

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
COORDINACIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS
PROGRAMA DOCTORAL**



***Eurythoe complanata* Pallas 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE)
COMO ORGANISMO SENSOR DE CONTAMINACIÓN EN COSTAS DEL
ESTADO SUCRE, VENEZUELA**

M. Sc. Édgar Alexander Zapata Vívenes

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

Cumaná, 2012

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
COORDINACIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS
PROGRAMA DOCTORAL



***Eurythoe complanata* Pallas 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE)
COMO ORGANISMO SENSOR DE CONTAMINACIÓN EN COSTAS DEL
ESTADO SUCRE, VENEZUELA**

M. Sc. Édgar Alexánder Zapata Vívenes

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

Cumaná, 2012

Eurythoe complanata Pallas 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE) COMO
ORGANISMO SENSOR DE CONTAMINACIÓN EN COSTAS DEL ESTADO SUCRE,
VENEZUELA.

ASESOR ACADÉMICO

Dr. Osmar Nusetti

Jurado Principal
Dra. Lya Neuberger

Jurado Principal
Dr. José García

Jurado Principal
Dra. Mairín Lemus

Jurado Principal
Dr. Manuel Correa

PRÓLOGO

En las costas del estado Sucre han incrementado significativamente los niveles de contaminantes metálicos en los ecosistemas marino-costeros, especialmente en sedimentos, valores que posiblemente se encuentren asociados a procesos de industrialización, tráfico marítimo, explotación minera y gasífera, y otras actividades antropogénicas. Por tal motivo se hace imprescindible realizar evaluaciones ecotoxicológicas en organismos representativos de nuestros sistemas ecológicos, con el fin de establecer los efectos que pueden causar dosis no letales de xenobióticos, especialmente metales pesados, a la biota circundante.

Los arrecifes coralinos son altamente sensibles a xenobióticos y cambios de variables ambientales, inclusive la fauna asociada a tales ecosistemas está propensa a ser afectada por diversos contaminantes de distinta naturaleza química, y por ende alterar mecanismos de defensa de primera línea, tales como el sistema de protección antioxidante, respuestas inmunológicas, síntesis de macromoléculas, entre otros. En la actualidad existen pocos estudios basales relacionados con el estatus fisiológico y bioquímico de las defensas contra xenobióticos en especies consideradas centinelas de contaminación en costas Venezolanas.

Esta investigación se fundamenta en el uso y aplicación de distintos marcadores biológicos, sensibles a xenobióticos, en el poliqueto *Eurythoe complanata*, los cuales proveen información sobre los posibles efectos que suscitan a distintos niveles de organización biológica. El presente trabajo está compuesto por seis (6) capítulos separados de la siguiente manera: en el capítulo I, se presenta una introducción general; los capítulos II, III, IV y V, muestran la variabilidad de las respuestas antioxidantes, parámetros bioquímicos y celulares en presencia de estresores químicos, físicos, estacionalidad, exposición a xenobióticos, y por último, la aplicación de tales biomarcadores en estudios de campo con la finalidad de evaluar dos zonas arrecifales localizadas en costas del estado Sucre. Finalmente las conclusiones y recomendaciones (CAPÍTULO VI).

INDICE GENERAL

<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>i</u>
<u>AGRADECIMIENTOS.....</u>	<u>ii</u>
<u>LISTA DE TABLAS.....</u>	<u>iii</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>iv</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>ix</u>
<u>CAPITULO I.....</u>	<u>1</u>
<u>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</u>	<u>1</u>
<u>CAPITULO II.....</u>	<u>9</u>
<u>RESPUESTAS ANTIOXIDANTES EN EL POLIQUETO Eurythoe complanata (Pallas, 1766) (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE) EN PRESENCIA DE CONTAMINANTES.....</u>	<u>9</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>10</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>11</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>15</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>21</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>33</u>
<u>CAPITULO III.....</u>	<u>39</u>
<u>INMUNOTOXICIDAD, RESPUESTAS CELULARES E ÍNDICES MOLECULARES DE CRECIMIENTO EN E. complanata Pallas, 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE) EN PRESENCIA DE CONTAMINANTES..</u>	<u>39</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>40</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>41</u>

<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>45</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>49</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>54</u>
<u>CAPITULO IV.....</u>	<u>60</u>
<u>VARIACIÓN ESTACIONAL EN LAS RESPUESTAS ANTIOXIDANTES Y PARÁMETROS MOLECULARES DE CRECIMIENTO EN <i>Eurythoe complanata</i> Pallas, 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE).....</u>	<u>60</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>61</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>62</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>66</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>68</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>76</u>
<u>RESUMEN.....</u>	<u>83</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>84</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>87</u>
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>90</u>
<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>98</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>105</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>107</u>
<u>HOJA DE METADATOS.....</u>	<u>132</u>

DEDICATORIA

Por mi hija Ámbar Amixed,

Te amo...

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por seguir iluminando mi vida y darme fortaleza para saltar obstáculos.
- Al Prof. Osmar Nusetti, agradezco la confianza que me brindó para lograr este proyecto, a usted le debo toda mi formación académica.
- A los trabajadores de la Estación Hidrobiológica de Turpialito e Instituto Oceanográfico de Venezuela por la ayuda prestada en la colecta de los organismos y el traslado del agua de mar.
- Al Br. Miguel Covo, Vladimir Gonzales, Prof. Ángel Fariña y Lcdo. Adrian Márquez por su colaboración en la colecta de los organismos.
- Al Lic. José Luis Prin (IICAB) por su colaboración prestada en los análisis de metales pesados.
- Al Prof. Luis Arredondo por su atenta colaboración.
- A la M. Sc. Jeny Reyes por su ayuda incondicional en los muestreos y transferencia de datos.
- A mi familia, a mi esposa Exima Chirinos y a mis hijos, Enmanuel y Ámbar, los amo.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Estimaciones de las concentraciones letales medias (LC50) a 96 horas, usando a <i>E. complanata</i> expuestos a distintos xenobióticos. † Contaminante mezclados en el sedimento; * Contaminante disuelto en agua de mar.....	8
TABLA 2. Niveles de cadmio en distintas porciones corporales de <i>E. complanata</i> expuestos a contaminantes. Los datos se expresan en µg de Cd por gramo de tejido seco. Se denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas al 95 % de confianza con respecto a su porción en los organismos controles.....	24
TABLA 3. Niveles de metales pesados (Zn, Cu, Pb y Cr) en distintas porciones corporales de <i>E. complanata</i> expuestos a contaminantes. Los datos se expresan en microgramos (µg) de metal por gramo de tejido seco. Se denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas al 95 % de confianza con respecto a su porción en los organismos controles.....	25
TABLA 4. Porcentaje de regeneración y número de segmentos (anteriores y posteriores) en <i>E. complanata</i> colectados en los distintos meses. El asterisco (*) muestra diferencias significativas al 95 % de confianza.....	75
TABLA 5. Coeficientes correlación entre los metales contentivos y los biomarcadores determinados en <i>E. complanata</i> en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Concentración de metalotioneínas (A) y grupos sulfhidrilos (B) en porciones corporales de E. complanata expuestos a contaminantes. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....26

FIGURA 2. Niveles de sustancias que reacciones al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) y proteínas totales (B) en las distintas porciones corporales de E. complanata expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....27

FIGURA 3. Actividad de catalasa (CAT) (A) y glutatona reductasa (GR) (B) en las distintas porciones corporales de E. complanata expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....30

FIGURA 4. Actividad de glutatona transferasa (GST) (A) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (B) en las distintas porciones corporales de E. complanata expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran

diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....	31
FIGURA 5. Viabilidad (A), número total (B), fagocitosis (C) y Actividad de lisozimas (D) en <i>E. complanata</i> expuestos a distintos xenobióticos durante 21 días. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	50
FIGURA 6. Porcentaje de células con membranas lisosomales desestabilizadas en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. La zona punteada muestra la estimación del daño al 50 % de los celomocitos.....	51
FIGURA 7. Frecuencia de micronúcleos en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	52
FIGURA 8. Concentración de proteínas, ARN y ADN en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo.	52
FIGURA 9. Radios PT/ARN, ARN/ADN y PT/ADN en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	53
FIGURA 10. Tasa de crecimiento corporal en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	53
FIGURA 11. Concentración de metalotioneínas (MT) en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas. Los datos se expresan en microgramos de MT por gramo de tejido fresco.	68
FIGURA 12. Niveles de tioles totales en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas.	69

FIGURA 13. Niveles de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios de temperaturas mensuales. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....	70
FIGURA 14. Actividad de glutationa-S-transferasa en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas.	70
FIGURA 15. Actividad de glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas.	71
FIGURA 16. Actividad de la catalasa (CAT) en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas.	71
FIGURA 17. Concentración de ADN en el poliqueto <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....	73
FIGURA 18. Concentración de ARN en el poliqueto <i>E. complanata</i> en relación a los cambios de temperaturas mensuales.	73
FIGURA 19. Niveles de proteínas totales solubles en <i>E. complanata</i> en relación a los cambios de temperaturas mensuales.	74
FIGURA 20. Coeficientes de crecimiento molecular (proteínas/ADN [x 100], proteínas/ARN [x 100] y ARN/ADN) en el poliqueto <i>E. complanata</i> en relación a los cambios mensuales de temperaturas.	74
FIGURA 21. Coeficientes de crecimiento molecular (proteínas/ADN [x 100], proteínas /ARN [x 100] y ARN/ADN) en el poliqueto <i>E. complanata</i> en relación a 2 temperaturas. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....	75
FIGURA 22. Sitios de colectas de ejemplares de la especie <i>E. complanata</i>: ensenada de Turpialito (a, 10° 27' 30'' N, 64° 01' 52'' O) y playa escondida en la isla Caracas (b; 10° 15' 41'' N, 64° 28' 48'' O).	88

Figura 23. Niveles de metales pesados en sedimentos de las localidades de Turpialito (Golfo de Cariaco), Isla Caracas (Parque Nacional Mochima) y sedimentos contaminados con FALUMV. La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.....90

FIGURA 24. Concentración metalotioneínas y grupos tioles solubles en E. complanata colectado en la ensenada de Turpialito (GC, Golfo de Cariaco) e islas Caracas (Mochima). Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....91

FIGURA 25. Actividades de la enzimas CAT (A), GST (B), G6PDH (C) y TBARS (D) en E. complanata en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. S_Cd: Sedimento con Cadmio; S_FAL: Sedimento con F.....94

FIGURA 26. Coeficientes proteínas/ARN (A), Proteinas/ADN (B), ARN/ADN (C) y lisozimas (D) en E. complanata en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.....95

FIGURA 27. Viabilidad (A), número total (B), frecuencia de micronúcleos (C) y desestabilización de las membranas lisosomales (D) en E. complanata en la localidad de Turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. S_Cd: Sedimento con Cadmio; S_FAL: Sedimento con FALUMV.....96

RESUMEN

Con el interés de evaluar la calidad ambiental de dos zonas de arrecifales localizadas en costas del estado Sucre (Venezuela), la ensenada de Turpialito (Golfo de Cariaco) e isla Las Caracas (Parque Nacional Mochima), se realizó la determinación de una gama de marcadores de contaminación, a diferentes niveles de organización biológica (molecular, celular y tisular), usando como organismo sensor al poliqueto *E. complanata* (Amphinomidae). Adicionalmente, se realizaron ensayos subletales referenciales en presencia de los siguientes xenobióticos: cadmio (Cd), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV), durante períodos de exposición (7, 14 y 21 días); cambio de temperatura (24 y 28 °C) y sedimentos contaminados por mezclas de contaminantes. Para los distintos tratamientos y zonas de estudios se procedió a determinar los niveles de metales pesados contentivos en la pared corporal del poliqueto y en el sedimento; además de parámetros bioquímicos tales como la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatona reductasa (GR), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), daño a lípidos de membranas (TBARS), glutatona transferasa (GST), metalotioneínas (MT) y grupos tioles solubles (-SH), actividad de lisozimas, niveles de proteínas (PT), ARN y ADN; parámetros celulares tales como viabilidad, número total (NTC), fagocitosis, frecuencia de micronúcleos (FMN), desestabilización de las membranas lisosomales (TRRN) de celomocitos; y parámetros tisulares: crecimiento, regeneración y frecuencia autotómica (FA). El poliqueto *E. complanata* presentó la habilidad de acumular metales pesados en su región corporal posterior, con una alta capacidad metabólica y de defensas antioxidantes hacia la región media del organismo. Estas respuestas pueden ser inducidas en presencia de Cd y H₂O₂, o mezclas complejas de xenobióticos. Durante los 21 días de exposición, la viabilidad, NTC y TRRN fueron reducidas en presencia de la FALUMV, no así con Cd. La actividad de las enzimas y compuestos antioxidantes fueron modulados durante los cambios estacionales de temperatura, tanto en el ambiente como bajo condiciones controladas, logrando un incremento de CAT y G6PDH en los poliquetos colectados en los meses de colecta de junio y octubre (temperaturas > 28 °C). Los niveles de las macromoléculas (proteínas, ARN) no mostraron variabilidad estacional, sin embargo,

las concentraciones de ADN, junto al mayor número de individuos regenerados, aumentan en los meses de altas temperaturas. El coeficiente de crecimiento ARN/ADN mostró sus mayores promedios durante los meses de octubre y diciembre, aunque tales variables no se encuentran asociadas a las tasas de crecimiento en cuanto a masa corporal. Estos coeficientes pueden verse afectados por la exposición a tóxicos referenciales, especialmente a la FALUMV. La actividad de CAT se mostró elevada en los organismos expuestos a tóxicos referenciales. El NTC fue relativamente mayor en los poliquetos en la localidad de isla Caracas; y un porcentaje de 4% en la frecuencia de micronúcleos se observó en los organismos colectados en la ensenada de Turpialito; no obstante sus registros se encuentran por debajo que los mostrados por organismos expuestos a tóxicos de referencia. Los niveles de MT, -SH y lisozimas no presentaron variaciones entre las localidades, pero sí en presencia de contaminantes referenciales. En general, el contraste de los marcadores biológicos usados en poliquetos colectados en el ambiente mostró un estado saludable en ambas zonas evaluadas. Esta investigación demuestra (1) la aplicación de baterías de respuestas biológicas (multibiomarcadores), a nivel molecular, celular y tisular en *E. complanata* para la evaluación de áreas costeras; (2) algunos parámetros sugeridos como biomarcadores específicos de contaminación en presencia de xenobióticos pueden ser alterados por cambios de temperaturas; y (3) esta información fundamenta el uso del poliqueto *E. complanata* como organismo sensor para estudios ecotoxicológicos y la determinación calidad ambiental de ecosistemas marino-costeros.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los poliquetos constituyen el grupo más diverso dentro de los anélidos, presentando adaptaciones a una variedad de ambientes marinos, estuarinos e incluso en agua dulce, representando el 70% de la biomasa de los fondos blandos o arenosos de las zonas costeras. Estos organismos presentan distribución cosmopolita, localizándose desde la zona intermareal hasta profundidades abisales (HUTCHING, 1998).

Desde el punto de vista ecológico, los poliquetos tienen ejemplares situados en todos los niveles consumidores de la trama trófica, buena parte son predadores de anélidos de pequeña talla y de macroinvertebrados, algunos son herbívoros de algas, y otros degradan y reciclan la materia orgánica en descomposición. Por otro lado, los poliquetos sirven de alimento a una gran variedad de organismos en el sedimento, así como a miembros de la epifauna y especies pelágicas (SNELGROVE *et al.*, 1997). Una buena parte de este grupo se entierra en el sedimento para protegerse de los depredadores y alimentarse, mientras que otros remueven constantemente el fango y los depósitos de materia particulada del bentos (AUSTEN, 2002). Sin embargo, la materia que se deposita en el sedimento no sólo comprende nutrientes sino también algunos contaminantes (xenobióticos) que ingresan al ecosistema vía antropogénica, y que pueden ser absorbidos y acumulados con facilidad por tales organismos.

