Para medir la actividad se le añadió a la cubeta experimental 900 µl de buffer, 40 µl de extracto enzimático, 30 µl de 1-metil-2-vinilpiridinium trifluorometanosulfonato en HCl, mezclado e incubado a 37 °C por 1 minuto. Luego se agregó 30 µl TTF y se agitó nuevamente. Posteriormente se midió en el cambio absorbancia 525 nm por 2 minutos. La actividad de SOD es definida como la actividad que dobla la tasa de autoxidación del blanco control ($V_s/V_c=2$). La relación entre el cociente V_s/V_c y la actividad de SOD es descrita por la siguiente ecuación: $V_s/V_c= 1 + [SOD]/ \alpha \times [SOD] + \beta$. Donde: V_s = tasa del contenido de SOD en la muestra; V_c = promedio de las muestras blancos ($SOD=0$); α = coeficiente experimental y β = coeficiente de unidades en SOD-525.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). La actividad fue determinada por el descenso de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (Coeficiente de extinción $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Mezcla de incubación: buffer fosfato KH_2PO_4/K_2HPO_4 50 mmol/l pH 7,5 y H_2O_2 500 mmol/l. A la cubeta experimental (de cuarzo) se le agregó 970 µl de buffer fosfato y 20 µl del extracto enzimático, se mezcló rápidamente y se midió la absorbancia por 90 segundos para establecer una línea base. Para dar inicio a la reacción se añadió 10 µl de H_2O_2 .

Glutaciona peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9). La actividad se determinó siguiendo el cambio de extinción a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de extinción $6,2 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), acoplando la producción de glutaciona oxidada a la actividad de glutaciona reductasa comercial. Mezcla de incubación: KH_2PO_4/K_2HPO_4 a 100 mmol/l pH 7,5; glutaciona reducida (GSH) 67 mmol/l; azida de sodio (NaN_3) 2 mmo/l; glutaciona reductasa (GR) comercial 1U; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) 1,6 mmol/l; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 mmol/l. A la cubeta experimental se le agregó: 800 µl de buffer fosfato, 25 µl de NaN_3 , 10 µl de

GR, 50 μ l de NADPH y 20 μ l de H₂O₂. Se mezcló rápidamente y se midió la absorbancia de la actividad endógena durante 90 segundos para establecer la línea base. Para dar inicio a la reacción se añadieron 50 μ l del extracto y 50 μ l de GSH.

Glutathion reductasa (GR, EC 1.6.4.2). La actividad fue medida siguiendo el descenso de la absorbancia de la oxidación del NADPH a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de extinción 6,2 mmol l⁻¹ cm⁻¹). Mezcla de incubación: KH₂PO₄/K₂HPO₄ a 100 mmol/l pH 7,5; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) 1,6 mmol/l; glutathion oxidada (GSSG) 34 mmol/l. A la cubeta experimental se le añadió: 790 μ l de buffer fosfato, 60 μ l de NADPH y 50 μ l del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente y se cuantificó la absorbancia por 90 segundos para establecer la línea base. Para dar inicio a la reacción se le agregó 100 μ l de GSSG.

Glutathion-S-Transferasa (GST, EC 2.5.1.18). La actividad enzimática se determinó siguiendo el descenso de la concentración del complejo formado entre GSH y -1-cloro- 2,4- dinitrobenceno (CDNB), a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de extinción 9,6 mmol l⁻¹ cm⁻¹). La mezcla de incubación consistió de 890 μ l de Na₂HPO₄ buffer fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 100 mmol/l pH 6,5; 10 μ l CDNB 25 mmol/l diluído en etanol y 50 μ l del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente para establecer la línea base. La reacción se inició por la adición de 50 μ l de GSH.

Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual se fundamenta en la cuantificación colorimétrica de uno de los principales productos de la peroxidación de

lípidos, el malondialdehído (MDA), siguiendo el protocolo estandarizado para bivalvos propuesto por Livingstone *et al.* (1990). Para ello 0,2 g de cada uno de los tejidos (glándula digestiva, músculo y branquias), se homogenizaron en 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l pH 7,5, y fueron centrifugados a 2 200 x g por 15 minutos. Del sobrenadante resultante fueron tomadas 250 µl y se colocaron en baño de agua a 37°C por 15 minutos, al terminar el tiempo los mismos fueron retirados del baño de agua y fueron colocados en baño de hielo, adicionando a cada tubo 250 µl de solución cromógena contentiva de ácido tricloroacético 12,5%, ácido clorhídrico 1 mol/l para detener la reacción , luego a cada tubo se le añadió 500 µl ácido tiobarbitúrico al 1%, se agitaron los tubos y se colocaron en baño de agua a 90°C con agitación constante por 10 minutos. Posteriormente fueron retirados del baño de agua y colocados nuevamente en baño de hielo para ser enfriados y luego ser centrifugados a 1 500 x g por 10 minutos a 4°C; el sobrenadante final se transfirió a la celda del espectrofotómetro para su medición a 532 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados son expresados en nmol de MDA por mg de proteínas.

Proteínas totales

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

Análisis estadísticos

Los parámetros citológicos e inmunológicos (contaje, viabilidad celular, actividad de lisozimas y fagocitosis,) y parámetros bioquímicos (enzimas y lípidos

peroxidados), fueron analizados por un ANOVA de dos vías con una prueba a posteriori de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1982).

RESULTADOS

Parámetros citológicos

Contaje celular y viabilidad celular

El número total de hemocitos varió significativamente en los organismos expuestos a las diferentes concentraciones a la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) y días de exposición ($F_{s_c}= 3,11$ y $F_{s_d}= 15,51$; $p<0,05$ para ambos). La figura 1 refleja un aumento en el número total de células sanguíneas en los organismos expuestos a la concentración de 0,01% y 0,1% en contraste a los organismos no tratados durante la primera semana de exposición; contrariamente fue observado un descenso en el número total de células a la mayor concentración de exposición. Los organismos expuestos a FALUMV durante 13 días mostraron una reducción evidente en el número de células totales a todas las concentraciones de exposición.

El porcentaje de viabilidad de hemocitos en los organismos expuestos a FALUMV en comparación a sus respectivos controles no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones y los períodos de exposición ($F_{s_c}=0,64$ y $F_{s_d}=1,31$; $p>0,05$ para ambos factores), observándose un rango de 88–97% de células viables (Fig. 2). A pesar, de no encontrarse diferencias, los menores valores fueron presentados a la concentración más alta durante los 7 días de exposición, y en las concentraciones media y alta durante los 13 días de exposición.

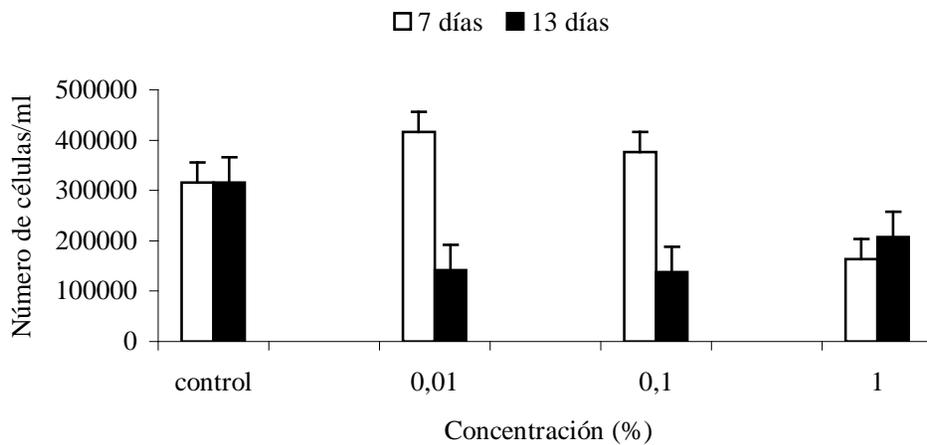


Figura 1. Contaje total de células en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

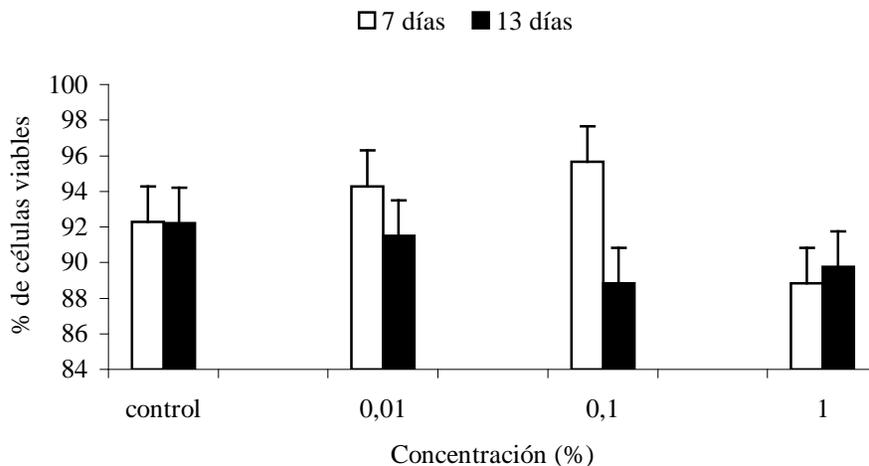


Figura 2. Viabilidad celular en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

Parámetros inmunológicos

Fagocitosis y actividad de lisozima

El porcentaje de fagocitosis en organismos no expuestos y expuestos a FALUMV se muestra en la figura 3. El número total de fagocitos en los organismos expuestos presentó diferencias significativas a las crecientes concentraciones de FALUMV ($F_{s_c}=2,66$; $p<0,05$). Se observó un incremento de células fagocíticas con respecto sus controles, tanto entre concentraciones como entre los días de exposición ($F_{s_c}= 6,61$; $p<0,05$ y $F_{s_d}= 9,22$; $p<0,05$ para ambos factores). La figura 4 durante los 7 días a la concentración de 0,01%, con una considerable disminución a la concentración más alta durante los 13 días de exposición. No se evidenció interacción entre los tratamientos. En contraste, la actividad de lisozima en la glándula digestiva mostró diferencias significativas entre los organismos sometidos a la mezcla de xenobióticos muestra un aumento en la actividad de lisozima en los organismos expuestos a las concentraciones de 0,1 y 1% en el período agudo (7 días). Sin embargo, se encontraron valores similares a los basales en organismos expuestos durante el período más largo de exposición.