Numerosas investigaciones han sido dirigidas a la selección de organismos que puedan ser utilizados como modelos biológicos en estudios ecotoxicológicos, con la finalidad de relacionar los cambios significativos de su condición fisiológica y bioquímica a la presencia de xenobióticos (orgánicos e inorgánicos), y valorar la salud del ambiente en el cual estos organismos habitan. Estos organismos han sido denominados centinelas o biosensores.

Uno de los modelos biológicos frecuentemente usado han sido los poliquetos, los mismos han sido reconocidos como organismos centinelas de contaminación del bentos marino (REISH, 1986; REISH, 1998; MONSERRAT *et al.*, 2003; DEAN, 2008). El amphinomido *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766) ha sido considerado para el desarrollo de protocolos experimentales ecotoxicológicos en evaluaciones de la toxicidad letal y subletal de sustancias xenobióticas (RODRÍGUEZ y ESCAPLÉS, 1996). *E. complanata* es un poliqueto errante, comúnmente llamado “gusano de fuego”, el cual presenta una amplia distribución geográfica (LIÑERO, 1978). Esta especie se presenta en relativa abundancia en zonas costeras del Oriente de Venezuela, habitando en arrecifes coralinos, fondos arenosos someros, conviviendo con bivalvos y ofiruoideos debajo de piedras y corales muertos (LINERO-ARANA y DÍAZ, 2010).

En ensayos ecotoxicológicos se ha hecho de uso común al poliqueto *E. complanata* como modelo biológico, lo que ha permitido predecir y alertar tempranamente sobre el riesgo de procesos de contaminación en sedimentos (NUSETTI *et al.*, 1998; ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2005). Una variedad de marcadores biológicos han sido utilizados en esta especie, los cuales incluyen indicadores de toxicidad a nivel genético, sistema de defensa antioxidante e inmunológico, crecimiento y reproducción (MÉNDEZ Y PÁEZ-OSUNA, 1998; NUSETTI *et al.*, 2005; VÁSQUEZ-NÚÑEZ *et al.*, 2007).

Los mecanismos de defensa en *E. complanata* frente a xenobióticos ofrecen aspectos de interés para su aplicación en estudios de toxicología ambiental. Por ejemplo, a nivel molecular, su sistema de defensa antioxidante presenta perfecta similitud a los mecanismos encargados de barrer radicales libres en una variedad de grupos taxonómicos, tanto vertebrados como invertebrados. Además, la modulación en las funciones de las enzimas desintoxicantes, moléculas quelantes y compuestos antioxidantes han demostrado ser importantes respuestas utilizadas como marcadores de estrés provocados por contaminantes. Este estudio justifica el uso de respuestas moleculares en dicho poliqueto; siendo este una especie ideal para ser empleada en estudios de la evaluación de ambientes impactados por contaminación química.

E. complanata posee suficientes características que lo convierten en un excelente organismo centinela de contaminación, se nombran dentro de las más importantes que: es una especie de amplia distribución geográfica, de fácil colección, mantenimiento y reproducción bajo condiciones de laboratorio, además es relativamente abundante, detritívoro, con poco desplazamiento, se encuentra asociado al sedimento, y presenta la capacidad de manifestar respuestas ante posibles cambios que suceden en su entorno. En su hábitat natural, al igual que otros organismos bentónicos, esta especie se encuentra expuesto a una gran variedad de xenobióticos y en particular interés los metales pesados, los cuales pueden ser acumulados (MARCANO *et al.*, 1996).

Algunos estudios han reconocido la capacidad que poseen los poliquetos en acumular diversos xenobióticos, los cuales pueden ser biomagnificados a través de la cadena trófica (WANG, 2002). La ruta de entrada de xenobióticos en poliquetos puede ser a través del tracto digestivo, o en menor proporción, a través de la piel y branquias; la acumulación en sus tejidos, va a depender de la concentración y disponibilidad del compuesto en el ambiente, tamaño, estado fisiológico y reproductivo del organismo (DEPLEDGE y RAINBOW, 1990; MÉNDEZ y PÁEZ- OSUMA, 1998).

Los estudios de impacto ambiental realizados en décadas pasadas consistían en la determinación cualitativa y cuantitativa de contaminantes presentes en el área afectada. Hoy en día, se cuantifican respuestas biológicas altamente sensibles a bajas concentraciones de contaminantes que pueden reflejar los posibles efectos deletéreos a nivel molecular y fisiológico sobre la biota (NASCIMENTO, 2006). Estos biomarcadores pueden ser determinados desde niveles moleculares hasta poblacionales, siendo propuestos como herramientas eficaces en las evaluaciones de impacto de xenobióticos sobre los ecosistemas (MARIGÓMEZ *et al.*, 2004).

Parte del metabolismo de xenobióticos en poliquetos es llevado a cabo por procesos cíclicos de oxido-reducción, mecanismos similares tanto en invertebrados como vertebrados, que pueden ser afectados análogamente por la contaminación. Por ello, la

relación entre el metabolismo de sustancias contaminantes y la inducción de daños oxidativos mediado por las especies reactivas del oxígeno (EROs) en los sistemas biológicos es un aspecto de creciente interés. Al respecto, existe documentación sólida que reseñan posibles alteraciones que induce la contaminación química sobre la salud y adaptabilidad de las especies en el medio acuático, afectando directa o indirectamente el balance entre las concentraciones de moléculas prooxidantes, compuestos y enzimas antioxidantes, lo que conlleva a anomalías oxidativas tales como daños al ADN, oxidación de proteínas, inactivación enzimática, peroxidación lipídica, apoptosis y hasta autólisis celular (STOREY, 1996).

El potencial biológico para la producción de EROs incluye sistemas multienzimáticos complejos tales como el transporte de electrones mitocondrial y microsomal, así como también fagocitos activados. Cierta clase de xenobióticos, entre los cuales se puede encontrar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), representan fuentes prolíficas de radicales libres debido a su susceptibilidad de ser reducidos a su correspondiente radical vía NADPH-citocromo-P₄₅₀ (reciclaje redox) (DI GÜILIO, 1995). El metabolismo de xenobióticos orgánicos involucra inicialmente a una variedad de enzimas biotransformadoras encargadas de catalizar la introducción de un grupo funcional polar en los contaminantes lipofílicos y posteriormente, la intervención de las enzimas que conjugan estas moléculas a derivados de azúcares, péptidos o sulfatos (LEE, 1981; LEE, 1998). Estas reacciones generalmente resultan en productos solubles en agua, inocuos y de fácil excreción. Adicionalmente, existen otros compuestos de gran potencial oxidativo, capaces de inducir estrés oxidativo agudo, tales como: paraquat, tetracloruro de carbono (CCl₄), metales de transición (Cu, Fe) y peróxido de hidrógeno.

El sistema de defensa antioxidante incluye un número de enzimas específicas, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa, glutatona peroxidasa, glutatona reductasa y entre otras. Igualmente, la toxicidad mediada por radicales libres es también moderada por moléculas barredoras de radicales libres tales como la glutatona, carotenos, vitaminas E y C (HERMES-LIMA *et al.*, 2001). Estos compuestos y enzimas permiten la efectiva

eliminación de las EROs, constituyendo un mecanismo esencial del sistema de defensa empleado por especies de organismos impactados por tóxicos.

En poliquetos, los compuestos ricos en grupos sulfhidrilos cumplen un papel preponderante en el metabolismo de xenobióticos, principalmente las metalotioneínas (MT) y el glutatión reducido (GSH) (DEMUYNCK y DHAINAUT-COURRTOIS, 1994). La inducibilidad de éstas metaloproteínas y otras de distinta masa relativa en presencia de metales pesados ha sido demostrada en el poliqueto *E. complanata* (MARCANO *et al.*, 1996). Actualmente, diversos autores han señalado que las MT forman parte del sistema de defensa antioxidante, por su capacidad de barrer radicales libres mediante interacción con sus grupos sulfhidrilos (VIARENGO *et al.*, 2000; ZAPATA-VÍVENES y NUSETTI, 2007).

Otro sistema de importancia susceptible a xenobióticos es el sistema inmunológico innato. Actualmente existen protocolos para evaluar las respuestas inmunológicas en una gran variedad de especies de anélidos. *E. complanata* consta de un sistema inmunológico conformado por un componente celular (celomocitos), el cual desempeña un papel clave durante los procesos de inflamación, cicatrización de heridas y fagocitosis de patógenos, y de un componente humoral, que comprende actividad bacteriolítica de lisozimas, factores aglutinantes y hemolisinas. Todas estas funciones inmunológicas son sensibles a contaminantes químicos, por lo que el uso de estos biomarcadores resultan potencialmente útil (DHAINAUT y SCAP, 2001; SAUVÉ *et al.*, 2002).

Muchas publicaciones señalan que diversos xenobióticos, en especial los metales pesados, fracciones solubles de aceites usados de motores de vehículos y petróleos pesados pueden actuar como alteradores de las respuestas inmunológicas innatas en invertebrados marinos, lo cual refleja en modificaciones de la actividad fagocítica y composición relativa de los fagocitos (MARCANO *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2008; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012a).

Otra respuesta en el orden tisular que posee *E. complanata* es la habilidad de

autotomizarse, cicatrizar tejidos heridos y regeneración tisular (ZAPATA-VÍVENES, 2001). Los fenómenos de sellado y reparación de tejidos en el poliqueto *E. complanata* relacionan la participación directa del sistema inmune y la acción eficiente de compuestos antioxidantes, mecanismos que pueden ser vulnerables a la presencia a baja concentración de cobre (ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2005). NUSSETTI *et al.*, (2005) han mostrado evidencias que la exposición subletal a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos, constituidos por mezclas complejas de xenobióticos, inducen una condición de estrés oxidativo, la cual puede comprometer el proceso de sellado y formación de nuevos segmentos (setígeros) en esta especie. Adicionalmente, se ha evidenciado amputaciones espontáneas en anélidos que habitan ambientes impactados por metales pesados, especialmente el desprendimiento de sus porciones posteriores (LUCAN-BOUCHE *et al.*, 1999). Según experimentos preliminares, esta respuesta de fisión corporal pareciera estar inducida en *E. complanata* por estrés en presencia de contaminantes.

La letalidad de los metales pesados (Cu, Zn, Hg, Cd, Ni), y mezclas complejas de xenobióticos (fracción soluble de lubricantes usados) ha sido evaluada en *E. complanata* por medio de estimaciones de las concentraciones letales medias (CL₅₀) durante 96 horas (TABLA 1). A pesar que las concentraciones de metales pesados usadas en la mayoría de los bioensayos estáticos de toxicidad realizados son superiores a las encontradas en sedimentos superficiales en las costas orientales de Venezuela, existen investigaciones recientes que reportan incrementos en los niveles de metales pesados (MARTINEZ, 2006), compuestos clorados (ROMERO *et al.*, 2011) e hidrocarburos totales (DAKDOUK-ORTIZ, 2009; ROMERO *et al.*, 2011) en áreas puntuales de las costas del estado Sucre; tales niveles podrían provocar efectos subletales tales como perturbaciones moleculares y celulares, a largo plazo (semanas, meses) en la biota circundante.

Los planes de desarrollo industrial (complejos gasíferos, puertos de aguas profundas) en la región oriental, y específicamente en el estado Sucre, demandan el diseño y aplicación de herramientas adecuadas y sensibles que permitan estimar impactos biológicos. Del mismo modo, se hace necesario promover la realización de estudios en la

bioquímica basal en invertebrados marinos, previa a la realización de estas obras de envergadura, con la finalidad de contrastar cambios en su fisiología normal, y así poder determinar futuras alteraciones en la calidad de los ecosistemas. Los efluentes descargados por actividades antropogénicas podrían conllevar a dejar secuelas a nivel molecular en los organismos asociados al sedimento; efectos que solo pueden ser detectados mediante marcadores biológicos específicos y no específicos denominados biomarcadores (MONSERRAT, 2006).

En tal contexto, este trabajo se fundamenta en el uso del poliqueto *E. complanata* (Pallas, 1766) como sensor biológico de contaminación en evaluaciones de ecosistemas químicamente impactado, determinando en este organismo una serie de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica. Para tal fin se evaluó inicialmente los efectos que pueden provocar distintos contaminantes de importancia ecotoxicológicas: cadmio (Cd), mezclas complejas de xenobióticos (fracción soluble de lubricantes usados) y agentes prooxidantes (peróxido de hidrógeno, H₂O₂) sobre algunas respuestas bioquímicas, celulares y tisulares, en bioensayos estáticos que asemejen parcialmente escenarios contaminados. Posteriormente, se contrastó diversos biomarcadores en *E. complanata* colectados en dos zonas costeras arrecifales del estado Sucre, con la finalidad de valorar la calidad ambiental de estos dos ecosistemas.

Sustancias	Fuente	Concentraciones Nominales	LC ₅₀ 96 h	Referencias
Cadmio	CdCl ₂ . 5H ₂ O	-	75, 0	REISH <i>et al.</i> , 1989
		-	1,4 mg/L	REISH, 1996
	CdCl ₂ . 5H ₂ O	-	11,14 mg/l	CORDOVA, 1995
	CdCl ₂ . 5H ₂ O	0-20 mg/l	5, 42 mg/l	Este trabajo *
Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	-	2,14 mg/L	MARCANO <i>et al.</i> , 1997 †
DDT	(ClC ₆ H ₄) ₂ CH(CCl ₃)	-	1 mg/l	REISH, 1996
FALUMV	Lubricantes usados	0-100 %. (Proporción 1:9)	13,99 %	ZAPATA, 2001
Plomo	Pb(NO ₃) ₂	0-100 mg/L	0,54 mg/l	Este trabajo †
Mercurio	Hg ₂ Cl ₂	0-900 mg/L	0,197 mg/L	MÉNDEZ <i>et al.</i> , 2009
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂ grado anal. 29 %	0-100 mmol/l	20,9 mmol/l	Este trabajo *
Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0-400 mg/L	139,6 mg/l	Este trabajo *

TABLA 1. Estimaciones de las concentraciones letales medias (LC₅₀) a 96 horas, usando a *E. complanata* expuestos a distintos xenobióticos. † Contaminante mezclados en el sedimento; * Contaminante disuelto en agua de mar.

CAPITULO II

RESPUESTAS ANTIOXIDANTES EN EL POLIQUETO *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766) (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE) EN PRESENCIA DE CONTAMINANTES

RESUMEN

Se evaluó los efectos de tres sustancias contaminantes: cadmio (Cd), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV), sobre el sistema de defensa antioxidante, enzimático y no enzimático, en distintas porciones corporales del poliqueto *E. complanata*. Los organismos fueron expuestos durante 7 y 14 días a 200 µg Cd/l, 3 % de FALUMV y 200 mmol de H₂O₂/l en acuarios por separado. Posteriormente, se escindieron los ejemplares en tres porciones: anterior (A, 20-25 setígeros), media (M) y posterior (P, 20 setígeros terminales). En las mismas fueron cuantificados los niveles de metales pesados (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr), la actividad de enzimas catalasa, glutatona reductasa, glucosa-6-P deshidrogenasa y glutatona transferasa, daño a lípidos de membranas, metalotioneínas, grupos tioles solubles y frecuencia autotómica. En presencia de la FALUMV, *E. complanata* presentó la habilidad de acumular Cd, Zn, Pb y Cr en su región P, con una alta capacidad metabólica y de defensas antioxidantes en la región M. Trece % de los organismos expuestos a FALUMV mostraron daños o señales de desprendimiento de la región P. Las concentraciones de las sustancias tóxicas, Cd y FALUMV, usadas provocaron alteraciones diferenciales en las respuestas de defensas antioxidantes en *E. complanata*, indicando ajustes compensatorios, en el orden bioquímico y corporal, lo cual posiblemente permita contrarrestar los efectos tóxicos de la carga de metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos. El incremento en las defensas antioxidantes a lo largo del cuerpo de *E. complanata* pueden conllevar a evitar la toxicidad y exacerbaciones oxidativas. La región P posee mayor sensibilidad a ser afectada por oxiradicales (lipoperoxidación). La autotomía de la región posterior inducida por acumulación de metales pesados es considerada como un mecanismo de defensa corporal en los procesos de desintoxicación de metales pesados en poliquetos.

INTRODUCCIÓN

Los organismos que habitan zonas costeras impactadas generalmente se encuentran expuestos a mezclas de xenobióticos orgánicos e inorgánicos (metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos policlorados, entre otros), tales compuestos han sido caracterizados por poseer un alto potencial tóxico. La sobrevivencia de los organismos en ambientes contaminados se encuentra asociada a la activación de mecanismos de defensa vinculados con el ingreso, metabolismo, acumulación y desintoxicación de productos tóxicos (AZEVEDO y DA MATTA, 2004). Tales procesos frecuentemente pueden conllevar a manifestar patologías relacionadas a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). En organismos vertebrados e invertebrados se ha demostrado que la sobreproducción de EROs causa el desarrollo de patologías oxidativas que conllevan a manifestaciones de neoplasia (TUYOKUNI *et al.*, 1995), senectud (ZORRILLA-GARCÍA, 2002), genotoxicidad (CHANG *et al.*, 2009), disfunción inmunológica (MARCANO *et al.*, 1997) y retardo en la regeneración de tejidos (NUSETTI *et al.*, 2005).

Los organismos marinos poseen un sistema de defensas antioxidantes que mantiene en concentraciones fisiológicamente aceptables a las EROs (LIVINGSTONE, 2001). Las defensas antioxidantes están conformadas por respuestas de tipo enzimáticas, dentro de las que se incluyen, las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatióna peroxidasa (GPx), glutatióna reductasa (GR) y glutatión transferasa (GST), y no enzimáticas, por nombrar a las más importantes: glutatióna reducida (GSH), vitaminas C y E, inclusive metalotioneínas (MT). La variación en la actividad de tales enzimas y niveles de compuestos antioxidantes han sido frecuentemente usados como parámetros claves en monitoreos de ambientes marino-costeros frente a contaminación por xenobióticos. Este sistema de defensa molecular ha sido evaluado en una variedad de modelos biológicos experimentales tales como bivalvos (SRRAIN y RUDOLPH, 2010), gasterópodos (ROMÈO *et al.*, 2006), corales (RAMOS y GARCÍA, 2007) y poliquetos (DA ROSA *et al.*, 2005; DA

ROSA *et al.*, 2008).

Uno de los grupos biológicos más usados como organismos sensores en la evaluación de contaminación han sido los anélidos, y de particular interés los poliquetos. La mayoría de especies de poliquetos muestran la capacidad de acumular y degradar compuestos xenobióticos tóxicos a formas menos perjudiciales. Los poliquetos pueden residir en ambientes marino-costeros influenciados por contaminantes provenientes de la actividad industrial y urbanística. A pesar de esto, tales organismos poseen mecanismos suficientes de tolerancia a bajas concentraciones de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (SUN *et al.*, 2006; SUN y ZHOU, 2008), exhibiendo mecanismos de incorporación poco dilucidados que le permiten acumular concentraciones elevadas en consideración con las encontradas en el entorno donde habitan.

En ensayos crónicos de exposición a contaminantes se puede evaluar como varían las defensas antioxidantes en los organismos. Existen referencias importantes que demuestran la activación del sistema de defensa antioxidante en presencia de xenobióticos. GERACITANO *et al.*, (2004a) reportan incrementos en las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, GST y CAT en el poliqueto *Laeonereis acuta* expuestos a dosis subletales de cobre. De igual manera, el poliqueto errante *E. complanata* puede metabolizar hidrocarburos (NUSETTI *et al.*, 2005) y acumular metales pesados (Cu, Zn, Hg, Cd) (MARCANO *et al.*, 1996; VASQUEZ-NUÑEZ *et al.*, 2007). En esta última especie, se ha reportado un concomitante incremento de las actividades de las enzimas CAT, GR y GST cuando es expuesta a fracciones acuosas de lubricantes usados de vehículos automotores, en períodos moderados o intensos (NUSETTI *et al.*, 2005). Estudios recientes han resaltado la utilidad de los poliquetos como especies indicadoras de toxicidad (DEAN, 2008; MORALES-CASELES *et al.*, 2009).

El ingreso de metales pesados y algunos compuestos orgánicos pueden inducir la síntesis de metalotioneínas (MT), proteínas de alta masa relativa y tioles de bajo peso molecular (HERNÁNDEZ, 2006; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012b). Las MT son

proteínas de baja masa molecular relativa, con un alto contenido de cisteína y su función se encuentra asociada a la homeostasis de metales esenciales (ROESIJADI, 2000). La inducibilidad de las MT y otras proteínas de alto peso molecular ha sido demostrada en invertebrados expuestos a distintos xenobióticos, especialmente metales pesados. Además, su capacidad de enlazar metales ha sido ampliamente demostrada en poliquetos (YOUNG y ROESIJADI, 1983; MARCANO *et al.*, 1996).

Una de las consecuencias de la sobreproducción de oxiradicales a nivel molecular es la peroxidación lípidica (LPO), considerada un marcador de daño oxidativo. Adicionalmente se ha reportado una relación directa de la inducción de daños oxidativos sobre lípidos de membranas en organismos expuestos a dosis subletales de metales pesados (BEYTUT y AKSAKAL, 2002; NUSETTI *et al.*, 2001). La LPO puede perturbar las propiedades estructurales y funcionales de las membranas biológicas, alterando su fluidez y capacidad para mantener un adecuado balance (SIES, 1999).

E. complanata posee un alto poder regenerativo de porciones corporales que han sido escindidas, además de autotomizarse y reproducirse asexualmente. Los fragmentos corporales sobrevivientes son capaces de regenerar los nuevos segmentos de la región anterior y posterior (ZAPATA-VÍVENES, 2001). Las respuestas de autoescisión son estimuladas por un daño directo o estímulos ambientales externos (variación de alimento, temperatura), resultando en una rápida separación de una porción corporal. En algunos casos, los xenobióticos inducen a la pérdida de apéndices (crustáceos) e escisiones corporales (oligoquetos). BOUCHE *et al.*, 2000 indicaron que la autotomía en *Tubifex tubifex* es un buen parámetro de toxicidad en anélidos.

La mayoría de las investigaciones ecotoxicológicas en las cuales se usan poliquetos como organismos experimentales, tanto en ensayos estáticos como evaluaciones de campo, han tenido como objetivo principal la determinación de respuestas bioquímicas y fisiológicas, tomando como órgano de análisis el tejido corporal (carcasa). Este capítulo tuvo como propósito evaluar las respuestas antioxidantes, tanto enzimática y como no

enzimática, intracorporales en el poliqueto marino *E. complanata*, bajo exposición a xenobióticos. En adición, se discute la inducción de respuestas de compensación antioxidantes contra daños provocados por compuestos pro-oxidantes y su vulnerabilidad dependiendo la naturaleza de los xenobióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos

Los ejemplares maduros del poliqueto *E. complanata* ($1,53 \pm 1,08$ g; rango 0,8 -2,68), sin distinción de sexo, fueron colectados manualmente por buceo autónomo a profundidades de 0 a 5 m en aguas someras de la franja costera de la zona sur del Golfo de Cariaco, en las adyacencias de la ensenada de Turpialito ($11^{\circ} 22' 30''$ N, $64^{\circ} 04' 50''$ O), en el mes de agosto del 2009. Los individuos colectados fueron transportados en envases de aislamiento térmico hasta el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias. Los mismos fueron mantenidos durante dos semanas en acuarios de 40 litros de capacidad con agua de mar (1 individuo por cada 4 L de agua de mar), arena del sitio de captura, aireados continuamente (90-95 %), temperatura del agua de mar 25 ± 1 °C y alimentados con tejidos del cangrejo *Carcinus sp.* ($\sim 0,2$ g/día/animal) colectado en la misma zona.

Ensayos Subletales

Los organismos con tallas que oscilaron entre 1,2 – 1,50 g fueron expuestos, en experimentos separados, a concentraciones subletales de sustancias contaminantes de diferentes naturalezas: 200 µg/l de cadmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 3 % v/v de una fracción soluble de aceite usados de motores de vehículos (proporción 1:9; lubricante: agua de mar v/v), y 100 µmol/L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 7 y 14 días. Las concentraciones seleccionadas (cerca o menores al CL_{10}) fueron basadas en estimaciones previas de la concentración letal media (CL_{50}) (TABLA 1). El experimento fue realizado por triplicado, incluyendo los organismos del grupo control (sin contaminantes). El número de individuos usados por cada concentración fue de 10 ejemplares. Los organismos se alimentaron dos horas previas a la renovación del sistema (sedimento, agua y contaminantes). El recambio fue realizado cada dos días, para minimizar efectos de productos de excreción y descomposición de alimentos. Los compuestos seleccionados presentan alta importancia toxicológica, basado en el interés de contrastar los efectos de un metal pesado de referencia,

una mezcla compleja de xenobióticos y sustancias pro-oxidantes, respectivamente.

En cada acuario se colocaron 100 g de arena y rocas limpias provenientes del sitio de captura, con la finalidad de simular condiciones del medio. Transcurridos los períodos de exposición, fueron seleccionados 6-10 poliquetos por cada tratamiento, y posteriormente se separaron quirúrgicamente en tres secciones: porción anterior (10-15 segmentos), media (próximos 15-20 segmentos) y posterior (el resto del cuerpo). Estos tejidos fueron almacenados a -20°C durante un lapso no mayor de 7 días.

Determinación de Metales Pesados

Las distintas regiones corporales fueron colocadas, por separado, en fiolas de 25 ml donde fueron deshidratadas a 60°C durante 5 días. Se procedió a realizar una pre-digestión por 24 horas con 5 ml de ácido nítrico 69% a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras fueron digeridas a 60°C por 4 horas, y luego a 80°C por 2 horas. Posteriormente, se adicionaron 2,5 ml de agua desionizada, se filtró sobre papel Watman n° 42 y se completó el volumen final a 10 ml con agua desionizada (ROJAS-ASTUDILLO *et al.*, 2002).

Las soluciones fueron analizadas en un espectrómetro de emisión óptica inductivamente acoplado a un plasma (ICP-OES), marca Perkin Elmer, modelo Óptima 5300 DV. Las concentraciones de cada metal fueron expresadas como microgramos por gramos de masa seca ($\mu\text{g/g}$). De manera similar fueron tratados materiales certificados de referencia de ostras (Oyster 1566a) y determinados los límites de detección del ICP-OES y dos soluciones blancas para evaluar la calidad del método de análisis. Se estimaron sólo los niveles de Cd en las porciones de organismos expuestos a este metal y FALUMV. Para los organismos control y expuestos a FALUMV se contrastaron: Zn, Cu, Pb y Cr.

Metalotioneínas

Los tejidos se homogenizaron en proporción 1:8 en buffer Tris-HCl 20 mol/l pH 8,6, contentivo de sacarosa 500 mmol/l, leupectina 10 $\mu\text{mol/l}$, ácido fenil-metil-sulfonil

fluoruro (PMSF) 0,5 mmol/l y ditioneitol 2 mmol/l a 0-4 °C. El homogenizado fue centrifugado a 2.000 *g* por 30 min. Por cada mililitro del sobrenadante se le adicionó 1,5 ml de etanol absoluto (-20°C) y 80 µl de cloroformo, y luego se centrifugó a 6.000g por 10 min (4°C). El sobrenadante resultante se mezcló con 1 mg de ARN, 40 µl de HCl al 37 % y 3 ml de etanol frío, y fue mantenido a -20° C por una hora. Una nueva centrifugación se realizó a 6.000 *g* por 10 min. Posteriormente, el precipitado obtenido se resuspendió con etanol 87 %, cloroformo 1 % y buffer de homogenización, y posteriormente se centrifugó a 6.000 *g* por 10 min. El precipitado se mezcló con 150 µl de NaCl 0,25 mol/l, 150 µl HCl 0,90 mol/l y 150 µl EDTA 4 mmol/l; luego se agregó a las muestras una solución contentiva de NaCl 2 mol/l, ácido 5, 5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) a 0,4 mmol/l y buffer fosfato de sodio 200 mmol/l pH 8,6. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 30 minutos, luego se centrifugó a 3.000 *g* x 30 min. Se estimaron los niveles de grupos tioles (-SH) utilizando una curva patrón de glutatona reducida (GSH) a 412 nm. Las concentraciones de MT fueron expresadas en micromoles de MT/g de masa húmeda (VIARENGO *et al.*, 1997).

Tioles Totales (-SH)

La determinación de tioles solubles se realizó por método de ELLMAN (1958). Se tomaron 100 mg de las distintas regiones corporales, se homogenizaron con 2 ml del buffer 100 mmol/l Tris EDTA pH 8,0. Se centrifugó a 5000 *g* durante 5 minutos. Del sobrenadante obtenido, se tomaron 200 µl a los cuales se les adicionó 200 µl de ácido tricloroacético al 10 % (ATC) y se colocó en el congelador por 15 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos a 2000 *g*. Se tomaron 200 µl del sobrenadante y se le agregaron 800 µl de Tris-HCl pH 8,9 y 80 µl de DTNB. Posteriormente fueron leídos en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm. Se usó glutatona reducida como sustancia de referencia.

Peroxidación de Lípidos

La peroxidación lipídica se estimó por el protocolo propuesto por OHKAWA *et al.*,

(1979). Los tejidos fueron homogenizados en una concentración de 50 mg/ml en buffer fosfato de sodio 100 mmol/l pH 7,5; 4 °C. El extracto se centrifugó a 4°C, 6.000 g, por 20 minutos. Doscientos µl del homogeneizado se incubó en baño de agua a 37° C con agitación constante durante 15 minutos. A cada tubo se le añadió 250 µl de una solución constituida por ácido tricloroacético 12,5 % y HCl 0,8 mol/l. Luego, se le agregó 500 µl de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%. Se colocaron en un baño de agua a 90°C con agitación constante por 30 minutos, y posteriormente colocados en baño de hielo por 10 minutos. Luego, se centrifugó (centrifuga) a 1.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias de las muestras fueron leídas a 535 nm. La concentración de las sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se calculó usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar.

Proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de LOWRY *et al.*, (1951), utilizando como estándar albúmina estándar de suero de bovino.

Enzimas Antioxidantes

Preparación de los Extractos Enzimáticos

Para la determinación de las actividades enzimáticas se usó el protocolo propuesto por ZAPATA-VÍVENES (2001). Los tejidos se homogenizaron a 13.500 min⁻¹ empleando un homogenizador IKA T25 Basic a 4°C. La homogenización se realizó en una relación 1:8 m/v del buffer de extracción. El buffer de extracción consistió en Tris-HCl (hidroximetilmetilamina) 20 mmol/l pH 7,6 conteniendo ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA) 1 mmol/l, ditioneitol (DTT) 4 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, KCl 150 mmol/l y ácido fenil metilsulfonilfluorido (PMSF) en alcohol isopropílico 1 mmol/l. El extracto resultante se centrifugó inicialmente a 2 g por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5702 R refrigerada. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10 g durante 30 minutos a 4 °C. El volumen final colectado se usó como fuente de enzimas.