Actividad enzimática

Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD en la glándula digestiva no mostró diferencias significativas entre las concentraciones a las cuales fueron expuestos los organismos ($F_s=1,62$; $p>0,05$) y los periodos de exposición ($F_s= 0,51$; $p>0,05$) (Fig. 5A). La actividad de SOD en el músculo aductor mostró diferencias significativas entre las concentraciones a las cuales fueron expuestos los organismos ($F_s= 2,94$; $p<0,05$), sin

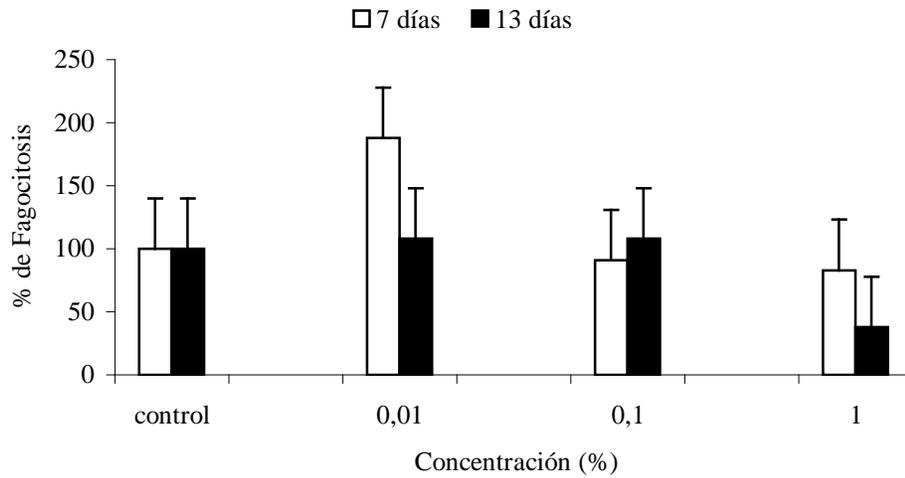


Figura 3. Porcentaje de fagocitos (%) en la hemolinfa de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

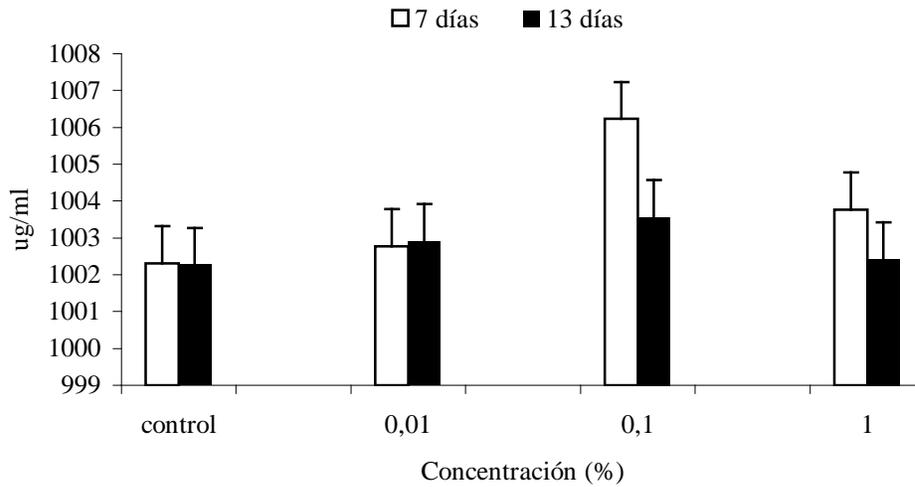


Figura 4. Actividad de lisozima (µg/ml) en la glándula digestiva de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

embargo no se evidenciaron diferencias entre los días de exposición a FALUMV ($F_s=2,1$; $p>0,05$), presentando un patrón similar de incremento de su actividad durante los dos periodos. Las actividades más altas fueron registradas en los organismos expuestos a los 7 y 13 días a la concentración de 0,01% y 0,1 %, con una evidente disminución, hasta niveles similares a los basales, a la concentración de 1%, en ambos períodos de exposición (Fig. 5B).

La actividad de SOD en las branquias varió significativamente por efecto de las concentraciones ($F_s=11,71$; $p<0,05$). Sin embargo, su actividad presentó similitud entre los días de exposición a FALUMV ($F_s=0,08$; $p>0,05$). La actividad de SOD en este órgano exhibió incrementos proporcionales en relación a las dosis, similarmente en los dos periodos de exposición, encontrándose los valores más altos en los organismos expuestos a la concentración de 1% (Fig. 5C).

Catalasa (CAT)

En la glándula digestiva, la actividad de CAT no mostró diferencias significativas entre las concentraciones ($F_s=0,53$; $p>0,05$) ni en el período de exposición a FALUMV ($F_s=0,56$; $p>0,05$) (Fig. 6A).

En el músculo aductor, la CAT mostró un ligero incremento en su actividad en los organismos expuestos a 0,01 % ($145,93 \pm 65,52 \mu\text{moles/g.m.h}$), presentado una reducción significativa a las concentraciones de 0,1 y 1 % durante la primera semana de exposición a FALUMV, siendo el efecto mayormente marcado a la concentración de 1%. En contraste, los organismos expuestos durante 13 días mostraron una recuperación de la actividad a la mediana y alta concentración subletal, evidenciándose actividades más elevadas en contraste al periodo corto de exposición

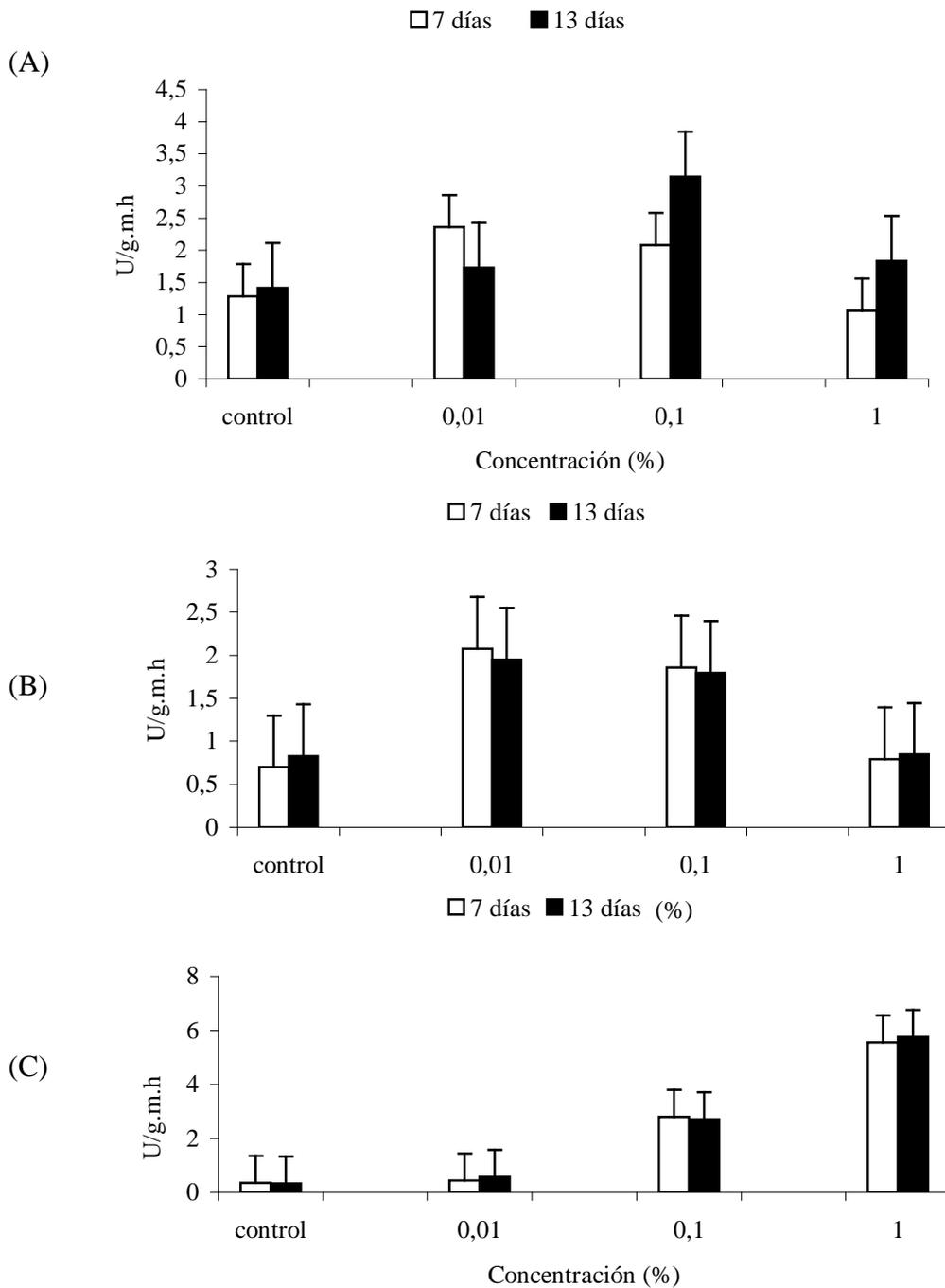


Figura 5. Actividad máxima de superóxido dismutasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B), músculo, (C) branquia. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