Análisis Enzimáticos

La actividad de las enzimas antioxidantes se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a $26 \pm 0,5$ °C. Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado en un volumen final de 1,0 ml. Las estimaciones de pendiente y actividad enzimática específica (U/g de masa húmeda del tejido) se realizaron en el programa UV Winlab Lambda 25 bajo ambiente Windows.

Catalasa (CAT, EC.1.11.1.6): se determinó por el descenso de la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (Coeficiente de Extinción= $40 M^{-1}cm^{-1}$). La mezcla de incubación estuvo constituida por buffer fosfato KH_2PO_4/K_2PO_4 50 mmol/l a pH 7,5 y H_2O_2 50 mmol/l. A la cubeta experimental de cuarzo, se le agregó 800 μ l de buffer fosfato y 50 μ l del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente y se midió el cambio de absorbancia por 3 minutos. Se dio inicio a la reacción adicionando 150 μ l de H_2O_2 .

Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2): se estimó siguiendo el descenso de la absorbancia debido a la oxidación continua del NADPH a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de Extinción= $6,22 mM^{-1}cm^{-1}$). En la mezcla de incubación se incluyó buffer KH_2PO_4/K_2HPO_4 100 mmol/l pH 7,5, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) 1,2 mmol/l, glutathione oxidada (GSSG) 12 mmol/l. A la cubeta experimental se le añadió 800 μ l de buffer de incubación, 10 μ l de NADPH y 140 μ l del extracto enzimático. Para dar inicio a la reacción se añadió 50 μ l de GSSG.

Glutathione-S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18): se determinó siguiendo el ascenso en la concentración del complejo formado por la glutathione reducida (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), a una longitud de onda de 340 nm (Coeficiente de Extinción= $9,6 mM^{-1}cm^{-1}$). Mezcla de incubación consistió en Na_2HPO_4 100 mmol/l pH 6,5, CDBN 2,5 mmol/l disuelto en etanol, glutathione reducida (GSH) 67 mmol/l. En la cubeta experimental se agregó 900 μ l de buffer de incubación, 20 μ l de CDBN, 30 μ l del extracto enzimático. La

reacción se inició por la adición de 50 µl de GSH.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49): la velocidad de reacción se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm como resultado de la reducción de NADP⁺. Una unidad reduce un micromol de nucleótidos de fosfopirimidina por minutos a 25 °C a pH 7,8. Para tal fin se añadió en la cubeta de reacción: 800 µl de imidazol-HCl 50 mol/l, a pH 7,5, 20 µl MgSO₄ 5 mol/l; 50 µl 0,05 mol/l NADP⁺, 100 µl de extracto. La reacción se inició con 40 µl glucosa-6-fosfato 5 mmol/l.

Frecuencia Autotómica

Se estimó el número de poliquetos lesionados en la pared tisular o porciones corporales escindidas durante 14 días de exposición a Cd, H₂O₂ y FALUMV.

Análisis Estadísticos

Un Análisis de varianza de multifactorial (porciones, días de exposición y tipo de contaminante) fue aplicado usando el programa computarizado Statgraphic Plus versión 5.1, en el cual se determinaron las diferencias entre las respuestas bioquímicas en las porciones corporales de los organismos bajo los tratamientos experimental. Todos los supuestos para realizar la prueba fueron tomados en cuenta. Para el contraste “a posteriori” se utilizará la prueba de Duncan (SOKAL y ROHLF, 1981).

RESULTADOS

Contenido de Cd

La mayor cantidad de Cd fue acumulado hacia la región posterior en el cuerpo de *E. complanata*, tanto en los organismos expuestos a la concentración subletal de Cd como a la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) ($F_s=27,56$; $p<0,001$), con similar patrón de acumulación en los dos períodos de exposición (7 y 14 días) ($F_s=1,72$; $p>0,05$) (TABLA 2). Los mayores niveles de Cd acumulados se encontraron en los organismos expuestos a 200 $\mu\text{g Cd/l}$, incrementando entre 2,71-3,78 veces en contraste a la misma porción corporal en los organismos considerados controles. En presencia de FALUMV se evidenció un rango de acumulación similar, aunque con menores promedios.

Los niveles de los siguientes elementos: zinc (Zn), plomo (Pb), cobre (Cu) y cromo (Cr) se examinaron a lo largo del cuerpo de *E. complanata*, sólo en organismos expuestos a la FALUMV en contraste al grupo control (TABLA 3). Se observaron exclusivamente variaciones basales en la concentración de Zn en los organismos controles, presentando sus mayores valores hacia la porción media-posterior.

En ambos períodos de exposición a la FALUMV se observaron variaciones significativas en algunos de los metales determinados en las distintas porciones corporales. La acumulación de Zn en los organismos expuestos cambió, haciéndose más elevada hacia la región anterior que en la posterior ($F_s=10,20$; $p<0,05$). El Cr presentó mayores promedios en la región posterior ($F_s=0,25$; $p<0,05$). El Pb incrementó en las distintas porciones corporales, acumulándose cantidades relativamente mayores en las regiones medias y posteriores, exclusivamente a los 14 días de exposición ($F_s=9,32$; $p<0,05$). Contrariamente, el Cu no presentó variaciones en presencia de las concentraciones de FALUMV en los períodos experimentales.

Metalotioneínas y grupos tioles

En la FIGURA 1A se muestran las variaciones de las concentraciones de metalotioneínas totales (MT) en las regiones corporales: anterior, media y posterior de *E. complanata*. En forma general, se evidencia un aumento significativo de los niveles de esta proteína en los organismos expuestos a Cd, así como también a la FALUMV, aunque con menores promedios. Se denota que las mayores concentraciones se encuentran en la región anterior y media, tanto en los organismos expuestos a Cd y FALUMV, incluyendo los ejemplares expuestos a los 7 y 14 días ($F_s= 10,69$; $p<0,001$).

Las porciones anterior y media de los organismos expuestos a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no mostraron diferencias con respecto a su control, a excepción de la porción posterior, que incrementó la concentración de MT significativamente en el último período de exposición ($F_s= 8,10$; $p<0,001$). Los niveles de MT en la región posterior incrementaron de forma similar en presencia de Cd, H_2O_2 y FALUMV.

Las concentraciones de grupos tioles ($-SH$) (FIGURA 1B) revelaron un notorio aumento en la porción media de los organismos expuestos a Cd y FALUMV ($F_s=30,34$; $p<0,001$), aunque no se evidenciaron diferencias durante los dos períodos de exposición ($F_s=0,33$; $p>0,05$).

TBARS y Proteínas

Los niveles de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostraron incrementos similares entre la porción media y posterior de organismos expuestos a H_2O_2 , en ambos períodos de exposición ($F_s=13,5$; $p<0,001$). Los niveles de TBARS incrementaron en la región media-posterior en los animales expuestos a FALUMV en los dos períodos de exposición ($F_s=22,19$; $p<0,001$) (FIGURA 2A). Los organismos expuestos a Cd no mostraron variaciones en este parámetro.

Las concentraciones de proteínas incrementaron en todas las porciones de los organismos expuestos a Cd, al igual que los organismos expuestos a FALUMV ($F_s=34,23$;

$p < 0,001$) (FIGURA 2B). Se observa las mayores concentraciones en la región media, al menos en los organismos expuestos a Cd ($162,16 \pm 37,15$ mg/gmh y $150,96 \pm 41,82$ mg/gmh) en los dos períodos. Los organismos expuestos a H_2O_2 no mostraron cambios estadísticos en los niveles de estas macromoléculas.

Tratamientos	7 d			14 d		
	Anterior	Media	Posterior	Anterior	Media	Posterior
Controles	2,32 ± 1,64	2,31 ± 1,29	2,90 ± 1,28	3,23 ± 1,36	2,45 ± 0,69	4,72 ± 2,07
Cd	6,30 ± 1,93*	5,18±3,95*	10,97 ± 4,13*	6,82 ±1,60*	5,94 ± 3,89*	11,55 ± 6,61*
FALUMV	1,89 ± 1,02	3,97 ± 2,52	5,69 ± 2,88*	2,00 ± 1,87	3,36 ± 1,80	5,57 ± 2,81*

TABLA 2. Niveles de cadmio en distintas porciones corporales de *E. complanata* expuestos a contaminantes. Los datos se expresan en µg de Cd por gramo de tejido seco. Se denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas al 95 % de confianza con respecto a su porción en los organismos controles.

Metal	7 d			14 d		
Control	Anterior	Media	Posterior	Anterior	Media	Posterior
Zn	59,76 ± 24,78	64,76 ± 12,41	86,83 ± 26,57	62,38± 38,73	58,53± 26,29	72,92± 54,51
Pb	0,21 ± 0,03	0,12 ± 0,14	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,08	0,52 ± 0,14	0,24 ± 0,04
Cu	16,8 ± 10,62	7,44 ± 6,63	10,18 ± 4,17	17,04 ± 11,6	15,47 ± 7,33	17,82 ± 13,8
Cr	0,7 ± 0,35	0,16 ± 0,13	0,3 ± 0,24	0,35 ± 0,45	0,28 ± 0,10	0,35 ± 0,20
FALUMV	Anterior	Media	Posterior	Anterior	Media	Posterior
Zn	42,75 ± 11,64	125,62 ± 49,8 *	143,19 ± 80,9 *	43,88± 10,56	151,17± 37,5 *	109,8± 54,2
Pb	2,21 ± 0,73	2,82 ± 1,14	4,13 ± 2,40	3,48 ± 0,62	6,80 ± 3,97 *	6,28 ± 3,47 *
Cu	56,85±15,48	44,93±21,99	57,70±22,37	57,6±3,8	116,6±40,38 *	86,39 ± 23,56
Cr	0,14 ± 0,05	1,56±1,55	2,35±1,32 *	1,39 ± 0,25	2,92±1,40	5,31±2,74 *

TABLA 3. Niveles de metales pesados (Zn, Cu, Pb y Cr) en distintas porciones corporales de *E. complanata* expuestos a contaminantes. Los datos se expresan en microgramos (μg) de metal por gramo de tejido seco. Se denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas al 95 % de confianza con respecto a su porción en los organismos controles.

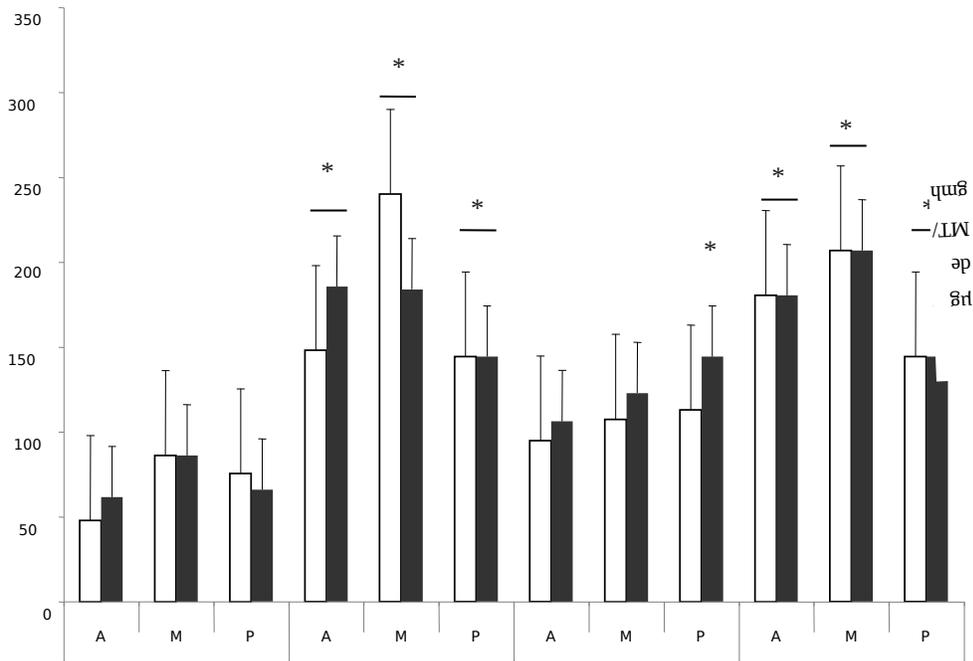
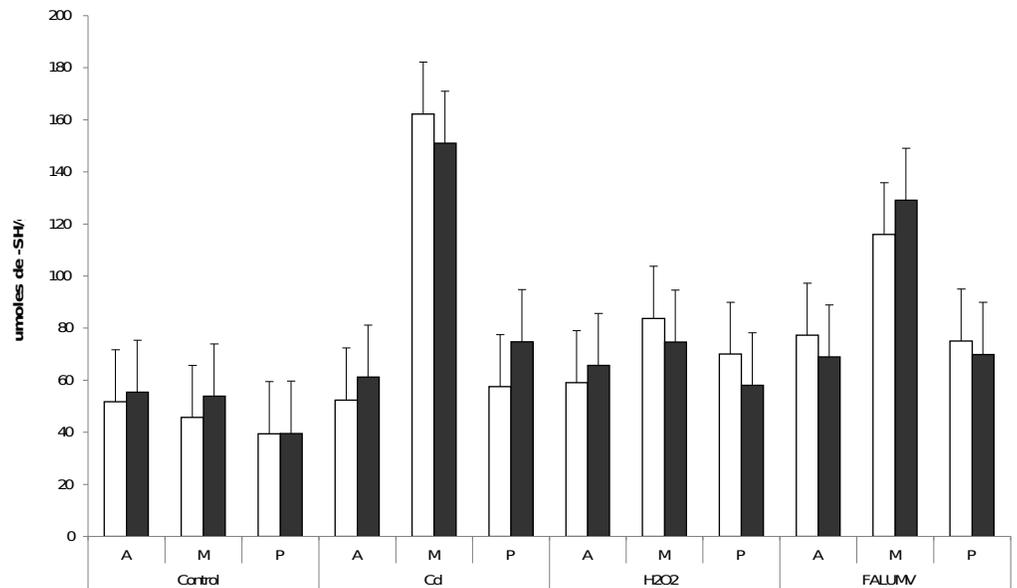