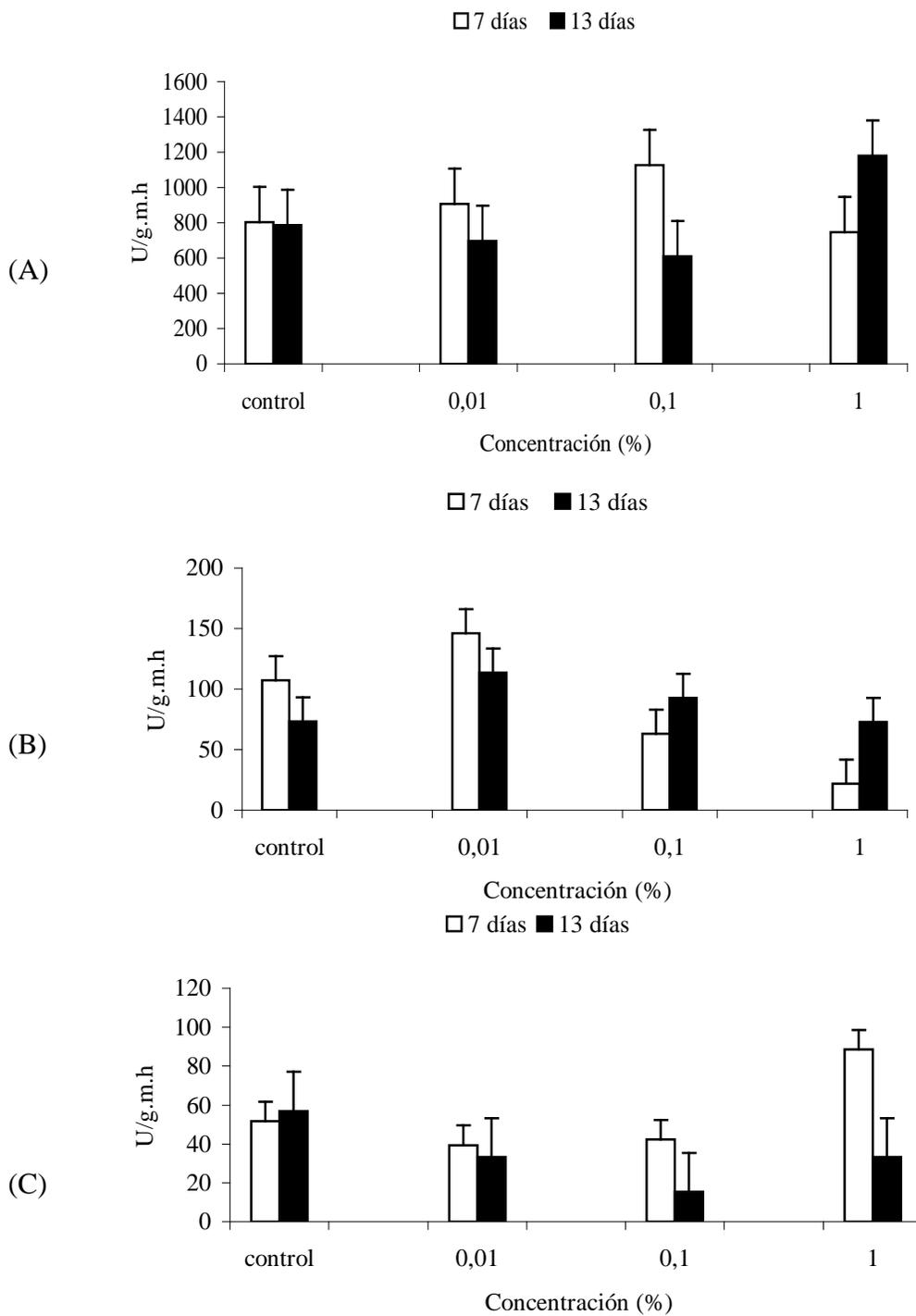


Figura 6. Actividad máxima de catalasa en la glándula digestiva (A), músculo (B) y branquia (C) de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo, (C) branquia
Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

(Fig. 6B). La actividad de CAT en branquias (Fig. 6C) no mostró diferencias significativas entre las concentraciones a las cuales fueron expuestas los organismos ($F_s=1,52$; $p>0,05$) y de los periodos de exposición a FALUMV ($F_s= 2,93$; $p>0,05$).

A pesar de los resultados es notable un ligero incremento en la actividad promedio de CAT a la concentración mas elevada del periodo corto de exposición.

Glutathiona peroxidasa (GPx).

La actividad de GPx en la glándula digestiva mostró una variación en relación a las dosis ($F_s= 4,72$; $p<0,05$) y del tiempo de exposición a FALUMV ($F_s= 159,85$; $p<0,05$). Durante la primera semana de exposición no se evidenciaron modificaciones en actividad de esta enzima, sin embargo en los organismos expuestos a los 13 días fue visualizada una elevada actividad de GPx en todos los grupos experimentales (Fig. 7A).

En el músculo, la actividad de GPx no fue afectada por las concentraciones utilizadas en el bioensayo ($F_s= 2,52$; $p>0,05$). Sin embargo, cuando se compara individualmente por tratamientos, se puede observar un aumento sustancial de la actividad a la concentración de 1% de FALUMV en el periodo de exposición más largo ($F_s= 31,90$; $p<0,05$) (Fig. 7B).

En las branquias, la actividad de GPx mostró diferencias significativas entre los organismos expuestos a las concentraciones experimentales ($F_s= 4,28$; $p<0,05$) y entre los dos periodos de exposición a FALUMV ($F_s= 24,61$; $p<0,05$). Un incremento exacerbado de su actividad fue registrada a la concentración intermedia de 0,1 % durante los 13 días de exposición ($497,35 \pm 331,19 \mu\text{moles/g.m.h}$) (Fig. 7C).

Glutathion reductasa (GR)

La actividad de GR de la glándula digestiva en los organismos expuestos no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de FALUMV ($F_s = 0,82$; $p > 0,05$; días y $F_s = 0,55$; $p > 0,05$). Sin embargo, el efecto de interacción entre los tratamientos fue observado a la mayor concentración de 1% ($907,34 \pm 298,79$ $\mu\text{moles/g.m.h}$) durante los 13 días de exposición (Fig. 8A).

En el músculo, la actividad de GR manifestó diferencias entre las concentraciones ($F_s = 58,60$; $p < 0,05$), pero no entre los días de exposición a FALUMV ($F_s = 0,07$; $p > 0,05$). Se observó incrementos de la actividad a las concentraciones de 0,1% y 1 %, respectivamente con respecto al control, durante los dos periodos de exposición (Fig. 8B).

En las branquias, la actividad de GR mostró los mayores promedios a las concentraciones de 0,1 y 1 % durante el periodo corto de exposición ($F_s = 3,20$; $p < 0,05$). Mientras que a los 13 días, solo a la concentración de 0,1 % mostró incremento en su actividad, observándose valores similares a los controles en las concentraciones de 0,01 y 1 % ($F_s = 2,45$; $p > 0,05$) (Fig. 8C).

Glutathion-S-transferasa (GST)

En la glándula digestiva y músculo aductor, la actividad de GST no presentó diferencias significativas entre las concentraciones a las cuales fueron expuestos los organismos ($F_{sgd} = 1,74$; $p > 0,05$ / $F_{sm} = 0,07$; $p > 0,05$) ni en los periodos de exposición a FALUMV ($F_{sgd} = 1,96$; $p > 0,05$ / $F_{sm} = 2,25$; $p > 0,05$) (Fig. 9A y 9B).

Sin embargo, la actividad de GST en la branquia mostró un incremento en las concentraciones de 0,01 y 0,1 % de la mezcla de xenobióticos ($F_s = 29,09$; $p < 0,05$).

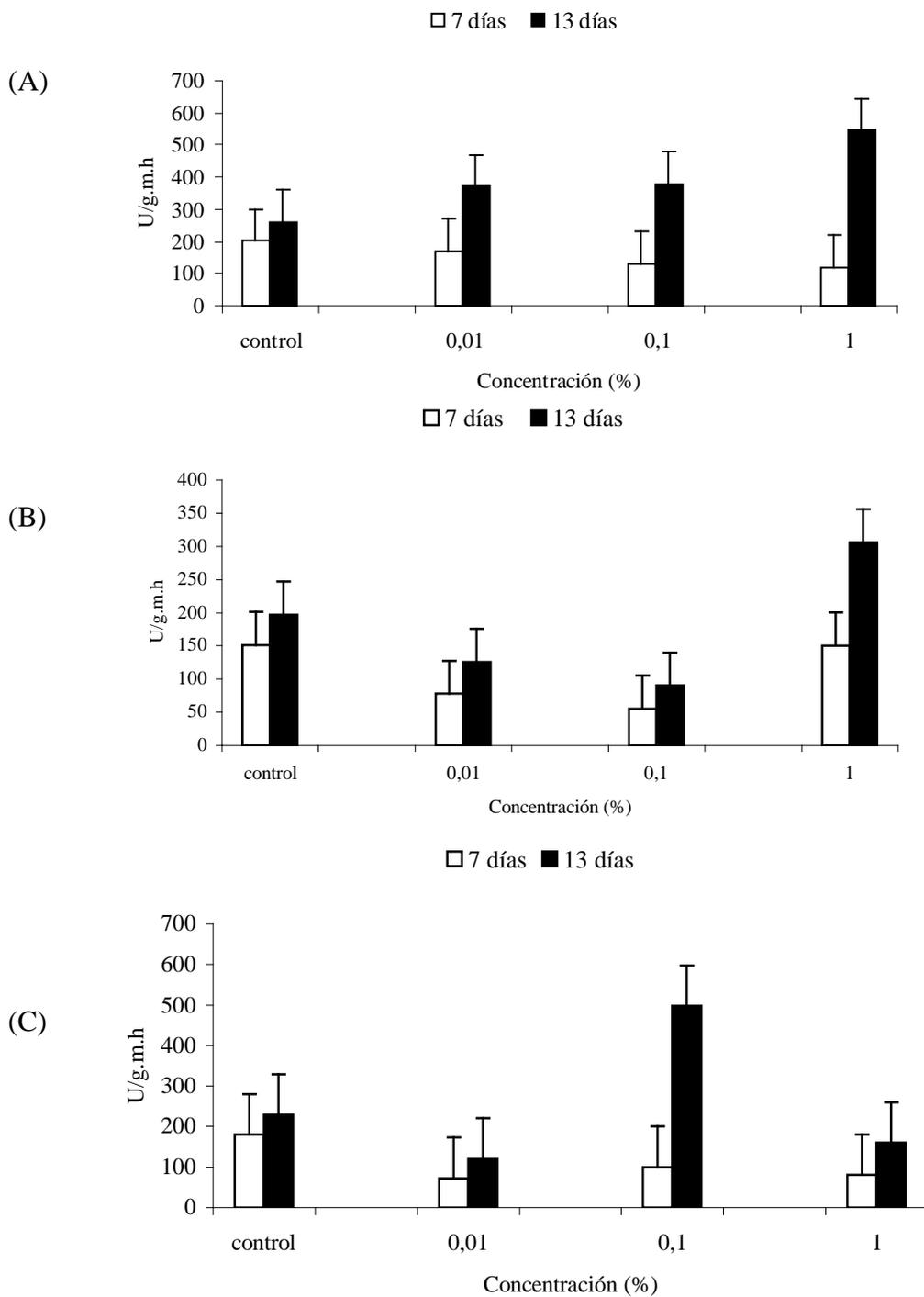


Figura 7. Actividad máxima de glutatióna peroxidasa en la glándula digestiva, músculo y branquias de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B), músculo, (C) branquia. Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