FIGURA 1. Concentración de metalotioneínas (A) y grupos sulfhidrilos (B) en porciones corporales de *E. complanata* expuestos a contaminantes. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición,



respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones

denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

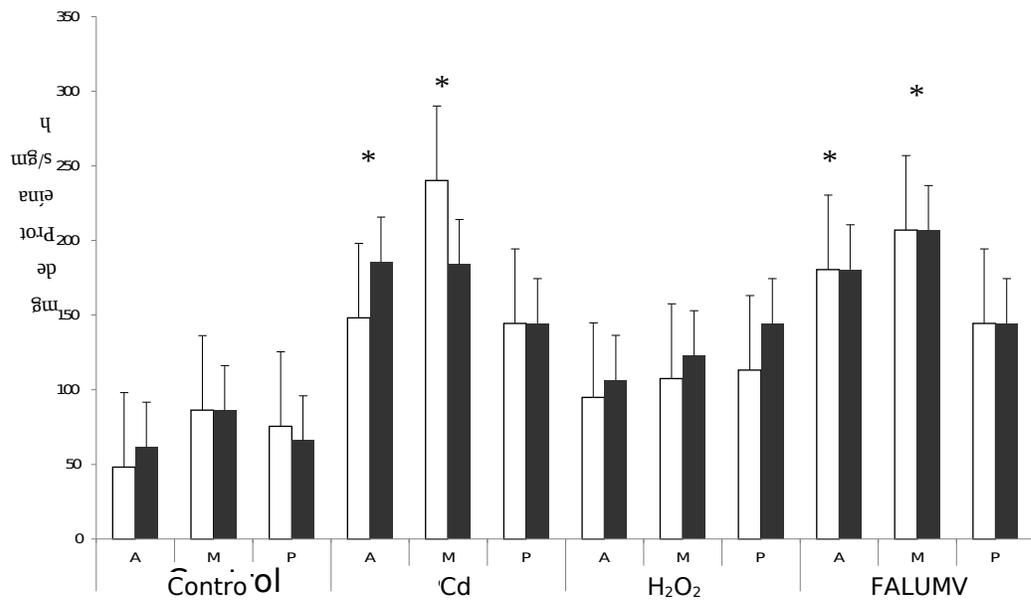
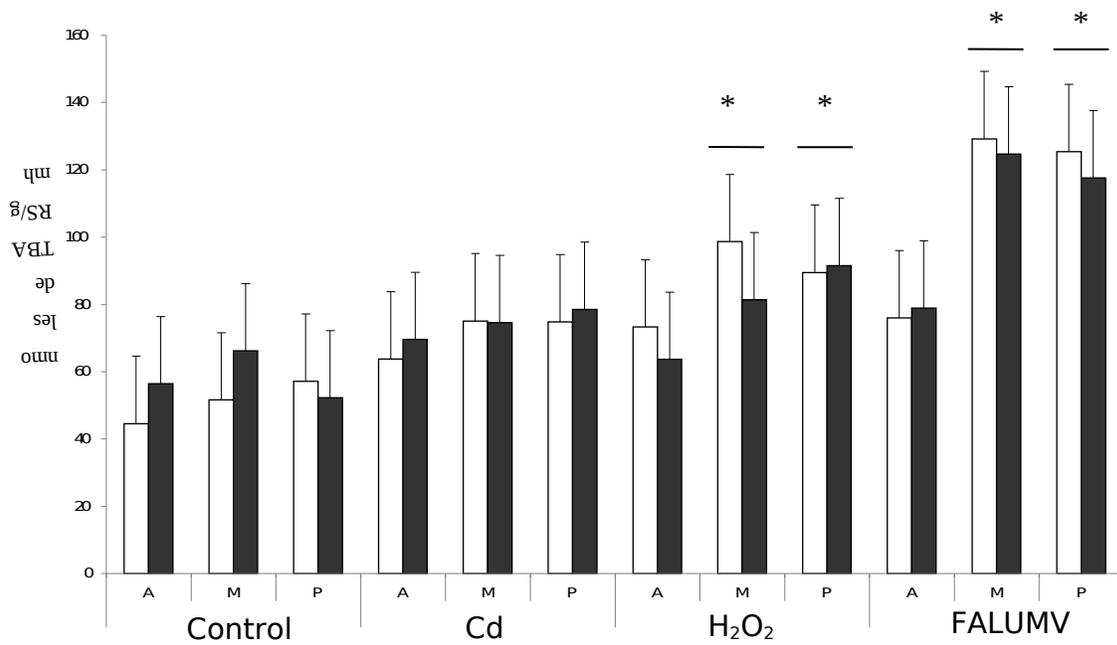


FIGURA 2. Niveles de sustancias que reacciones al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) y

proteínas totales (B) en las distintas porciones corporales de *E. complanata* expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

Enzimas

La enzima catalasa (CAT) mostró un incremento significativo en la región media de los organismos expuestos a Cd a los 14 días. Las regiones anteriores y medias de organismos expuestos a H₂O₂ y todas las regiones corporales de organismos expuestos a FALUMV mostraron un aumento de esta enzima (FIGURA 3A). Los mayores promedios de actividad fueron registrados en la región posterior en organismos expuestos a FALUMV a los 14 días (porción media= 51,92 ± 16,04 U/gmh y posterior= 42,12 ± 14,88 U/gmh).

La actividad de la glutatona reductasa (GR) mostró variaciones durante los dos períodos de exposición (Fs=11,39; $p < 0,001$). Todos organismos expuestos a los diferentes xenobióticos (Cd, peróxido de hidrógeno y FALUMV) mostraron una significativa elevación de la actividad a los 14 días de exposición (FIGURA 3B). Los menores promedios fueron registrados en la porción anterior y posterior de los organismos expuestos durante los primeros 7 días (Fs=5,32; $p < 0,005$).

La actividad de glutatona-S-transferasa (GST) sólo se mostró incrementada en las porciones media y posterior de los poliquetos expuestos a FALUMV (Fs= 5,32; $p < 0,005$), tanto para los 7 como para los 14 días de exposición (Fs= 11,39; $p < 0,001$). Los incrementos fueron estimados en el orden de un 2,46 y 1,67 veces en las porciones media y posterior a los 7 días; 1,73 y 2,18 veces para las mismas regiones en organismos expuestos por 14 días con respecto a su control (FIGURA 4A).

La actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mostró variaciones entre las porciones corporales en los organismos controles, registrándose los mayores promedios en la región posterior (Fs=6,49; $p < 0,01$) (FIGURA 4B). Contrariamente, se observó un decrecimiento en las porciones posteriores de los organismos expuestos tanto a Cd como a la FALUMV durante el período de 7 días

(Fs=16,49; $p<0,001$).

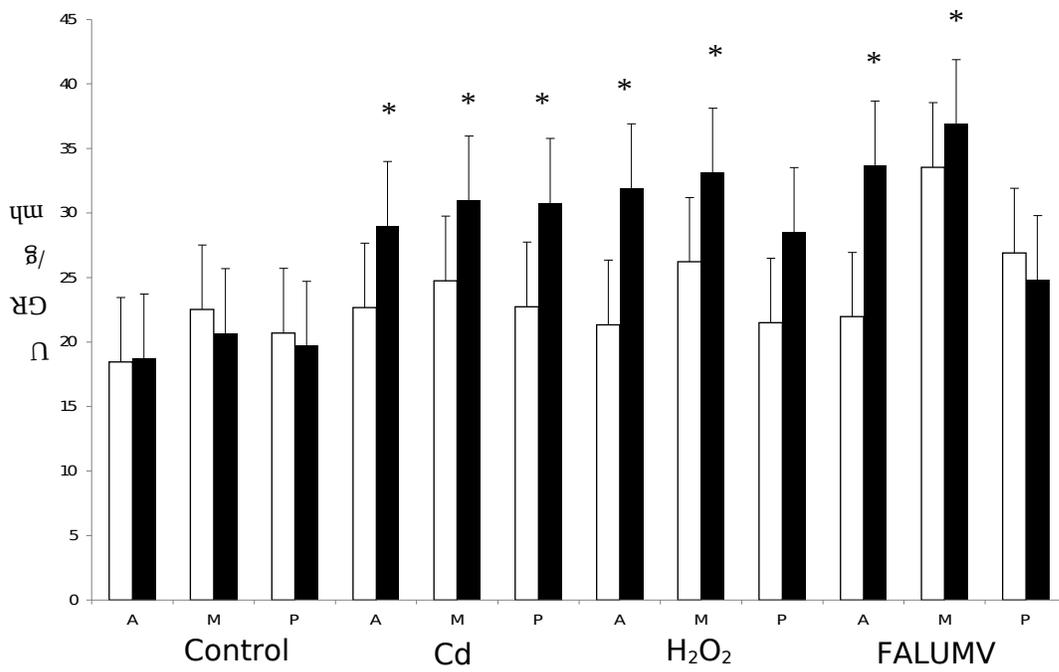
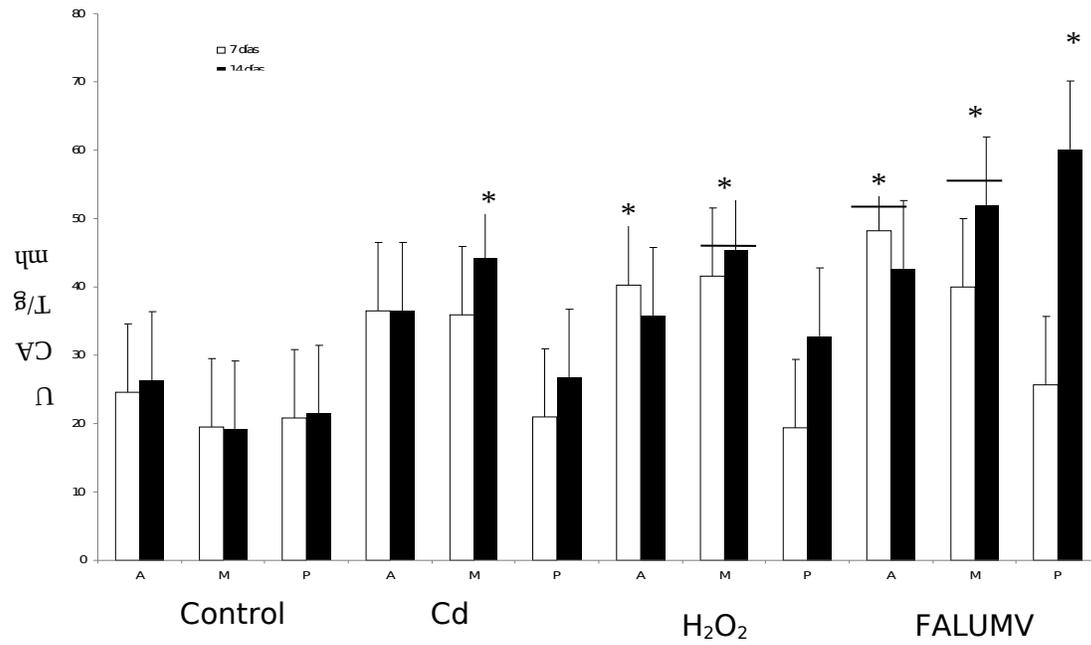
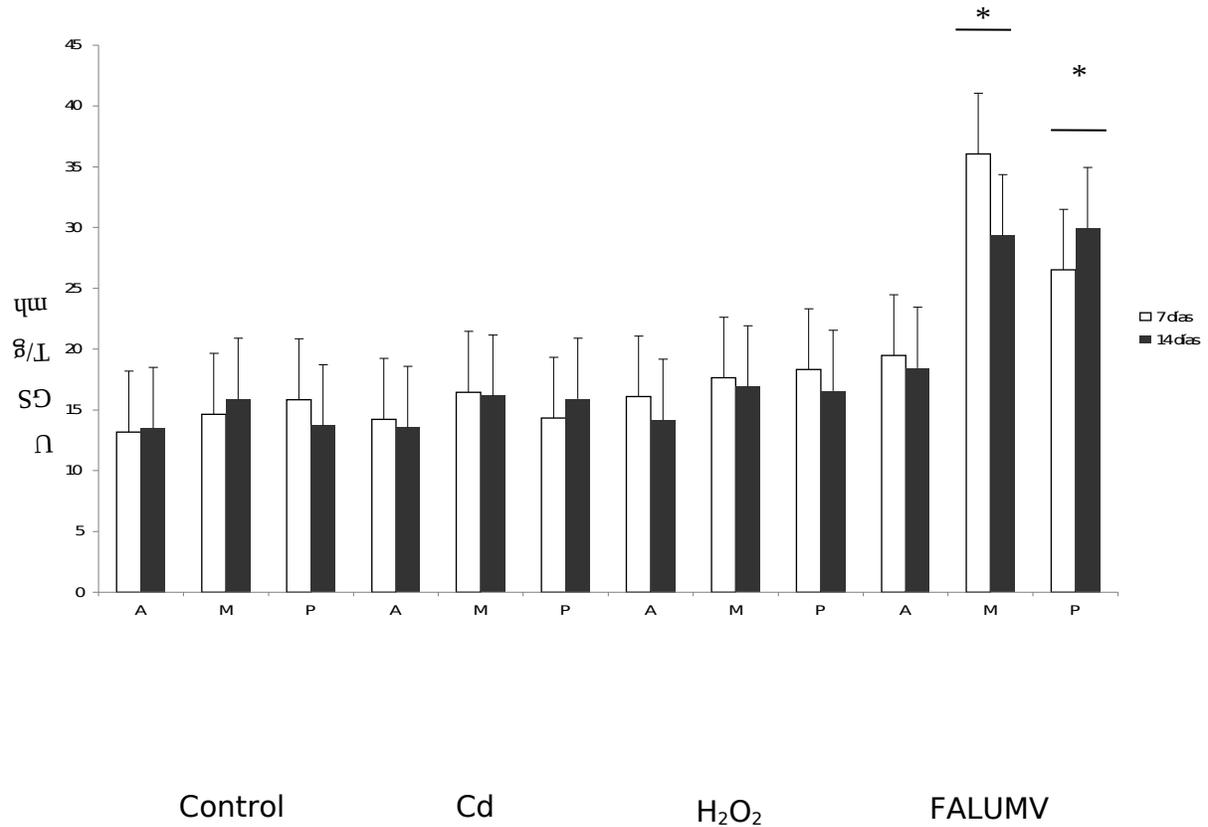


FIGURA 3. Actividad de catalasa (CAT) (A) y glutatona reductasa (GR) (B) en las distintas porciones corporales de *E. complanata* expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.



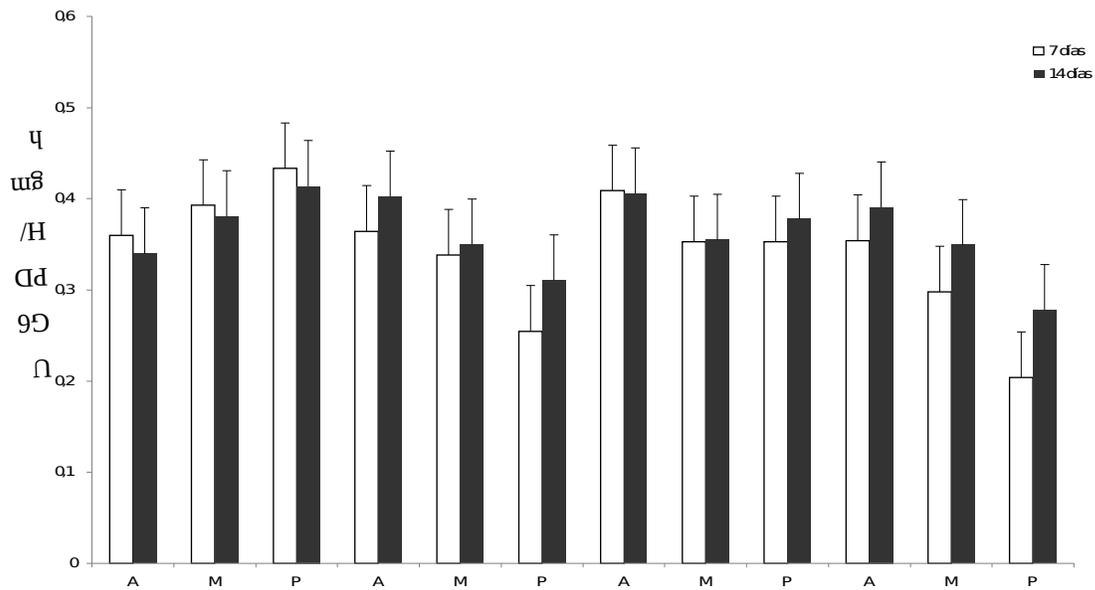


FIGURA 4. Actividad de glutatona transferasa (GST) (A) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (B) en las distintas porciones corporales de *E. complanata* expuestos a distintos xenobióticos. Las barras blancas y negras representan las variables medidas durante 7 y 14 días de exposición, respectivamente. En el eje de las abscisas: A= anterior, M= media y P= posterior. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

*

Control

Cd

H₂O₂

FALUMV

Frecuencia Autotómica

El 13,33 % ($\pm 5,77$) de los organismos expuestos a la FALUMV por 14 días mostraron lesiones, y en la mayoría de los casos presentaron desprendimientos de porciones corporales (auto-escindidos). Generalmente, la zona de escisión estuvo localizada desde la región media hacia la región posterior, entre los setígeros 15-20 de la porción terminal. También fueron registrados eventos aislados de autotomía en poliquetos expuestos a Cd, representado el 3,33 % ($\pm 5,78$) de la población expuesta a dicho metal. Se estimó que el 90 % de las regiones posteriores desprendidas en los organismos expuestos no sobrevivieron.

DISCUSIÓN

El poliqueto *E. complanata* mostró una tendencia a acumular Cd, Zn, Pb y Cr hacia la región posterior en organismos expuestos a Cd o la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV). De igual forma, los incrementos de metales pesados en organismos expuestos a la FALUMV se encuentran en estrecha relación con los compuestos xenobióticos disponibles en la misma. Los análisis químicos han demostrado que las FALUMV contienen, además de altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos, concentraciones significativas de metales pesados, uno de los más importantes es el Cd (GESAMP, 1993; ZAPATA-VÍVENES, 2001). Los niveles de metales pesados en estos lubricantes usados pueden variar dependiendo del tiempo de uso, marca y tipo de motor (ATSDR, 1997).

El perfil de acumulación de metales pesados en *E. complanata*, con crecientes concentraciones desde la región anterior hacia la región posterior en organismos expuestos a dosis subletales de contaminantes, sugiere ser una estrategia fisiológica de defensa contra la toxicidad de los mismos. Este almacenamiento caudal posiblemente esté relacionado con los procesos de desintoxicación de metales pesados (LUCAN-BOUCHÉ *et al.*, 1999). Un caso similar de depuración de metales ocurre en crustáceos. Los cangrejos son capaces de acumular cantidades significativas de metales pesados en su exoesqueleto, y que posteriormente es desprendido por procesos de muda o ecdisis (ENGEL y BROUWER, 1991). Los bivalvos también tienden a acumular buena parte de los metales pesados en sus conchas y biso como mecanismo de defensa molecular desintoxicante (NICHOLSON y SZEFER, 2003)

La habilidad fisiológica de acumular metales pesados, y posiblemente otros tóxicos, hacia la región posterior posiblemente estimule el desprendimiento de esta región corporal. El hallazgo de organismos con zonas corporales dañadas, con formación de coágulos o completamente escindidos en presencia de los contaminantes durante 14 días de exposición, conlleva a inferir que tal auto-amputación forma parte de los mecanismos corporales

destinados a disminuir concentraciones tóxicas de metales.

Investigaciones en el campo han reportado que algunas especies de anélidos que habitan zonas contaminadas pueden mostrar la región posterior mancada o escindida. LUCAN-BOUCHÉ *et al.*, (1999) reportan que el oligoqueto *T. tubifex* colectado en áreas cercana a minas de plomo mostraba signos de desprendimiento o de indicios de regeneración de la región posterior. Adicionalmente, estos autores demostraron en ensayos de laboratorio, la capacidad que poseen tales oligoquetos de autotomizarse bajo concentraciones de cobre y plomo. En esta misma especie, BOUCHÉ *et al.*, (2000) han referenciado la producción de mucus y el desprendimiento de la región caudal en individuos expuestos a Cd. De igual manera, en este oligoqueto VIDAL y HORNE (2005) reportaron concentraciones significativas de mercurio acumuladas en la región posterior que podrían inducir autotomía. Eventos similares podrían estar llevándose a cabo en el tejido corporal de *E. complanata*.

La capacidad de bioacumular metales pesados (Cu, Zn, Hg y Cd) en la pared muscular de *E. complanata* ha sido demostrada en anteriores investigaciones (MARCANO *et al.*, 1996; REISH y GERLINGER, 1997; VÁSQUEZ-NUÑEZ *et al.*, 2007). La principal ruta de ingreso de metales pesados en anélidos se realiza en la región media, ya que posee casi la totalidad del intestino. Se presume que la capacidad de metales pesados en la porción posterior esté relacionada con mecanismos de trasportes desde las zonas de ingreso del metal (porción media) hacia la región caudal, donde celomocitos especializados cumplen un papel primordial en esta función.

Las mayores concentraciones de compuestos antioxidantes y máxima actividad enzimática se localizaron en la región media. En la región media se encuentra tejido cloragógeno (TCG) o tiflosol, un agregado de células que forman una interfase entre el epitelio alimentario, los vasos sanguíneos y el fluido celómico, el cual desempeña una función metabólica importante en anélidos análogo al hígado de los vertebrados (STÜRZEMBAUM *et al.*, 2001). Se ha conocido previamente que altas concentraciones de

Cd son acumuladas en la región intestinal en anélidos, siendo el epitelio intestinal la ruta más efectiva para la incorporación de metales pesados en comparación al ingreso a través de la pared corporal externa. En oligoquetos se ha demostrado que el TCG presenta compartimientos para depositar metales pesados bien identificados tales como los gránulos electrodensos y estructuras vesiculares (MORGAN *et al.*, 2004).

Las concentraciones de metalotioneínas (MT) y tioles totales (-SH) observadas en la región media sugiere un papel preponderante de tales compuestos en la defensa contra la toxicidad causada por tóxicos, especialmente Cd. Los incrementos en los niveles de MT, -SH, e inclusive proteínas totales (PT) en la región media y posterior reflejan una asociación con la síntesis “*de novo*” de proteínas enlazadoras ricas en grupos sulfhídricos (HERNANDEZ, 2006). Estudios comparativos en un amplio rango de especies, incluyendo poliquetos, sugieren que los metales pesados pueden ser incorporados dentro de gránulos ricos en azufre en lisosomas modificados, donde las MT y grupos -SH juegan un papel preponderante (DAS *et al.*, 2000). El ingreso de los metales pesados en las distintas porciones corporales conlleva a la síntesis de diversos compuestos químicos de distintas masas moleculares que enlazan metales (proteínas, péptidos y/o ligandos sulfhidrúlicos libres de bajo peso molecular). Tales moléculas quelantes facilitan el transporte de los metales pesados a través del fluido celómico y posterior compartimentación subcelular (por ejemplo liposomas y gotas de lípidos), para luego ser excretados a través de los nefridios (HOMA *et al.*, 2007).

La toxicidad de los metales pesados puede ser contrarrestada por la inducción de MT y la glutatona reducida (GSH). El incremento de los compuestos antioxidantes en la región media pueden denotar las respuestas compensatorias que posee el poliqueto, asociada a la defensa contra la acción directa del metal y posibles exacerbaciones oxidativas, producto de la exposición a xenobióticos. En recientes publicaciones se ha demostrado que las MT pueden desempeñar un rol protector contra el estrés oxidativo en organismo expuestos a compuestos pro-oxidantes (VIARENGO *et al.*, 2000; ZAPATA-VÍVENES y NUSETTI, 2007).

Actividad incrementada de CAT en la porción media en organismos expuestos a los distintos tóxicos podría ser el resultado de la participación de ésta enzima en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), u otros peróxidos orgánicos que se producen en el metabolismo de xenobióticos contentivos en la FALUMV. Al respecto, se conoce que el H_2O_2 es una especie del oxígeno molecular relativamente poco reactiva en los sistemas biológicos, no obstante, su potencial perjudicial se debe a que es un precursor en la formación del radical hidroxilo ($\cdot OH$) en presencia de metales de transición (Fe/Cu) como catalizadores; el mismo es un potente oxiradical que puede oxidar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (lipoperoxidación) (STOREY, 1996; HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1984; HALLIWELL y GUTTERIDGE, 1999).

Se encontró una elevada actividad de la enzima GR durante el período más largo de exposición a Cd y FALUMV. Esta elevación es paralela en algunas regiones corporales con los aumentos en los niveles celulares de $-SH$, sugiriendo como máximo representante a GSH. GR es una flavoenzima dependiente de NADPH (nicotinamin dicnucleotido fostato reducido) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH, sustrato que puede ser usado tanto para glutatión peroxidasa (GPx) tanto GST. Resultados similares fueron encontrados en *E. complanata* cuando es expuesto durante 15 y 21 días a FALUMV (NUSETTI *et al.*, 2005).

La elevada actividad de GST en las porciones media y posterior de los organismos expuestos a FALUMV, demuestran el ingreso y metabolismo de xenobióticos orgánicos, e incluso metales pesados. GST conjuga metabolitos electrofílicos a la glutatión reducida (GSH), formando complejos orgánicos hidrosolubles de fácil excreción. Dado que estas reacciones permiten la conjugación de GSH con los materiales tóxicos derivados de la actividad de citocromo- P_{450} óxido reductasa. Las formas múltiples de GST exhiben un rango amplio de actividad en presencia de diversos sustratos, como hidroxiradicales, peroxiradicales y epóxidos. Las actividades de GST se detectan comúnmente en la fracción microsomal y en el citosol, y son susceptibles a ser inducidas por exposición a sustancias pro-oxidantes (DI GIULIO *et al.*, 1995).

La actividad reducida de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en la porción posterior en los organismos expuestos a Cd y FALUMV durante los 7 días de exposición posiblemente esté relacionada con los cambios en la condición oxidativa-celular, como lo sugieren las altas concentraciones de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) encontradas en estos organismos; estas sustancias la conforman en su mayoría productos lipídicos peroxidados. La enzima G6PDH cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato con la producción de NADPH. Este último compuesto puede ser utilizado como poder reductor por la enzima GR. Por lo tanto, una reducción de la actividad de G6PDH puede conllevar a desequilibrar el estado redox GSH/GSSG, atenuando la capacidad antioxidante y aumentando el riesgo de estrés oxidativo en las porciones posteriores.

En concordancia a los resultados encontrados para la especie en estudio, en el poliqueto estuarino *Laeonereis acuta* (Nereididae) se ha reportado un gradiente en actividades de enzimas antioxidantes (DA ROSA *et al.*, 2005), exhibiendo aumentos en CAT y SOD en la región posterior, y una alta actividad de GST en la región anterior. La actividad de las enzimas antioxidantes, capacidad antioxidante total y los niveles de las especies reactivas del oxígeno varían corporalmente en el poliqueto *L. acuta* cuando es expuestos a dosis de cobre. Adicionalmente, el mayor daño a nivel del ADN se ha registrado hacia la región anterior en organismos expuestos a cobre (GERACITANO *et al.*, 2004a). FERREIRA-CRAVO *et al.* (2007), muestran que la región anterior de este poliqueto colectado en sitios impactados por metales pesados presenta una reducida capacidad antioxidante total, aunado a una alta tasa de producción de oxiradicales. Este tipo de gradiente interno del sistema de defensas antioxidantes ha sido demostrado en el capitelado *Heteromastus filiformis* con una correlación entre un gradiente externo de pO₂ y pH (ABELE *et al.*, 1998).

E. complanata mostró los mayores niveles de TBARS en la región posterior, específicamente en organismos expuestos a H₂O₂ y a la FALUMV, donde se evidenció que su sistema antioxidante probablemente es menos activo. Los altos niveles de TBARS

indican daños oxidativos asociados posiblemente a una insuficiencia en los mecanismos de defensa antioxidante del organismo durante el proceso de desintoxicación. Se parte del supuesto que la capacidad antioxidante en la región posterior en organismos expuestos a Cd y a FALUMV es sobrepasada por la producción de radicales libres (EROs); producción que puede ser mediadas por metales pesados o mediante el ciclo redox de sustancias orgánicas contentivas en la FALUMV. Se ha señalado que los metales pesados pueden actuar directa o indirectamente como catalizadores de reacciones oxidativas debido a su alta afinidad de unirse a grupos funcionales de biomoléculas.

Algunos metales pesados como el Cd, Cu y Fe, a determinadas concentraciones, pueden inducir estrés oxidativo mediante la sobreproducción de EROs por reacciones similares a la reacción de Fenton (ERCAL *et al.*, 2001). En contraparte, se ha destacado la función del tripéptido GSH, el cual puede formar complejos estables con cationes de metales pesados a nivel intracelular, representando este proceso una estrategia bioquímica de desintoxicación de potenciales contaminantes

Las concentraciones experimentales de las sustancias tóxicas probadas resultaron en alteraciones diferenciales de las respuestas de defensas antioxidantes en *E. complanata*, indicando ajustes compensatorios, en el orden bioquímico y corporal, para contrarrestar los efectos relacionados por el ingreso de metales pesados y diversos compuestos orgánicos. En síntesis, los ajustes de las defensas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, a lo largo del cuerpo del poliqueto *E. complanata* deja mostrar: (1) la eficiencia que poseen para evitar la toxicidad y exacerbaciones lipoperoxidativas en presencia de xenobióticos de distintas naturaleza en las regiones anterior y media; (2) la sensibilidad que posee la región posterior, y lo propenso a ser afectada por EROs (elevada lipoperoxidación), y (3) la autotomía de la región anterior, inducida por acumulación de metales pesados, se presenta como un mecanismo novedoso de defensa corporal que permite liberarse de concentraciones tóxicas de metales pesados.

CAPITULO III

INMUNOTOXICIDAD, RESPUESTAS CELULARES E ÍNDICES MOLECULARES DE CRECIMIENTO EN *E. complanata* Pallas, 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE) EN PRESENCIA DE CONTAMINANTES

RESUMEN

Se evaluó los efectos que producen concentraciones de Cd (200 µg/l) y una fracción hidrosoluble de lubricantes usados de motores de vehículos (al 3 %) sobre el sistema inmunológico innato-inespecífico (número total celomocitos, fagocitosis y lisozimas) en el poliqueto *E. complanata* durante un período de exposición de 21 días. Adicionalmente, se determinó el tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) y presencia de micronúcleos (FMN) en celomocitos como parámetros de estrés. En la pared corporal de los poliquetos se estimaron las concentraciones de las macromoléculas: ADN, ARN y proteínas totales (PT) y sus respectivos ratios (PT/ARN, PT/ADN y ARN/ADN) como parámetros de crecimiento. El cambio de su masa corporal fue estimado antes y después de los experimentos. Los parámetros celulares tales como viabilidad, número total (NTC) presentaron la tendencia a descender en presencia de FALUMV, no así con Cd. Paralelamente, la fagocitosis disminuyó, asociada a una alta desestabilización de las membranas lisosomales y FMN. El TRRN para cada tratamiento fue de 328,69 min para organismos controles, 172,91 min para organismos expuestos a Cd y 191,1 min para organismos expuestos FALUMV. En los organismos expuestos a FALUMV fue evidenciada la formación de micronúcleos en celomocitos con una frecuencia de 2,4/1000 células. Sólo los niveles de proteínas expresados en base a ADN (PT/ADN) en organismos expuestos a FALUMV se mostraron incrementados. El crecimiento corporal en relación a su cambio de masa, antes y después de los tratamientos, no varió entre los organismos. En Las respuestas inmunológicas en el poliqueto *E. complanata*, especialmente la fagocitosis, presentaron sensibilidad a los xenobióticos evaluados en organismos expuestos a largo plazo. Sugerimos que el incremento en la frecuencia de micronúcleos y desestabilización de la membrana lisosomales en celomocitos de poliquetos son marcadores biológicos adecuados para ser empleados en ambientes con posible sospecha de impacto por metales pesados y xenobióticos orgánicos.

INTRODUCCIÓN

El sistema de defensa inmunológico en poliquetos está constituido por celomocitos (fagocitos), moléculas bacteriolíticas y degradación a nivel lisosomal. Se conoce que la exposición a contaminantes puede alterar las funciones y el balance del sistema inmune, resultando en efectos perjudiciales, los cuales incluyen inmunosupresión, proliferación anormal celular y la alteración de los mecanismos de defensa del hospedero contra patógenos (CHENG, 1988; CHEUNG *et al.*, 2001). Las respuestas inmunológicas han servido efectivamente en monitoreos ambientales como parámetros alternativos para determinar posibles efectos toxicológicos provocados por metales pesados, que pudieran no ser evidentes mediante análisis químicos (PIPE y COLES, 1995; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012a; NARANJO, 2012). En investigaciones realizadas se ha demostrado que el sistema inmunológico puede ser más sensible a los contaminantes químicos que cualquier otro sistema funcional.