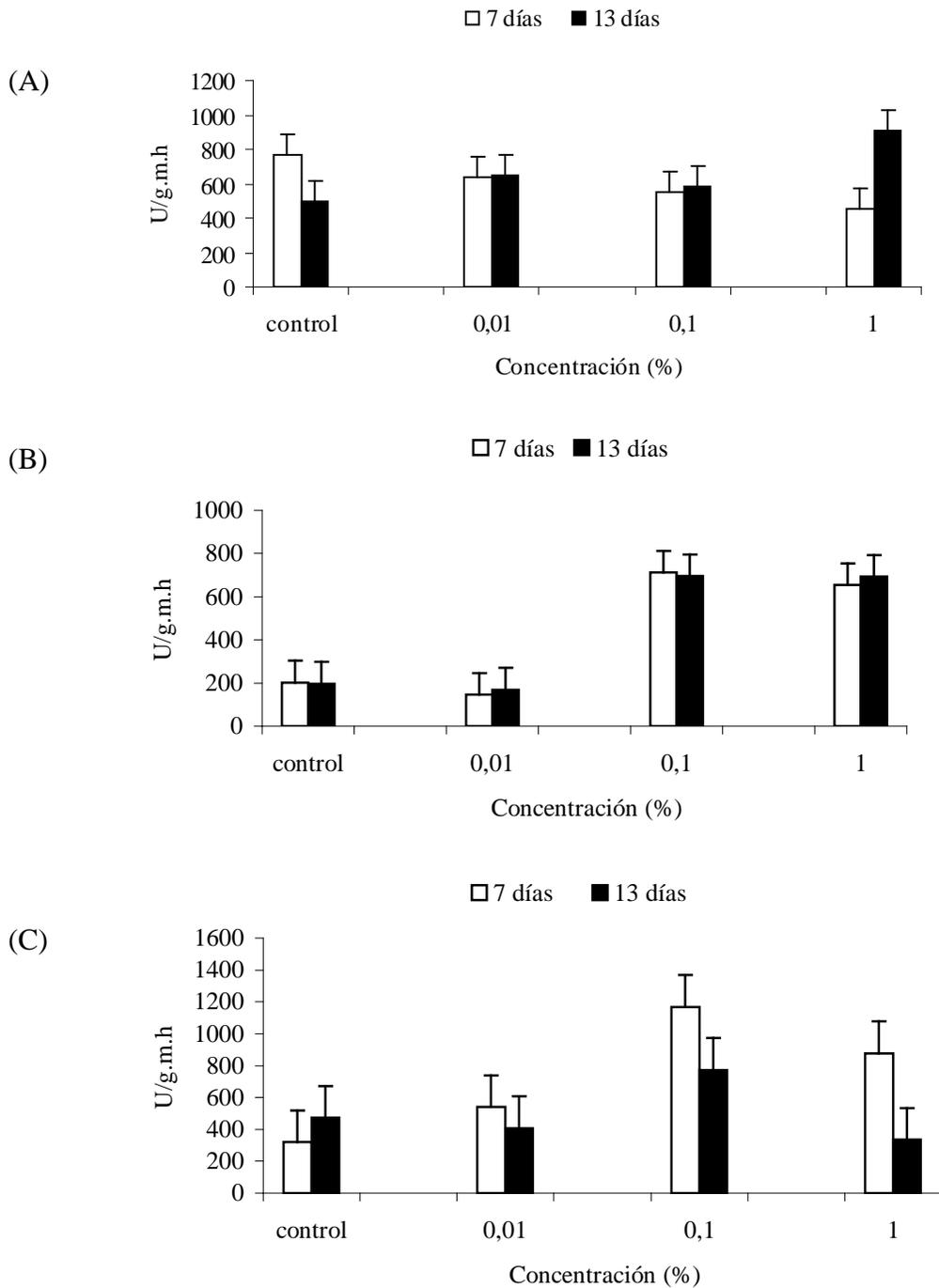


Figura 8. Actividad máxima de glutatona reductasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días.(A) glándula, (B) músculo, (C) branquia.

Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

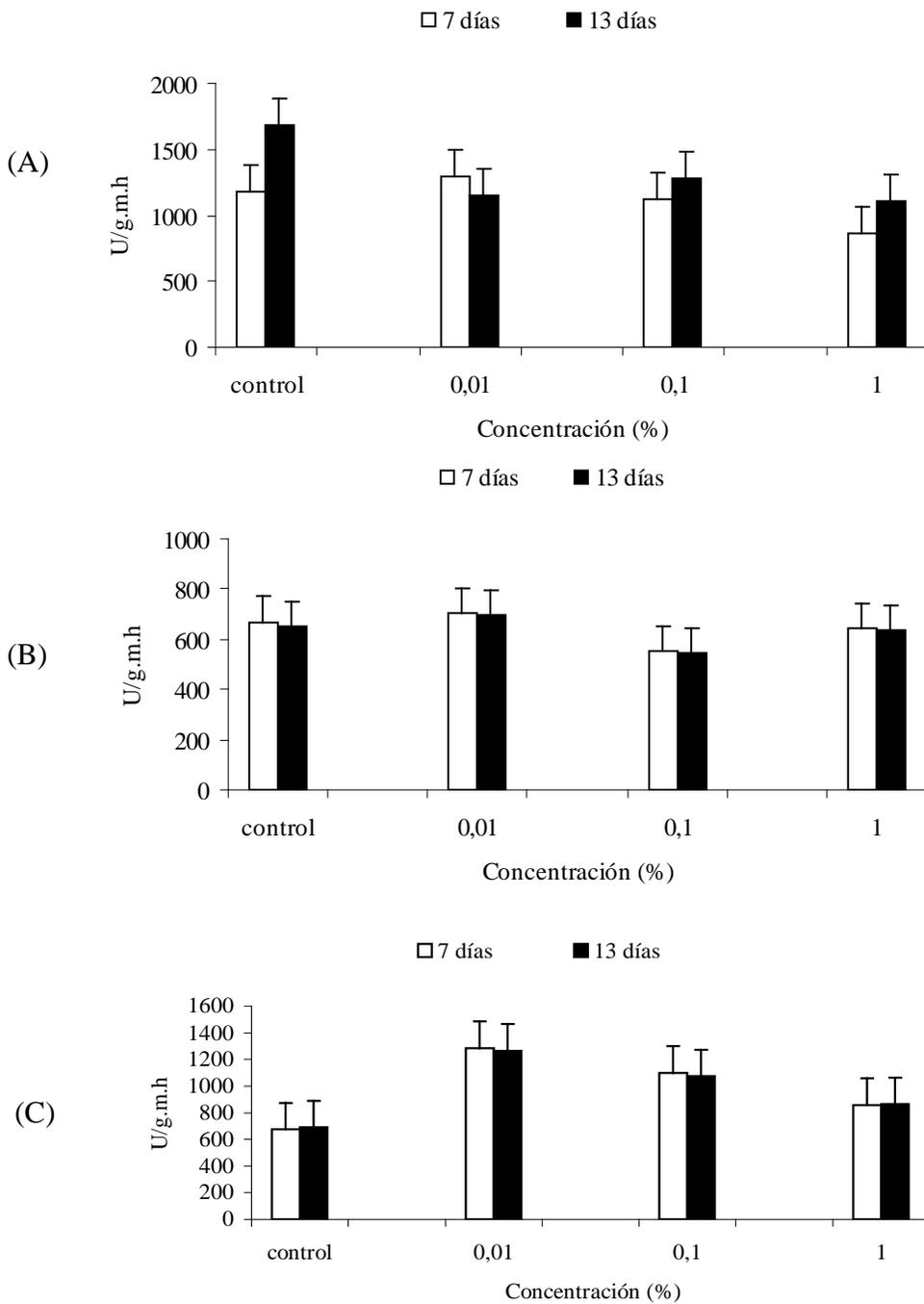


Figura 9. Actividad máxima de glutationa-S- transferasa en la glándula digestiva, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo, (C) branquia.

Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

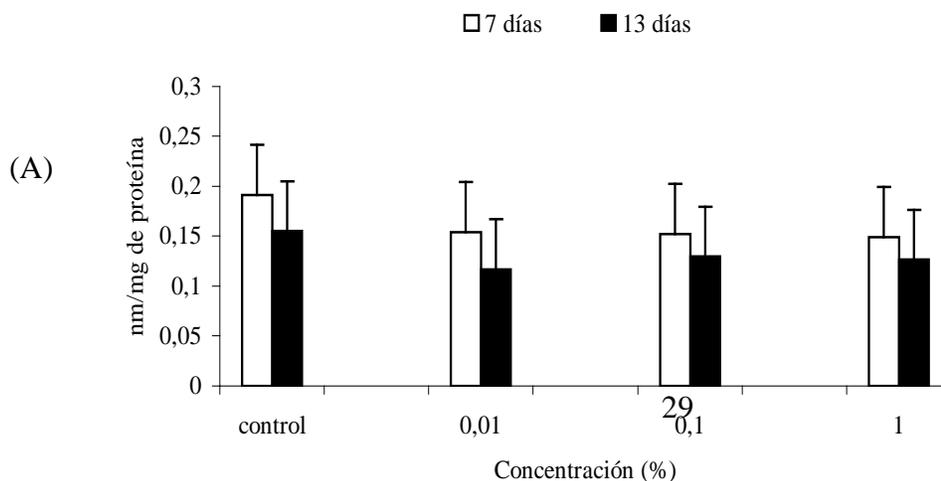
Por el contrario, los valores en la concentración de FALUMV más alta se mantuvieron similares al control. La actividad de esta enzima presentó el mismo patrón en los dos periodos de exposición ($F_s=0,02$; $p>0,05$) (Fig.9C).

Peroxidación de lípidos (MDA)

En la glándula digestiva, los niveles de MDA en los organismos expuestos a las distintas dosis no mostraron variaciones significativas con respecto a los organismos no expuestos ($F_s=1,93$; $p>0,05$) y se observaron comportamientos similares en ambos periodos de exposición ($F_s= 9,04$; $p<0,05$) (Fig. 10A).

Los niveles de MDA en el músculo mostraron un incremento significativo en organismos expuestos a la concentración más alta (1%) en el período más largo de

exposición ($F_s= 2,62$; $p<0,05$) (Fig. 10B). En branquias, los niveles de MDA mostraron diferencias significativas entre las concentraciones a las cuales fueron expuestos los organismos ($F_s= 7,16$; $p<0,05$) y del período de exposición a FALUMV ($F_s= 12,27$; $p<0,05$). Se observó una disminución de los niveles de MDA en los organismos expuestos a los 7 y 13 días.



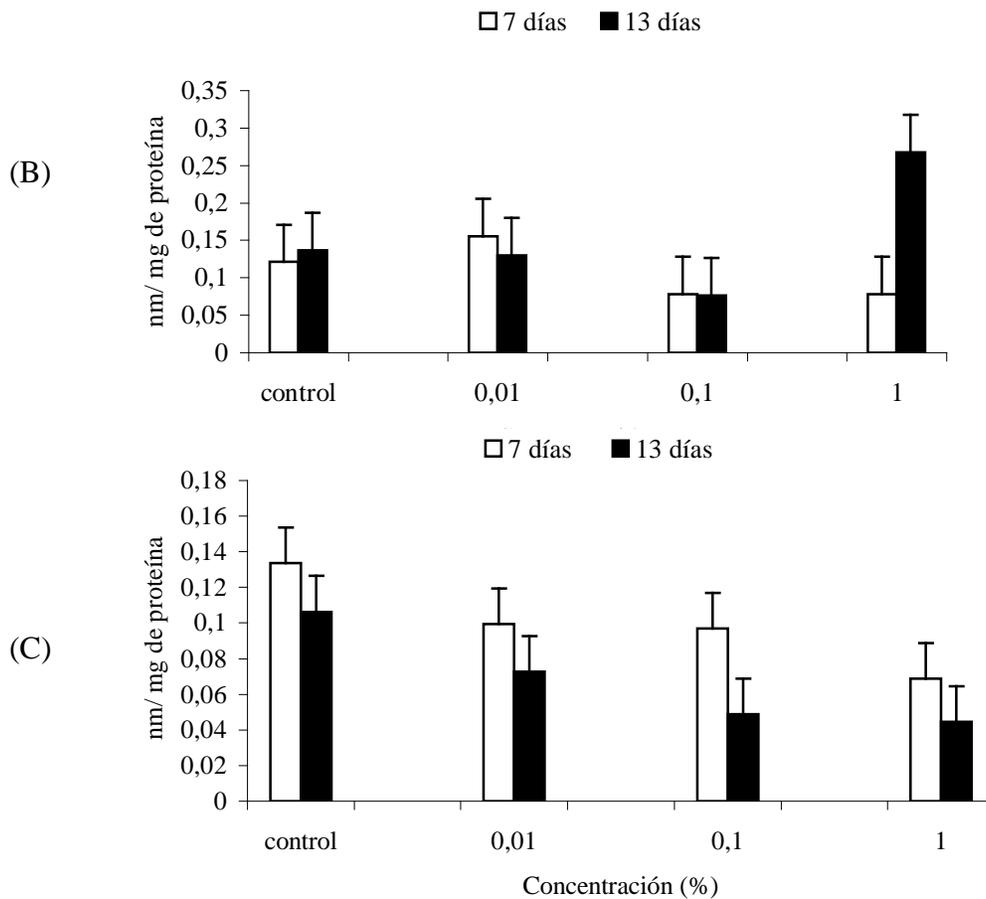


Figura 10. Niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteína) en la glándula, músculo y branquia de *L. scabra* (n=6) expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de FALUMV durante 7 y 13 días. (A) glándula, (B) músculo (C) branquia

Las barras representan las medias y la tendencia de la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Los ensayos citológicos e inmunológicos revelaron alteraciones en las principales líneas de defensa innatas de *L. scabra* expuesto a distintas concentraciones de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV). El aumento en el número total de células mostrado a las concentraciones más bajas, en el periodo agudo de exposición, pudiera sugerir la activación de mecanismos de respuesta celular a nivel sanguíneo, los mismos preparan fisiológicamente al organismos

para contrarrestar una posible situación de estrés químico. De forma indirecta, esta condición podría estimular a órganos hematopoyéticos para incrementar la producción de células sanguíneas. En contraste, la posterior disminución en el número total de hemocitos, a concentraciones elevadas de FALUMV, deja mostrar la concentración mínima y necesaria para inducir un efecto inmunosupresor durante el periodo de exposición crónico, haciéndose mas pronunciado a largo plazo.

La presencia de xenobióticos altamente tóxicos en la FALUMV, en especial hidrocarburos aromáticos y metales pesados, podría estar vinculada con la reducción drástica de la cantidad de hemocitos en organismos expuestos a 13 días, trayendo como consecuencia efectos negativos en las funciones del sistema inmunológico, incluyendo fagocitosis. La FALUMV, utilizada en este experimento, contiene una mezcla de xenobióticos orgánicos e inorgánicos potencialmente tóxicos (ATSRD, 1997; Nusetti *et al.*, 2005), los cuales pueden ser metabolizados mediante el ciclo redox celular, resultando en un incremento de las especies reactivas del oxígeno (EROs) u otros radicales libres (Di Giulio *et al.*, 1995; Zapata, 2001; Nusetti *et al.*, 2004).

La reducida viabilidad celular y actividad fagocítica mostrada en organismos expuestos a las concentraciones elevadas, durante el periodo crónico, puede indicar el inicio de la toxicidad a largo plazo, relacionado por la toxicidad directa de los xenobióticos que ingresan o su posterior metabolismo. En adicción, suponemos que la reducción en las defensas inmunológicas en organismos tratados podría estar asociada con cambios en la composición relativa hemocitos y/o fagocitos o a modificaciones moleculares en la capacidad de reconocer materiales extraños a través de mecanismos inmunes mediados por células (Zapata-Vívenes *et al.*, 2005). Resultados similares han sido reportados en el mejillón azul *Mytilus galloprovincialis* colectado en ambientes contaminados por hidrocarburos clorados y metales pesados (Pipe *et al.*, 1992).

La fagocitosis es normalmente activada por estímulos antigénicos tales como bacterias y otros agentes opsonizados, siendo un proceso sensible a metales pesados y otros contaminantes en organismos de distintas taxas (Goven *et al.*, 1994; Nusetti *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha conocido que la exposición aguda y/o crónica a sustancias orgánicas (PAHs, bifeniles policlorados, metales pesados, entre otros), ejercen efectos detrimentales sobre la capacidad fagocítica (Fournier *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002) y el número total de hemocitos (Sami *et al.*, 1992).. Algunos

trabajos como los realizados por Goven *et al.*, 1994, han reportados alteraciones en la capacidad fagocítica de los hemocitos expuestos a bifeniles clorados en *Lumbricus terrestris*. Adicionalmente, Marcano *et al.*, 1997 y Zapata-Vívenes *et al.*, 2005 reportaron una disminución de la actividad fagocítica de *E. complanata* expuesto a cobre.

El incremento de la actividad de lisozima en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesta a corto plazo a FALUMV deja mostrar un mecanismo de compensación humoral que permite incrementar las defensas bioquímicas frente antígenos externos. Este mecanismo de protección, cuando algunos parámetros inmune-celulares se encuentra suprimidos, ha sido descrito otros invertebrados marinos, tal es el caso del poliqueto *Eurythoe complanata* (Marcano *et al.*, 1997; Zapata-Vívenes *et al.*, 2005). Es conocido que lisozima es una enzima antimicrobiana la cual actúa sobre las uniones de los peptidoglicanos de la pared de ciertas bacterias y hongos, funcionando así como un componente innato que protege al organismo de bacterias en el ambiente y controla la flora simbiótica natural (Mc Henery *et al.*, 1979; Goven *et al.*, 1994).

El incremento de la actividad de las enzimas SOD y CAT en músculo y branquias de *L. scabra* expuesta a FALUMV sugiere una situación de incremento en la producción de oxirradicales, presumiblemente con aniones superóxidos y peróxidos, asociados con el metabolismo oxidativo y biotransformación de sustancias xenobióticas contentiva en FALUMV. Estas respuestas a nivel enzimático refleja la capacidad de defensa que poseen SOD y CAT frente a la presencia de EROs. Se conoce que estas dos enzimas actuando sinérgicamente remueven con gran eficacia a oxirradicales; SOD dismuta a el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y a su vez, CAT descompone al H_2O_2 en agua y oxígeno. Tales enzimas están localizadas en todos los compartimientos celulares susceptibles a estrés oxidativo (Wiston y Di Giulio, 1991; Fridovich, 1998).

Numerosas investigaciones han demostrado la activación del sistema de defensa antioxidante, especialmente SOD y CAT, en organismos contaminados con distintos xenobióticos orgánicos e inorgánicos. En tal contexto, Cheung *et al.* (2001) reportaron la inducción de las enzimas SOD y CAT en la branquias y glándula digestiva de *Perna viridis* expuesto a hidrocarburos aromáticos policíclicos durante 30 días. Manduzio *et al.* (2004) reportaron el incremento de la actividad de SOD en la branquia del mejillón *Mytilus edulis* colectado en áreas contaminadas por xenobióticos. Porte *et al.* (1991) y

Niyogi *et al.* (2001) reportaron la inducción de la actividad de CAT en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* y en la ostra *Saccostrea cuculata*, respectivamente.

La sobreproducción de peróxidos, a nivel celular, en organismos expuestos a la FALUMV es comprobada por la actividad incrementada de GPx en los distintos órganos evaluados. Tal síntesis se encuentra directamente relacionada con el metabolismo y biotransformación de xenobióticos. GPx es una Se-enzima localizada en el citosol y en la membrana mitocondrial interna, la misma reduce eficientemente a los peróxidos de lípidos a expensas de glutatona reducida como sustrato reductor (Di Giulio *et al.*, 1995; Nusetti y Zapata, 2005). El incremento de la actividad de GPx viene dada para llevar los niveles de peróxidos hasta concentraciones fisiológicamente aceptables y así evitar daños oxidativos en los tejidos. Su actividad es influenciada por los niveles de GSH y la actividad de GR (Manduzio *et al.*, 2004).

La incrementada actividad de GR en organismos expuestos refleja el papel crucial de esta enzima en la protección celular antioxidante, y su rol en el manteniendo los niveles de glutatona reducida (GSH) a concentraciones adecuadas para actuar como barredor de EROs (Di Giulio *et al.*, 1995; Doyotte *et al.*, 1997). GR contribuye al mantenimiento del balance GSSG-GSH (Doyotte *et al.*, 1997), jugando un papel importante junto a GPx, en la protección contra daños oxidativos (Sies, 1999). Diversas publicaciones sugieren su utilización de GPx y GR como marcadores de estrés oxidativo: Gómez (1998) reportó el aumento de la actividad de estas enzimas en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a cobre; metal de transición asociado con la inducción de estrés oxidativo mediante reacción de Fenton (Fridovick, 2001). Cheung *et al.* (2001) y Cheung *et al.* (2004) han reportado variaciones en la actividad de GPx en distintos órganos de *P. viridis* expuesto a benzo[a]pireno y aroclor 1254. Torres *et al.* (2002), mostraron un incremento en la actividad de GR en la glándula digestiva de *Mytela guayanensis* provenientes de mangles contaminados.

La elevada actividad GST encontrada en las branquias de organismos expuestos a las concentraciones de 0,01 y 0,1 % de FALUMV confirma la captación y subsiguiente eliminación de los compuestos xenobióticos presentes en la mezcla. GST está encargada de controlar la toxicidad de metabolitos electrofílicos derivados de la biotransformación de xenobióticos orgánicos y sustancias de desechos fisiológicos, los cuales son conjugados a GSH (Di Giulio *et al.*, 1995). Estos complejos

orgánicos se hacen más solubles y fácilmente excretables. La actividad de GST mayormente es detectada en el citosol y en la fracción microsomal y son susceptibles a ser inducidas por exposición a sustancias prooxidantes (Damien *et al.*, 2004; Manduzio *et al.*, 2004). El incremento de la actividad de esta enzima en presencia de contaminantes, en especial hidrocarburos, bifenilos clorados y pesticidas clorados, ha sido comúnmente reportado en mitílidos (Cheung *et al.* 2001; Cheung *et al.* 2002; Manduzio *et al.* 2004).

El aumento de los niveles de malondialdehído (MDA) en el músculo aductor registrado en organismos expuestos a FALUMV, a pesar de las actividades de GPX y GR, puede estar relacionado con la sobreproducción de EROs que podría estar desbalanciando al sistema de enzimas antioxidantes, específicamente CAT. Cuando se contrasta las magnitudes de las actividades máximas de todas las enzimas en el músculo se observan que son relativamente baja en comparación a la glándula digestiva y branquias. Posiblemente su trabajo netamente anaeróbico, motivan respuestas antioxidantes menos eficientes bajo condiciones aeróbicas. Contrariamente, los niveles de MDA en las branquias de *L. scabra* expuesto a FALUMV fue bajo, indicando que a pesar de que la mezcla contaminante está constituida de sustancias altamente oxidantes, el sistema de defensa antioxidante fue altamente efectivo contra la producción de oxirradicales, inducidos o no por xenobióticos, evitando así niveles elevados de peroxidación de los lípidos de membrana. Los niveles de MDA van a depender de las enzimas antioxidantes, las mismas pueden variar entre órganos, concentración y tiempo de exposición.