El sistema inmunológico de *E. complanata* ofrece aspectos de interés para su aplicación en estudios de toxicología ambiental. Su capacidad inmunitaria reside en el fluido celómico y lo conforma un conjunto de elementos funcionales no específicos, humorales y celulares mediados, que presentan cierta analogía a los mecanismos de inmunidad de otros organismos de diferentes taxas (ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2005). Por lo tanto, las respectivas repuestas de defensa interna del poliqueto son apropiadas para ser usadas como biomarcadores en el análisis de riesgo biológicos de la exposición a productos químicos en el ambiente marino.

La susceptibilidad de las defensas inmunológicas de *E. complanata* a ciertos contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos ha sido examinada en condiciones experimentales subletales, agudas y crónicas. Específicamente, los metales pesados, compuestos organoclorados e inclusive hidrocarburos aromáticos policíclicos han mostrado efectos supresores sobre la capacidad de los celomocitos, *in vitro*, de reconocer y aglutinar antígenos, y efectos inhibitorios sobre la actividad de los fagocitos y de la lisozima en el

celoma (CÓRDOVA-COVA, 1995). Las alteraciones funcionales incluyen inhibición de los diferentes mecanismos no específicos y específicos de los procesos de defensa interna. En general, estas observaciones han permitido reconocer atributos inmunológicos comunes en el reino animal que son especialmente sensibles.

Diversos autores han diagnosticado efectos de agentes xenobióticos sobre las respuestas inmunológicas en células sanguíneas de invertebrados marinos tales como número total de células (SÁNCHEZ, 2008), viabilidad (NARANJO, 2012), formación de rosetas secretoras y eritrocitarias (CORDOVA-COVA, 1995; NUSSETTI *et al.*, 1998), lizosimas y fagocitosis (MARCANO *et al.*, 1997; ZAPATA-VIVENES *et al.*, 2005). Las respuestas inmunológicas medidas “*in vitro*” son en gran parte dependiente de la interacción de diversos factores o procesos bioquímicos que ocurren “*in vivo*” y ejercen efectos determinantes sobre los diferentes elementos funcionales del sistema inmune de distintas especies. La inmunocompetencia de un organismo puede ser afectada negativamente por la exposición a determinados agentes químicos en el ambiente, pues los componentes a escala celular y molecular del sistema de defensa interna son blancos potenciales de las sustancias contaminantes. Por lo tanto, examinar las respuestas del sistema inmune de los poliquetos y la evaluación de los efectos de la contaminación química sobre este proceso, brinda la posibilidad de aumentar la capacidad técnica del uso de estos organismos en análisis de riesgos biológicos sobre bentos marinos costeros impactados por contaminación.

El efecto de xenobióticos a nivel celular puede ser detectado, de igual forma, por alteraciones de la estabilidad de membranas lisosomales, considerándose que el grado de desestabilización es proporcional a la magnitud del estrés (LOWE *et al.*, 1995; WEEKS y SVENDSEN, 1996). Una detección previa del estrés a nivel subletal en organismos marinos a través del uso de esta respuesta, puede llegar a proveer información adicional al diagnóstico del estado ambiental antes severas concentraciones de distintos xenobióticos que rompen la dinámica del ecosistema. La determinación de la integridad de la membrana lisosomal indica posibles condiciones deletéreas ante cambios drásticos e irreversibles que

ocurren en el ambiente, pudiendo ser una alternativa en la toma de decisiones preventivas. Este parámetro de daño celular puede estimarse mediante el tiempo de retención de colorantes, tal como el rojo neutro, presentando una relación proporcional entre la reducción del tiempo de retención en células de organismos que habitan zonas impactadas por xenobióticos (FANG *et al.*, 2008), ya que se ha demostrado que la acumulación de metales pesados se lleva a cabo en compartimientos lisosomales, lo que puede afectar la integridad funcional celular (VIARENGO y NOTT, 1993).

El crecimiento evaluado a través de los niveles de macromoléculas tales como proteínas (PT), ARN y ADN, sus cocientes y su correlación con el cambio de masa corporal, permiten estimar la condición fisiológica en los animales. Se conoce que los niveles de tales biomoléculas se encuentran relacionados con su estatus alimenticio-energético, síntesis de proteínas y volumen celular, respectivamente. En algunos invertebrados se ha demostrado que los coeficientes PT/ARN, PT/ADN y ARN/ADN son parámetros sensibles a cambios ambientales y regímenes alimenticios, sin embargo existe poca información de los mismos en presencia de xenobióticos referenciales. En peces ha sido frecuentemente utilizado para determinar efectos de concentraciones de xenobióticos y cambios de salinidad (CHOPITE y NUSETTI, 1989). Sin embargo en invertebrados marinos son muy pocos los trabajos encontrados en la bibliografía. Recientemente, ACOSTA (2001) y ACOSTA y LODEIROS (2003) contrastaron los niveles de ARN/ADN en el bivalvo *Tivela mactroides* en tres zonas costeras del oriente Venezolano, para evaluar un gradiente de contaminación en sedimentos, proponiendo al parámetro como un índice de condición en presencia de polutos. Se consideran a la relación ARN/ADN, y otros cocientes entre biomoléculas, como índices fisiológicos adecuados, los cuales reflejan el estado metabólico que presenta un organismo como producto de perturbación ambiental por contaminación de metales pesados.

En este capítulo se realizó un bioensayo de exposición usando dos sustancias contaminantes, Cd y una fracción acuosa de lubricantes de vehículo (FALUMV), para

medir la competencia del sistema inmunológico innato, la actividad de la lisozima y fagocitosis, algunos parámetros hematológicos, estabilidad de las membranas lisosomales de celomocitos y crecimiento basado en los cocientes entre proteínas, ARN y ADN en el poliqueto *E. complanata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos

Los ejemplares del poliqueto *E. complanata* maduros ($1,64 \pm 0,89$ g), sin distinción de sexo, fueron colectados manualmente por buceo autónomo a profundidades de 0 a 5 m en aguas someras de la franja costera de la zona sur del Golfo de Cariaco, en las adyacencias de la ensenada de Turpialito ($11^{\circ} 22' 30''$ N, $64^{\circ} 04' 50''$ O), en el mes de agosto del 2009. Los individuos colectados fueron transportados en envases de aislamiento térmico hasta el laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias. Los mismos fueron mantenidos durante dos semanas en acuarios con agua de mar (1 individuo por cada 4 L de agua de mar), arena del sitio de captura, aireados continuamente (90-95 %), temperatura del agua de mar 26 ± 1 °C y alimentados con tejidos congelados del cangrejo *Carcinus sp.* ($\sim 0,2$ g/día/animal).

Ensayo Subletal

Los organismos fueron expuestos en acuarios estáticos a concentraciones subletales de dos contaminantes de distinta naturaleza química: (1) 200 µg/l de cadmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y (2) 3 % v/v de una fracción soluble de aceite usados de motores de vehículos (FALUMV, proporción 1:9; lubricante: agua de mar v/v) durante un período de 21 días. Las condiciones experimentales se realizaron conforme a los procedimientos descritos en el CAPITULO II.

Colección de Celómocitos

Se procedió a colectar el fluido celómico por punción directa en el celoma usando una jeringa hipodérmica de 1 ml de capacidad, esterilizada, con aguja calibre 20, conteniendo 0,5 ml agua de mar estéril y EDTA 4 mmol/l, filtrada a miliporo (45 µm). El volumen de hemolinfa extraído ($\sim 0,2-0,3$ ml) fue posteriormente transferido a tubos de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, manteniéndose a una temperatura de 10°C. Luego, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C, se tomó la fracción

precipitada, la cual fue re-suspendida en 1 ml de agua de mar filtrada con EDTA.

Viabilidad y Número Total de Celomocitos

Esta respuesta fue determinada por tinción diferencial con el colorante azul de tripano al 0,4 % (NUSETTI *et al.*, 1998). Se mezclaron 10 µl de la suspensión final de celomocitos con un volumen igual de azul de tripano, se resuspendió y se contaron las células en un hemocitómetro por microscopía de luz (400 X). Las células vivas fueron diferenciadas de las muertas porque éstas últimas toman una coloración azul. La viabilidad fue expresada como porcentaje (%) de células vivas. El número total de hemocitos por ml se determinó en los cuatro cuadrantes de la cámara y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Número de células/ml= $(X/2) 10^4$ (GOVEN *et al.*, 1996).

Fagocitosis

El fluido celómico fue incubado con una suspensión de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) a una concentración de 10^6 de células por mililitro (3:1) a una temperatura de 8 °C durante 6 horas. Se calculó el porcentaje de celomocitos que contenían al menos una levadura o resto de ellas en su citoplasma, de acuerdo a la fórmula: fagocitosis (%)= (células fagocitarias/células Totales) x 100.

Ensayo de micronúcleos

Se realizó un fijado de células en una mezcla metanol: ácido acético (3:1) (UNEP/RAMOGE, 1999) durante 10 -15 min. El frotis fue coloreado con Giemsa al 3 % durante 30 min, y lavado posteriormente con agua bidestilada. Se dejó secar a temperatura ambiente. Las observaciones fueron se realizaron bajo microscopia de luz a 1000 X con aceite de inmersión. Se consideraron las células que presentaban membranas celulares y núcleos intactos, separados y con un diámetro de 1/3 con respecto al núcleo principal. Además, tales micronúcleos deben tener la misma intensidad de coloración, apariencia oval o redondeado, fragmentado (para excluir partículas pequeñas teñidas y células apostóticas), núcleo plano de enfoque y refracción. Se examinaron alrededor de 1000 células por frotis.

Los valores fueron expresados en porcentaje de micronúcleos.

Estabilidad de la Membrana Lisosomal

Cuarenta microlitros (40 μ l) de líquido celómico fueron transferidos a un portaobjetos y mantenido 15 minutos en cámara húmeda (bajo oscuridad). Se colocó 40 μ l de rojo neutro disuelto en dimetil sulfóxido en la lámina durante 15 minutos. Las observaciones se realizaron al microscopio (400 X) cada 15 minutos por una hora y cada 30 minutos las horas subsiguientes (generalmente un máximo de 2 horas). Se registró el tiempo máximo en que las células permanecen sin alteración. Las observaciones no fueron mayores a 1 minuto para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Las células se examinaron con relación a las anomalías estructurales que presentan en el tiempo de retención de rojo neutro, estimándose la proporción de células que presentan el colorante en el citosol. Se determinó el número de células con citosol totalmente teñido y citosol sin teñir (en porcentaje). Cuando el número de células teñidas fue mayor del 50% del número total de células contadas se detuvo el conteo y se estimó el tiempo de retención del rojo neutro (LOWE *et al.*, 1992; LOWE *et al.*, 1995).

Coefficiente Proteínas/ARN/ADN

Un gramo de tejido muscular fue homogenizado en 10 ml de buffer salino ($\text{NaHPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$). Un ml de extracto homogenizado se les añadió 1 ml de ácido perclórico (APC) al 0,4 N y se dejó reposar por 1 hora a 8 °C. El precipitado se lavó con APC al 0,1 N y se disolvió con KOH al 0,3 N a 37°C durante una hora. Después de este tiempo se extrajo una alícuota para determinación de proteínas por método de LOWRY *et al.* (1951).

El ARN y ADN fueron separados por precipitación con 1 ml de APC 1 N con centrifugación a 4 °C. El ARN contenido en el sobrenadante y ADN en el precipitado. El precipitado fue calentado con APC a 80°C por un período de 20 min. El ARN fue determinado por el método de revelación por orcinol (CAMBELL y SARGENT, 1967), y

el ADN mediante la reacción de difenilamina (BURTON, 1956). Se usó como sustancia referencial ARN de levadura (*S. cerevicea*) y ADN de timo de bovino.

Tasa de crecimiento

Los animales expuestos a los xenobióticos y controles fueron pesados, antes y después de cada período de exposición. La tasa de crecimiento (TC) se determinó por la ecuación de MARTIN (1986), donde Mo es la masa del animal antes del experimento y Mf es la masa final, determinados por la siguiente fórmula: $TC = \ln Mf/Mo \times 100$.

Análisis Estadísticos

Para el procesamiento de los datos se usó un Análisis de varianza de simple mediante el programa computarizado Statgraphic Plus versión 5.1 (ambiente Window). Para el contraste “a posteriori” se aplicó una prueba de Bonferroni (SOKAL y ROHLF, 1981).

RESULTADOS

La FIGURA 5 (A) muestra una ligera tendencia a la reducción en los porcentajes de viabilidad, aunque no significativa, en los celomocitos de poliquetos expuestos a FALUMV, registrándose promedios de $89,05 \% \pm 7,77$ en comparación a los organismos controles ($94,33 \% \pm 1,69$) ($F_s = 1,69$; $p > 0,05$). En el número total de celomocitos (NTC) presentó diferencias significativas, obteniendo sus promedios más bajos en los poliquetos expuestos a FALUMV ($172,0 \pm 32,25$ celomocitos $\times 10^3/\text{ml}$), en contraste a los organismos expuestos a Cd ($194,5 \pm 29,28$ celomocitos $\times 10^3/\text{ml}$) y controles ($211,83 \pm 23,40$ celomocitos $\times 10^3/\text{ml}$) ($F_s = 3,94$, $p < 0,05$) (FIGURA 5B).

El número de fagocitos (FIGURA 5C) muestra una reducida actividad de 1,56 veces en los poliquetos expuestos a FALUMV al 3 % con respecto a los organismos controles ($F_s = 6,0$, $p < 0,05$). Los organismos expuestos a Cd presentaron mayor promedio en la actividad fagocítica, pero no presentaron diferencias significativas con respecto al control. La actividad de lisozimas ($F_s = 1,57$, $p > 0,05$) no fue afectada por los tratamientos de Cd y FALUMV (FIGURA 5D).

El mayor porcentaje de celomocitos con desestabilización en sus membranas lisosomales (DML) fue observado en los poliquetos expuestos a FALUMV (FIGURA 6), los cuales alcanzan promedios mayores al 50 % de daño celular en un período de 120-180 minutos ($F_s = 16,77$; $p < 0,05$). Los tiempos de retención del rojo neutro para cada tratamiento fueron de 328,69 min para organismos controles, 172,91 min para organismos expuestos a Cd y 191,1 min para organismos expuestos FALUMV.

En los organismos expuestos a FALUMV fue evidenciada la formación de micronúcleos en celomocitos con una frecuencia de 2,4/1000 células ($F_s = 14,0$; $p < 0,05$). En cambio, el tratamiento con Cd no causó variaciones en comparación con los organismos controles (FIGURA 7).