En este trabajo se evidencia la sensibilidad de las respuestas inmunológicas y antioxidantes-enzimáticas como marcadores ideales para determinar niveles de toxicidad de contaminantes usando a *L. scabra*. En síntesis, los parámetros determinados tanto en hemolinfa como en los distintos órganos del bivalvo *L. scabra* demuestran su sensibilidad como biomarcadores en presencia de dosis subletales de mezclas de xenobióticos, y sugieren su posible uso para estimar ambientes impactados por contaminación química.

CONCLUSIÓN

La exposición del bivalvo *L. scabra* a concentraciones subletales de FALUMV reflejó alteraciones en las respuestas inmunológicas y bioquímicas, inducidas por acción directa de la mezcla de xenobióticos o los posibles agentes prooxidantes que resultan de su metabolización de los contaminante.

El sistema de defensa antioxidante fue altamente efectivo en la glándula digestiva y branquias de *L. scabra*, mecanismos de defensa inducibles en presencia de altas concentraciones de EROs; mientras que en el músculo, los niveles de MDA reflejaron una condición de daño oxidativo.

La sensibilidad de los biomarcadores, tanto inmunológicos como sistema de defensa antioxidantes evaluados, en *L. scabra* siguieren ser eficaces señales en presencia de mezclas de xenobióticos, marcando diferencias significativas en el tiempo de exposición y dosis de los contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

Adema, C.; Van der Knapp, W. y Sminia, T. 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquatic. Sci.*, 4: 201-223.

- Anderson, D.; Paynter, K. y Burreson, E. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.*, 183: 476-481.
- Anderson, R.; Mora, L. y Thomson, S. 1999. Modulation of oyster *Crassostrea virginica* hemocyte function by copper, as measured by luminal-enhanced chemiluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108: 215-220.
- ATSRD. 1997. Used mineral-based crankcase oil CAS # 8002-05-9. Agency for toxic substances and disease registry ToxFAQs. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service in Atlanta, GA.
- Beaven, A. y Paynter, K. 1999. Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. *Biol. Bull.*, 196: 26-33.
- Brousseau, P.; Pellerin, J.; Morin, Y.; Cyr, D.; Blakey, B.; Boermans, H. y Fournier, M. 2000. Flow cytometry as a tool to demonstrate the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology*, 142: 145-156.
- Cadenas, E.; Kelving, J. y Davies, A. 2000. Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging, free radical. *Biol. Med.*, 29: 222-230.
- Cajaraville, M.; Bebianno, M.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. y Viarengo, A. 2000. The use of biomarker to assess the impact of pollution in coastal environment of the Iberian Peninsula. A practical approach. *Sci. Total Environ.*, 247: 295-311.
- Canesi, L.; Viarengo, A.; Leonzio, C.; Filippelli, M. y Gallo, G. 1999. Heavy metal and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.*, 46: 67-69.
- Cheng, T. 1988. In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanism of *Crassostrea virginica*: total and differential haemocyte counts. *J. Invert. Pathol.*, 51: 207-214.
- Cheung, C.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollu. Bull.*, 45: 181-191.
- Cheung, C.; Zheng, G.; Li, A.; Richardson, B. y 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.; Siu, W.; Richardson, B.; De Luca-Abott, S. y Lam, P. 2004. Antioxidant responses to benzo(a)pyrene and aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollu.*, 128: 393-403.

- Coles, J.; Fairly, S. y Pipe, R. 1994. The effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *J. Aquatic. Toxicol.*, 30: 367-379.
- Coles, J.; Fairly, S. y Pipe, R. 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Rg.*, 22:59-65.
- Cossu, C.; Doyotte, A.; Babut, M.; Exinger, A. y Vasseur, P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45: 106-121.
- Damián, G.; His, E.; Gnassia-Bareli, M.; Quiniou, F. y Romeo, M. 2004. Evaluation of biomarker in oyster larvae in natural and polluted condition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138: 121-128.
- De Almeida, E.; Dias, A.; De Melo, A.; Martínez, G.; Miyamoto, S.; Onuki, J.; Fujita, L.; Carriao, C.; Manso, F.; Ronsein, G.; Sigolo, C.; Barbosa, C.; Gracioso, A.; Gennari, M. y Di Masio, P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidant, lipid peroxidation and DNA damage. *Rev. Comp. Biochem and Physiol.*, 146: 588-600.
- Di Giulio, R.; Benson, W.; Sander, B. y Vanveld, P. 1995. Biochemical mechanism: metabolism, adaptation and toxicity. En: Rand, G. (eds). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Second edition. Págs: 223-255.
- Di Giulio, R.; Washburn, P.; Wenning, R.; Winston, G. y Jewell, C. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1103-1123.
- Doyotte, A.; Cossu, C.; Lacquin, M. ; Babut, M. y Vasseur, P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.*, 39: 93-110.
- Dyrynda, E.; Law, R.; Dyrynda, P., Kelly, C.; Pipe, R. y Ratcliffe, N. 2000. Changes in immune parameter of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('sea Empress', Wales, UK). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 200: 155-170.
- Fisher, W.; Oliver, L.; Walker, W.; Manning, C. y Lytle, T. 1999. Decrease resistance of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide. *Mar. Environ. Res.*, 47: 185-201.

- Fisher, W.; Oliver, L.; Winstead, J. y Long, E. 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminants burdens. *Aquat. Toxicol.*, 51: 115-138.
- Fournier, M.; Cyr, D.; Blakey, B.; Boermans, H. y Brousseau, P. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist*, 40: 412-420.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/UNEP). 1993. Joint group of experts on the scientific aspects on marine pollution. Impact of oil and related chemical and wastes on the marine environment. GESAMP Reports and Studies N^o. 50, London, International Maritime Organization.
- Gómez, J. 1998. Efectos de la toxicidad del cobre y cadmio en una población natural del bivalvo *Lima scabra* (Born, 1778): aspectos genéticos, bioquímicos y reproductivos. Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Goven, A.; Fitzpatrick, L. y Venable, B. 1994. Chemical toxicity and host defence in earthworm. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 712: 280-299.
- Goven, A. y Kennedy 1996. Environmental pollution and toxicity in invertebrates: an earthworm model for immunotoxicology. *Adv. Comp. Biochem. Environ. Physiol.* 24: 169-211.
- Hellou, J.; Warren, W.; Andrews, G.; Mercer, G.; Payne, J. y Howse, D. 1997. Long-term fate of crankcase oil in rainbow trout: A time-and dose-response study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1295-1303.
- Hermes-Lima, M. y Zenteno-Savin, T. 2004. Animal responses to drastic changes in oxygen. Availability and physiological oxidative stresses. *Comp. Biochem Physiol.*, 133: 537-556.
- Klein, C.; Frenkel, K. y Costa, M. 1991. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 592-604.
- Livingsstone, D. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42 (8): 656-666.

- Livingsstone, D.; Garcia-Martinez, M.; Narbonne, J.; 1990. Oxyradical generation as a pollutant-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Funct. Ecol.*, 4: 415-424.
- Lodeiros, C.; Martin, B y Prieto, A. 1999. *Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalvia*. Editorial APUDONS. Universidad de Oriente. Cumaná.
- López, C.; Carballal, M.; Azevedo, C. y Villalba, A. 1997. Morphological characterization of the hemocytes of the clam *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.*, 69: 51-57.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Manduzio, H.; Monsinjon, T.; Galap, C.; Leboulenger, F. y Rocher, B. 2004. Seasonal variations in antioxidant defenses in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/ Zn-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. *Aquat. Toxicol.*, 70: 83-93.
- Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodriguez- Grau, J. y Vila, J. 1997. Celomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 22-28.
- Marigómez, I.; Soto, M.; Cancio, I. y Cajaraville, M. 2004. Biomonitoring of environmental pollution in the Basque coast using molecular, cellular and tissue-level biomarkers. An integrative approach. En: *Oceanography and marine environment of the Basque Country*. Borja, A. y Colling, M. Elsevier oceanography series number 70, Elsevier, Amsterdam. Págs.: 335-364.
- Martínez, G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos superficiales del golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanograf. Univ. Oriente.*, 41: 83-93.
- Martins, C. 2004. Acumulación y depuración del cadmio en relación con el perfil de enlace a metaloproteínas en el hepatopancreas del bivalvo *Lima scabra*. Tesis de post- grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Mc Henery, J.; Birbeck, T. y Allen, J. 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63: 25-28.

- Mozeto, A. y Zagatto, P. 2006. Introducción de ambientes químicos no ambientes. En: *Ecotoxicología acuática: principios y aplicaciones*. Zagatto, P. y Bertolotti, E. (eds). Rima Editora, Sao Pablo, Brasil, págs: 15-38.
- Nascimento, E. 2006. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformación. En: *Ecotoxicología acuática: principios y aplicaciones*. Zagatto, P. y Bertolotti, E. (eds). Rima Editora, Sao Pablo, Brasil, págs: 50-75.
- Ngabe, B.; Bidleman, T. y Scott, G. 2000. Polycyclic hydrocarbon in storm runoff from urban and coastal South Caroline. *Sci. Total. Environ.*, 225: 1-9.
- Nicholson, S. 2003. Lysosomal membrane, stability phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal cooper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.
- Niyogi, S.; Biswas, S.; Sarker, S. y Datta, A. 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci. Total Environ.*, 281: 237-246.
- Nusetti, O.; Salazar-Lugo, R.; Rodríguez-Grau, J. y Vilas, J. 1998. Immune y biochemical responses of the polychaeta *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of cooper. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 177-183.
- Nusetti, O.; Marcano, L., Zapata-Vivenes, E.; Esclapés, M.; Nusetti, S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil n° 06. *Interciencia*, 29 (6): 324-328.
- Nusetti, O.; Zapata-Vivenes, E.; Escaplès, M. y Rojas, A. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomididae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 1-6.
- Nusetti, O. y Zapata-Vivenes, E. 2005. Producción de oxiradicales en animales: Modulación por temperatura, oxigenación y contaminantes. Defensas antioxidantes.: *Fundamentos y técnicas de ecofisiología oxidativa en organismos acuáticos*, págs: 850-896.
- Orbea, A.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Solé, M.; Porte, C. y Cajaraville, M. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCB_S in bivalve

- molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscary). *Aquatic Toxicol.*, 58: 75-98.
- Oliver, L. y Fisher, W. 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarker. *Biomarker*, 4: 510-530.
- Pacifici, R. y Davies, K. 1991. Protein, lipid and ADN repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37: 166-180.
- Pipe, R. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 111-122.
- Pipe, R.; Coles, F. y Ramanathan, K. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, 46: 46-54.
- Porte, C.; Solé, M.; Albaiges, J. y Livingstone, D. 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. To organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 183-186.
- Porte, C.; Sole, M.; Alborges, J. y Livingstone, D. 2001. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comp. Biochem Physiol.*, 100: 183-186.
- Pruell, R. y Quinn, J. 1988. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crankcase oil. *Environ. Poll.*, 49: 89-97.
- Rand, G. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate and risk assessment*. Segunda edición, Taylor y Francis Publisher. Washington DC.
- Rewrantz, L. 1990. Internal defense of *Mytilus edulis*. En: *Studies in Neuroscience Neurobiology of Mytilus edulis*. Stefano, G. (ed), Manchester University Press, Manchester. Págs: 256-275.
- Rivera, D.; Narboone, J.; Michel, X.; Livingstone, D. y O' Hara, S. 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 177-181.
- Richardson, B. y Zheng, G. 1999. Chlorinated hydrocarbon contaminant in Hong Kong superficial sediments. *Chemosphere*, 39: 913-923.

- Sami, S.; Faisal, M. y Huggett, R. 1992. Alterations in cytometric characteristics of haemocytes from American oyster *Crassostrea virginica* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated environment. *Mar. Biol. Berl.*, 113: 247-252.
- Sauvé, S.; Brousseau, P.; Pellerin, J.; Marin, Y.; Senècal, L.; Goudreau, P. y Fournier, M. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.*, 58: 189-200.
- Sarkar, A.; Ray, D.; Amulya, N. y Shivastava. 2006. Molecular biomarker: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 45: 1160-1167.
- Sies, H. 1988. Oxidative stress quinone redox cycling. ISI Atlas of the science. *Biochemistry*, 1: 109-114.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidants defence. *Eur. J. Biochem.*, 215: 213-239.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine.*, 27: 916-921.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1982. *Biometría*. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blumme Ediciones. Madrid.
- Sukhotin, A.; Abele, D. y Purtner, H. 2002. Growth, metabolism and peroxidacion in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 226: 223-234.
- Torres, M.; Testa, C.; Gaspar, C.; Masutti, M.; Panitz, C.; Pedrosa, R.; Almeida, E.; Di Mascio, y Filho, D. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island Brazil. *Mar. Poll. Bull.*, 44: 923-932.
- Viarengo, A.; Canesi, L.; Pertica, M.; Poli, G.; Moore, M. y Orunesu, M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97: 37-42.
- Winston, G. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 173-176.
- Winston, G. y Di Giulio, R. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.

- Zapata, E. 2001. Regeneración tisular y estrés oxidativo en el poliqueto *Eurythoe complanata* (*Polychaeta: Amphinomidae*) expuesto a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos. Trabajo de pre-grado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Zapata-Vivenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Escaplès, M. y Arredondo, L. 2005. Immunological responses and wound healing in the polychaeta *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) exposed to cooper. *Ciencias Marinas*, 31: 1-9.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de varianza para el número total de células (Número_{cél}/ml) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	9,4392	3	3,1464	3,11	0,0373
Días	1,56986	1	1,56986	15,51	0,0003
Interacciones					
Concentración-días	2,24837	3	7,49457	7,40	0,0005
Residuos	3,94761	39	1,01221		
Total (corregido)	9,24279	46			

Apéndice 2. Análisis de varianza para la viabilidad celular (%) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	80,5452	3	26,8484	0,64	0,5960
Días	55,0711	1	55,0711	1,31	0,2601
Interacciones					
Concentración-días	101,464	3	33,8213	0,80	0,5004
Residuos	1644,91	39	42,1771		
Total (corregido)	1903,28	46			

Apéndice 3. Análisis de varianza para la actividad fagocítica en la hemolinfa de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	7726,93	3	2575,64	2,66	0,0474
Días	1467,74	1	1467,74	1,52	0,3060
Interacciones					
Concentración-días					
Residuos	2905,53	3	968,51		
Total (corregido)	12100,2	7			

Apéndice 4. Análisis de varianza para la actividad de lisozima (Ug/ml) en la glándula del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	0,004734	3	0,001578	6,61	0,0010
Días	0,00220142	1	0,00220142	9,22	0,0043
Interacciones					
Concentración-días	0,00202078	3	0,000673593	2,82	0,0514
Residuos	0,00931256	39	0,000238783		
Total (corregido)	0,0183361	46			

Apéndice 5. Análisis de varianza de la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	11,6272	3	3,87573	1,62	0,2007
Días	1,22415	1	1,22415	0,51	0,4786
Interacciones					
Concentración-días	4,96856	3	1,65619	0,69	0,5620
Residuos	88,386	37	2,38881		
Total (corregido)	106,996	44			

Apéndice 6. Análisis de varianza de la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	14,346	3	4,78202	2,94	0,0458
Días	12,008	1	3,18561	2,01	0,9963
Interacciones					
Concentración-días	0,110144	3	0,0367146	0,09	0,9953
Residuos	60,2088	37	1,62705		
Total (corregido)	74,9688	44			

Apéndice 7. Análisis de varianza de la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	189,561	3	63,187	17,71	0,0001
Días	0,0294294	1	0,0294294	0,08	0,9415
Interacciones					
Concentración-días	0,148891	3	0,0496302	0,01	0,9988
Residuos	199,674	37	5,39659		
Total (corregido)	393,011	44			

Apéndice 8. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	168440,0	3	56146,8	4,72	0,0069
Días	1,90063	1	1,90063	159,85	0,0000
Interacciones					
Concentración-días	105390,0	3	35130,2	2,95	0,0450
Residuos	439946,0	37	11890,4		
Total (corregido)	2,500626	44			

Apéndice 9. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	30495,4	3	10165,1	2,52	0,0732
Días	128907,0	1	128907,0	31,90	0,0000
Interacciones					
Concentración-días	23488,9	3	7829,63	1,94	0,1404
Residuos	149513,0	37	4040,89		
<hr/>					
Total (corregido)	314623,0	44			

Apéndice 10. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	252424,0	3	84141,3	4,28	0,0109
Días	484210,0	1	484210,0	24,61	0,0000
Interacciones					
Concentración-días	2501070,0	3	83369,0	4,24	0,0114
Residuos	727947,0	37	19674,2		
<hr/>					
Total (corregido)	1,757266	44			

Apéndice 11. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	36695,1	1	36695,1	0,82	0,3713
Días	74137,4	3	24712,5	0,55	0,6502
Interacciones					
Concentración-días	6847510,0	3	228250,0	5,10	0,0047
Residuos	1,65746	37	44796,3		
Total (corregido)	2,413086	44			

Apéndice 12. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	2,939996	3	979995,0	58,60	0,0000
Días	1167,64	1	1167,64	0,07	0,7931
Interacciones					
Concentración-días	5237,37	3	1745,79	0,10	0,9570
Residuos	618764,0	37	16723,3		
Total (corregido)	3,573826	44			

Apéndice 13. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	2,270096	3	756696,0	3,20	0,0342
Días	579674,0	1	579674,0	2,45	0,1257
Interacciones					
Concentración-días	743827,0	3	24792,0	1,05	0,3821
Residuos	8,739376	37	236199,0		
Total (corregido)	1,235217	44			

Apéndice 14. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona-s-transferasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	1,019946	3	339981,0	1,74	0,1762
Días	382772,0	1	382772,0	1,96	0,1702
Interacciones					
Concentración-días	601013,0	3	200338,0	1,02	0,3932
Residuos	7,239576	37	195664,0		
Total (corregido)	9,240866	44			

Apéndice 15. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	145736,0	3	48578,6	2,25	0,0992
Días	1488,31	1	1488,31	0,07	0,7946
Interacciones					
Concentración-días	270,546	3	90,182	0,01	0,9996
Residuos	800438,0	37	21633,5		
Total (corregido)	948529,0	44			

Apéndice 16. Análisis de varianza de la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	2,270976	3	756989,0	29,09	0,0000
Días	413,731	1	413,731	0,02	0,9003
Interacciones					
Concentración-días	3448,33	3	1149,44	0,04	0,9875
Residuos	9622904,0	37	26024,4		
Total (corregido)	3,25936	44			

Apéndice 17. Análisis de varianza de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	187550,0	3	62516,7	0,53	0,6677
Días	67120,4	1	67120,4	0,56	0,4575
Interacciones					
Concentración-días	1,252426	3	417472,0	3,51	0,0246
Residuos	4,404966	37	119053,0		
Total (corregido)	5,896526	44			

Apéndice 18. Análisis de varianza de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	38159,7	3	12719,9	9,61	0,0001
Días	143,874	1	143,874	0,11	0,7435
Interacciones					
Concentración-días	15066,2	3	5022,05	3,79	0,0181
Residuos	48972,8	37	1323,59		
Total (corregido)	107388,0	44			

Apéndice 19. Análisis de varianza de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	7379,38	3	2459,79	1,52	0,2261
Días	4744,04	1	4744,04	2,93	0,0955
Interacciones					
Concentración-días	5423,96	3	1807,99	1,12	0,3553
Residuos	59982,2	37	1621,14		
Total (corregido)	79177,3	44			

Apéndice 20. Análisis de varianza de los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg proteína) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	0,0462832	3	0,0154277	1,93	0,1419
Días	0,0723067	1	0,0723067	9,04	0,0047
Interacciones					
Concentración-días	0,0192831	3	0,00642772	0,80	0,4999
Residuos	0,295992	37	0,00799978		
Total (corregido)	0,441366	44			

Apéndice 21. Análisis de varianza de los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg proteína) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

Efectos principales					
Concentración	0,0319438	3	0,0106479	2,62	0,0448
Días	0,0081923	1	0,0081923	2,02	0,1637
Interacciones					
Concentración-días	0,0312301	3	0,01041	2,57	0,0692
Residuos	0,150108	37	0,00405697		
<hr/>					
Total (corregido)	0,215905	44			

Apéndice 22. Análisis de varianza de los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg proteína) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Concentración	0,0418468	3	0,0139489	7,16	0,0007
Días	0,0238907	1	0,0238907	12,27	0,0012
Interacciones					
Concentración-días	0,00261971	3	0,000873235	0,45	0,7198
Residuos	0,0720399	37	0,00194702		
<hr/>					
Total (corregido)	0,140744	44			

Apéndice 23. Contraste múltiple de rango para el número total de células (Número cél/ml) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
---------------------------------	-----------	----------	-----------	-----------

1	10	185156,0	32471,3	
0,1	12	257083,0	29043,2	
0,01	13	278854,0	27986,7	
Control	12	315851,0	29455,2	

Apéndice 24.
Contraste múltiple de rango para la viabilidad celular (%) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y

13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
1	10	89,2917	2,09606	
Control	12	92,2429	1,90136	
0,1	12	92,25	1,87477	
0,01	13	92,8929	1,80657	

Apéndice 25.
Contraste múltiple de rango para la actividad fagocítica (%) en la hemolinfa de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR:

porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
1	2	60,32	22,0058	
0,1	2	99,5	22,0057	
Control	2	100,0	22,0058	
0,01	2	148,0	28,7458	

Apéndice 26.
Contraste múltiple de rango para la actividad de lisozima (Ug/ml) en la glándula del bivalvo *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR:

porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	12	10,0229	0,00452406	
0,01	13	10,0274	0,0429852	

1	10	10,0379	0,00408731	
0,1	12	10,0487	0,00446079	

Apéndice 27.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de superóxido

dismutasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	1,34997	0,467947	
1	10	1,44716	0,498833	
0,01	12	2,0445	0,44617	
0,1	12	2,61343	0,44617	

Apéndice 28.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores

de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	0,763231	0,386194	
1	10	0,819797	0,386194	
0,1	12	1,8266	0,368222	
0,01	12	2,01286	0,368222	

Apéndice 29.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores

de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	0,35131	0,70334	
0,01	12	0,513331	0,670609	

0,1	12	2,75966	0,670609		Apéndice 30. Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona peroxidasa
1	10	5,65186	0,749463		

(U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH	Apéndice 31. Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en el músculo de <i>L. scabra</i> expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos
0,1	12	209,029	31,4781		
0,01	12	332,703	31,4781		
Control	11	350,412	33,0145		
1	10	358,011	35,1936		

durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH	Apéndice 32. Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en la branquia de <i>L. scabra</i> expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores
0,1	12	61,825	18,3505		
0,01	12	91,7312	18,3505		
Control	11	123,586	19,2462		
1	10	125,396	20,5165		

de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,01	12	86,5018	40,491	
1	10	107,703	45,2703	
Control	11	157,679	42,4673	

0,1	12	275,935	40,491
-----	----	---------	--------

Apéndice 33.
Contraste múltiple

de rango de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,1	12	566,039	61,0985	
Control	11	630,742	64,0806	
0,01	12	642,93	61,0985	
1	10	679,386	68,3102	

Apéndice 34.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos

durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,01	12	157,329	37,3311	
Control	11	199,826	39,1532	
1	10	673,75	41,7375	
0,1	12	703,862	37,3311	

Apéndice 35.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos

durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	396,366	147,145	
0,01	12	473,978	140,297	
1	10	606,039	156,857	
0,1	12	969,659	140,297	

Apéndice 36.
Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados

de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
1	10	984,123	142,764	
0,1	12	1205,64	127,692	
0,01	12	1221,0	127,692	
Control	11	1430,57	133,925	

Apéndice 37. Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutationa-S-transferasa (U/g.m.h) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores

de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,1	12	548,958	42,4593	
1	10	639,048	47,4709	
Control	11	660,124	44,5316	
0,01	12	699,499	42,4593	

Apéndice 38. Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de glutationa-S-transferasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos

durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	682,771	48,8423	
1	10	860,839	52,0661	
0,1	12	1086,18	46,5693	
0,01	12	1274,33	46,5693	

Apéndice 39.

Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
Control	11	795,266	96,0259	
0,01	12	801,35	99,6046	
0,1	12	868,4	99,6046	
1	10	963,081	111,364	

Apéndice 40.

Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días.

PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
1	10	47,2398	11,742	
0,1	12	77,7856	10,5023	
Control	11	90,2842	11,0149	
0,01	12	129,781	10,5023	

Apéndice 41.

Contraste múltiple de rango de la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días.

PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,1	12	28,7611	11,263	
0,01	12	36,35	11,623	
Control	11	54,325	12,1904	
1	10	60,8556	12,995	

Apéndice 42.

Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteína) en la glándula digestiva de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la

fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos

homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,1	12	0,148456	0,0288671	
1	10	0,152909	0,0288671	
0,01	12	0,160622	0,0258195	
Control	11	0,22303	0,0270798	

Apéndice 43. Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteína) en el músculo de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes

usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
0,1	12	0,0774599	0,018387	
Control	11	0,128966	0,018387	
0,01	12	0,138122	0,0205573	
1	10	0,142777	0,018387	

Apéndice 44. Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/mg de proteína) en la branquia de *L. scabra* expuesto a 0,01, 0,1 y 1% de la fracción acuosa de lubricantes

usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
1	10	0,0466933	0,0142413	
0,1	12	0,062714	0,0127378	
0,01	12	0,0860714	0,0127378	
Control	11	0,130079	0,0133895	

Apéndice 45. Contraste múltiple de rango para el número total de células (Número cél/ml) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de

lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
----------------	----	---	----	----

13 días	21	200578,0	22261,2	
7 días	26	317879,0	19789,6	

Apéndice 46. Contraste múltiple de rango para la viabilidad celular (%) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	2	90,5708	1,43698	
7 días	26	92,7679	1,27744	

Apéndice 47. Contraste múltiple de rango para la actividad fagocítica (%) en la hemolinfa del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	4	88,41	15,5604	
7 días	4	115,5	15,5604	

Apéndice 48. Contraste múltiple de rango para la actividad de lisozima (Ug/ml) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	21	10,0273	0,00341913	
13 días	26	10,0412	0,0030395	

Apéndice 49. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	1,69723	0,31549	

13 días	21	2,0303	0,341983
---------	----	--------	----------

Apéndice 50. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en el músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	1,35472	0,282237	
7 días	24	1,35652	0,260372	

Apéndice 51. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	2,29319	0,474192	
13 días	21	2,34489	0,514012	

Apéndice 52. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de superóxido dismutasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	105,027	22,2584	
13 días	21	520,05	24,1275	

Apéndice 53. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en el músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	46,5932	12,9758	
13 días	21	154,678	14,0654	

Apéndice 54. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona peroxidasa (U/g.m.h) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	52,2151	28,6315	
13 días	21	261,694	31,0358	

Apéndice 55. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	600,941	43,2032	
13 días	21	658,608	46,8311	

Apéndice 56. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en el músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	428,548	26,3971	
13 días	21	438,835	28,6138	

Apéndice 57. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona reductasa (U/g.m.h) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	496,91	107,536	
7 días	24	726,111	99,205	

Apéndice 58. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de

motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	1117,21	90,2921	
13 días	21	1303,46	97,8743	

Apéndice 59. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en el músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	631,1	32,5444	
7 días	24	642,714	30,0232	

Apéndice 60. . Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de glutatona-S-transferasa (U/g.m.h) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	972,968	35,6947	
7 días	24	979,091	32,9295	

Apéndice 61. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	818,028	76,3455	
7 días	24	896,02	70,4311	

Apéndice 62. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en el músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH

7 días	24	84,4806	7,42628
13 días	21	88,0915	8,04989

Apéndice 63. Contraste múltiple de rango para la actividad máxima de catalasa (U/g.m.h) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	34,7056	8,90889	
7 días	24	55,4403	8,21873	

Apéndice 64. Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehido (nmoles de MDA/ mg de proteína) en la glándula digestiva del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	0,132098	0,0197903	
7 días	24	0,213047	0,0182526	

Apéndice 65. Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehido (nmoles de MDA/ mg de proteína) en músculo del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
7 días	24	0,108207	0,0130016	
13 días	21	0,135455	0,0140934	

Apéndice 66. Contraste múltiple de rango para los niveles de malondialdehido (nmoles de MDA/ mg de proteína) en la branquia del bivalvo *L. scabra* expuesto a concentraciones subletales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos durante 7 y 13 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (Dosis)	PR	X	DE	GH
13 días	21	818,028	76,3455	
7 días	24	896,02	70,4311	

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten <i>lima scabra</i> (born, 1778) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Sánchez Rojas, Gabriela María	CVLAC
e-mail		gavi.1983@hotmail.com
e-mail		gmsrr5@gmail.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biomarcadores
<i>Lima scabra</i>
Inmunotoxicidad
Estrés Oxidativo
Enzimas Antioxidantes.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOLOGÍA
	BIOQUÍMICA
	ECOTOXICOLOGÍA

Resumen (abstract):

Se evaluaron los parámetros citológicos (contaje y viabilidad celular), las respuestas inmunológicas (fagocitosis y lisozima) en la hemolinfa y glándula digestiva de *Lima scabra*, actividades máximas de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) glutaciona peroxidasa (GPx), glutaciona reductasa (GR), glutaciona-S-transferasa (GST) y niveles de malondialdehído (MDA) como indicador de daño oxidativo en glándula digestiva, músculo y branquia de *Lima scabra*, después de ser expuestos a concentraciones subletales (0,01; 0,1 y 1 %) de una fracción acuosa de uso de motores de vehículos (FALUMV) durante 7 (período agudo) y 13 días (período crónico). Los resultados mostraron diferencias significativas en el conteo celular, actividad fagocítica y actividad de lisozima en ambos periodos de exposición a FALUMV. La actividad de SOD varió significativamente en el músculo y branquia; la actividad de GPx aumentó significativamente en la glándula, músculo y branquia en el período crónico; la actividad de GR varió significativamente en músculo y branquia en ambos períodos de exposición; la actividad de GST varió significativamente en la branquia en ambos periodos de exposición y la actividad de CAT varió significativamente en el músculo. Los niveles de MDA disminuyeron significativamente en la glándula digestiva y branquia; mientras que en el músculo incrementaron los niveles en el período crónico a la mayor concentración. El aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GR, GST, CAT) en los diferentes órganos, indica que se desencadenaron mecanismos de respuesta compensatorios ante el desarrollo de alteraciones en los sistemas en el organismo, asociado con la producción de (EROs). El descenso en los niveles de MDA en la glándula digestiva y branquia indican que la activación de los mecanismos antioxidantes fueron suficientes para contrarrestar el efecto del contaminante sobre las membranas celulares en ambos tejidos; mientras que el incremento en los niveles de MDA en el músculo indica que los mecanismos activados no fueron suficientes para contrarrestar el efecto del contaminante sobre las membranas celulares. En síntesis, los parámetros inmunológicos y bioquímicos determinados en *L. scabra* demuestran su sensibilidad como marcadores biológicos en presencia de dosis subletales de mezclas de xenobióticos, y sugieren su posible uso para estimar ambientes impactados por contaminación química.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Zapata- Vívenes, Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12 269 219
	e-mail	edzapata2002@yahoo.com
	e-mail	
Nusetti, Osmar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	684 534
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	
Lemus, Mairin	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	mlemus@gmail.com
	e-mail	
Salazar, Raquel	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	Raquelugo@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	10	27

Lenguaje: Esp

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_GMSR	Application de word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio:

BIOLOGÍA

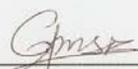
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

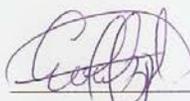
UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

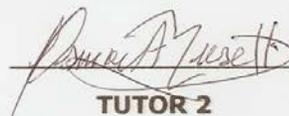
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

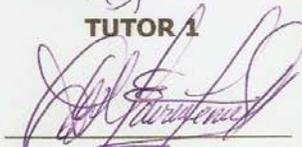
Derechos:

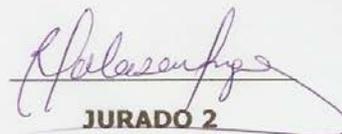
**Se reservan los derechos del autor, este trabajo todavía no ha sido
Publicado, solo puede ser utilizado el resumen del mismo.**


AUTOR


TUTOR 1


TUTOR 2


JURADO 1


JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