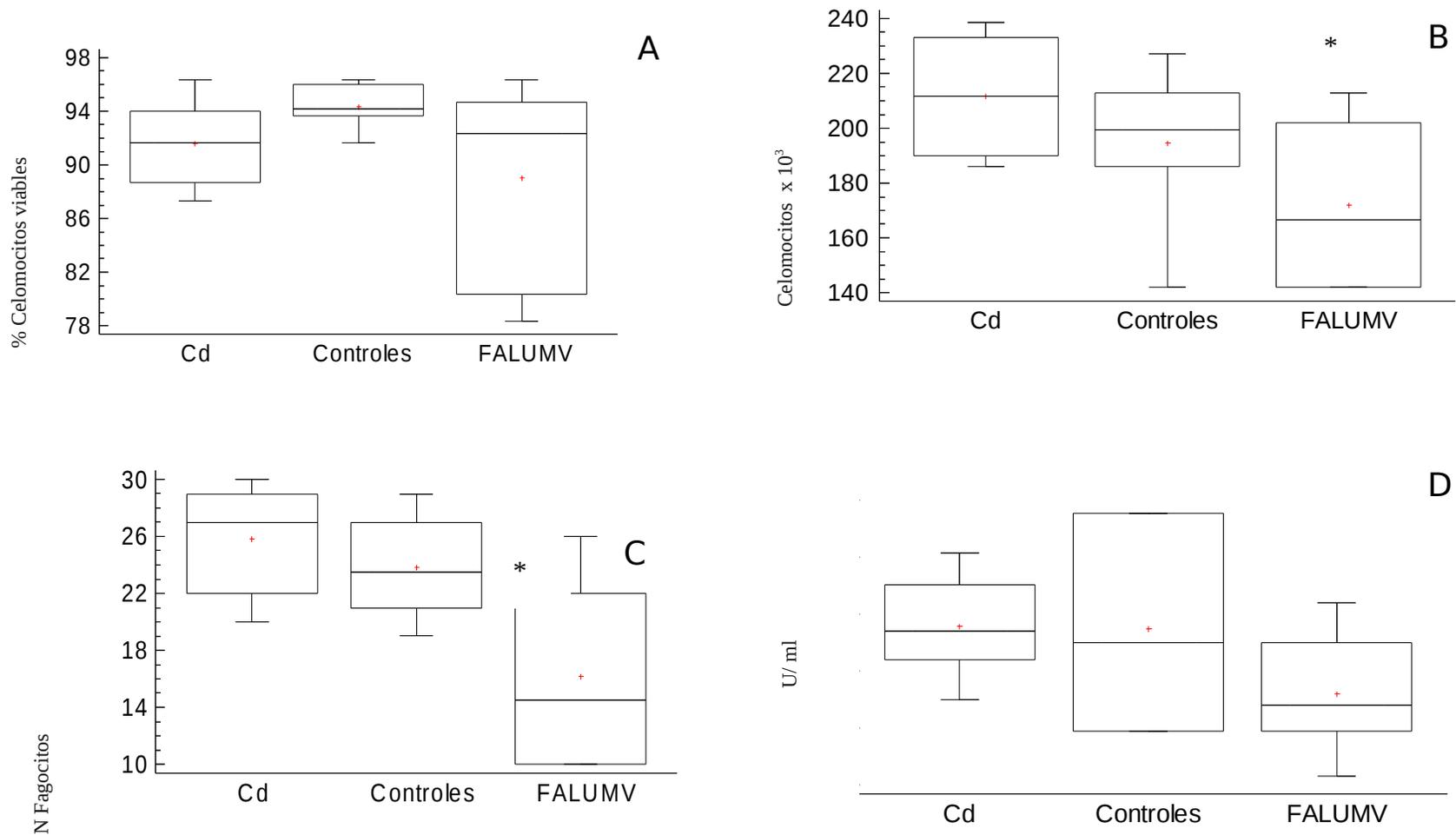


FIGURA 5. Viabilidad (A), número total (B), fagocitosis (C) y Actividad de lisozimas (D) en *E. complanata* expuestos a distintos xenobióticos durante 21 días. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

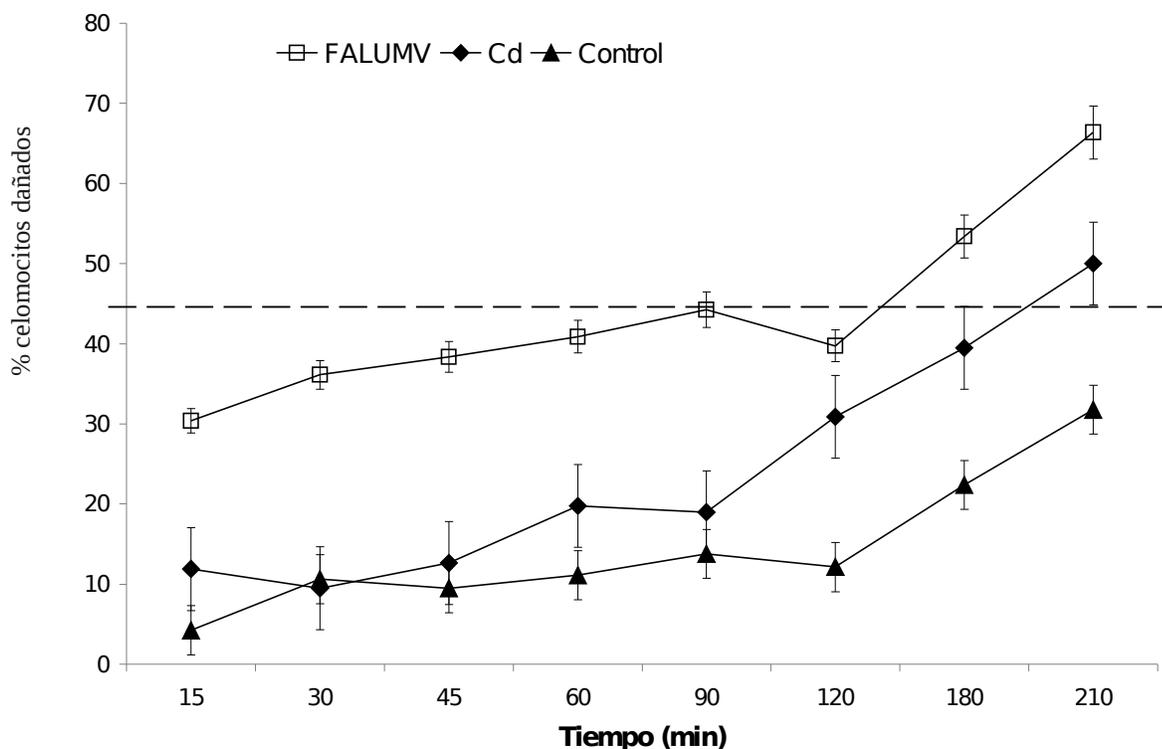


FIGURA 6. Porcentaje de células con membranas lisosomales desestabilizadas en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. La zona punteada muestra la estimación del daño al 50 % de los celomocitos.

Los niveles de macromoléculas tales como proteínas (PT) ($F_s=0,39$; $p>0,05$), ARN ($F_s=0,02$; $p>0,05$) y ADN ($F_s=0,98$; $p>0,05$), y los radios de crecimiento PT/ARN ($F_s=0,99$; $p>0,05$) y ARN/ADN ($F_s=0,93$; $p>0,05$) no mostraron variabilidad en presencia de las dos concentraciones de Cd y FALUMV con respecto al grupo control (FIGURA 8). Sin embargo, los niveles de proteínas expresados en base a ADN (PT/ADN) en organismos expuestos a FALUMV se mostraron estadísticamente incrementados ($F_s=5,6$; $p>0,05$) (FIGURA 9). Aunque, el crecimiento corporal en relación a su cambio de masa, antes y después de los tratamientos, no varió entre los organismos ($F_s=2,04$; $p>0,05$), los mismos mostraron promedios de 10,32; 11,2 y 8,43 para control, expuestos a Cd y FALUMV, respectivamente (FIGURA 10).

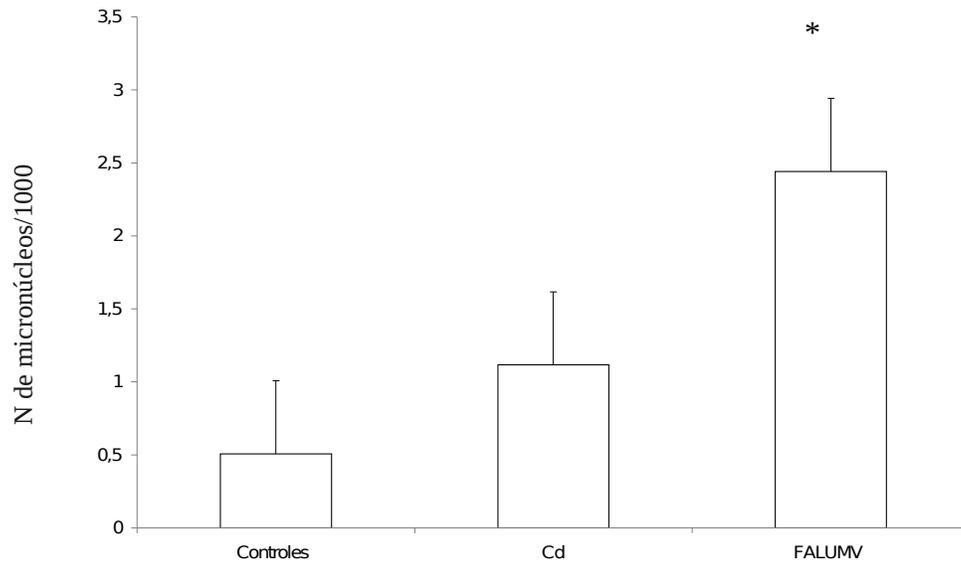


FIGURA 7. Frecuencia de micronúcleos en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

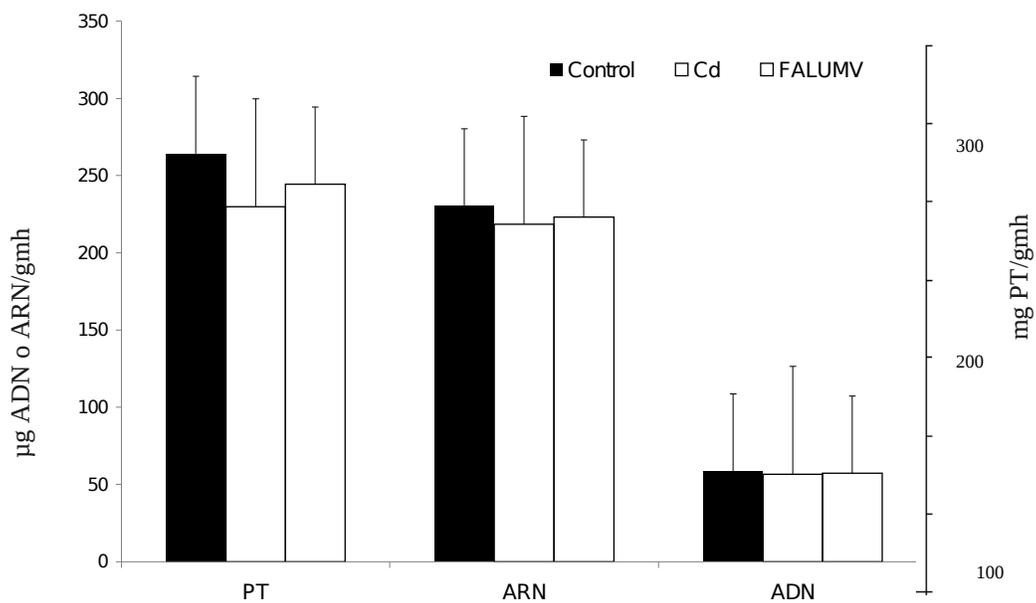


FIGURA 8. Concentración de proteínas, ARN y ADN en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo.

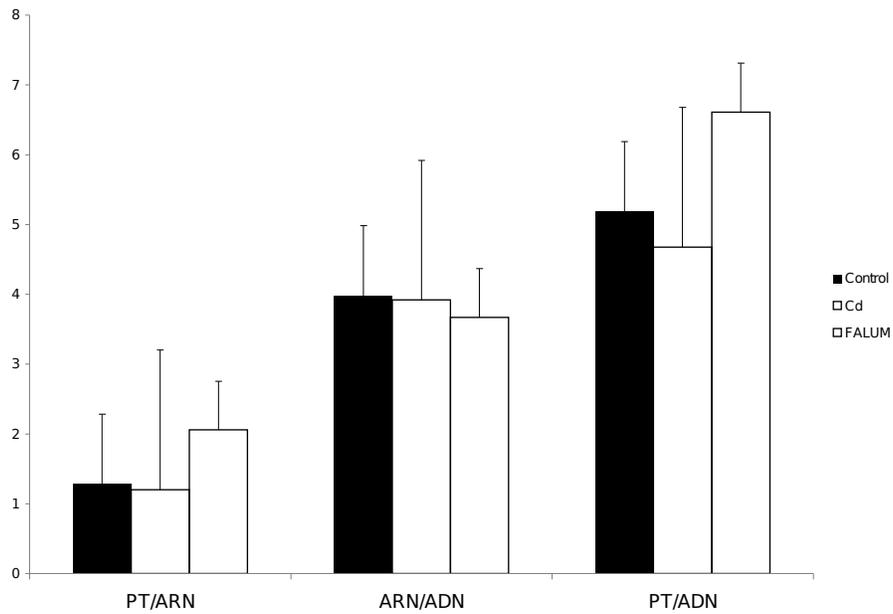


FIGURA 9. Radios PT/ARN, ARN/ADN y PT/ADN en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

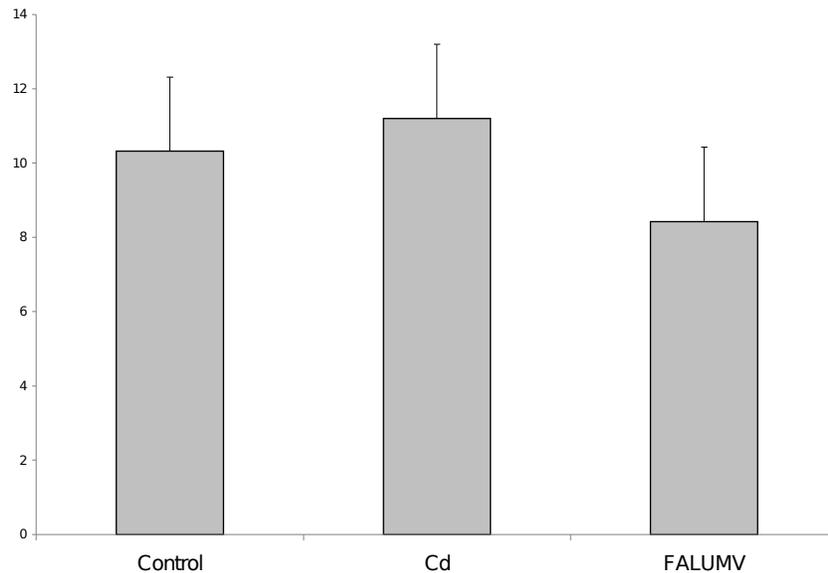


FIGURA 10. Tasa de crecimiento corporal en poliquetos expuestos a FALUMV y Cd por 21 días. Las barras y las extensiones denotan las medias y las desviaciones estándares de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

DISCUSIÓN

Los resultados revelaron que las respuestas celulares e inmunológicas tales como el número total de células (NTC), fagocitosis, aparición de micronúcleos y la estabilidad de las membranas lisosomales de celomocitos presentaron alta sensibilidad en presencia de concentraciones subletales de Cd y mezclas complejas de contaminantes hidrosolubles (FALUMV), en un período crónico. Además, estos xenobióticos provocaron variabilidad en los cocientes entre las concentraciones de proteínas y ADN.

El número total de células circundante en el fluido celómico puede reflejar cierta vulnerabilidad celomopoyética, lo cual implica disminución en los procesos de división, diferenciación y maduración de células precursoras de celomocitos. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad no mostró ninguna perturbación en presencia de los xenobióticos, lo que demuestra que los efectos observados en las respuestas celulares, muestran estar relacionado exclusivamente a las concentraciones subletales usadas. Los cambios en el NTC indican un posible impacto de los xenobióticos sobre los centros hematopoyéticos (formadores de celomocitos) o la autólisis de celomocitos maduros.

La fagocitosis es una de las respuestas que con mayor frecuencia ha sido usada para estimar efectos de xenobióticos a nivel inmunológico. En este trabajo, tal respuesta muestra una tendencia a disminuir en organismos contaminados con FALUMV. Se ha de suponer que la supresión de la actividad fagocítica pareciera ser una respuesta común en organismos, invertebrados y vertebrados, expuestos a metales pesados (MARCANO *et al.*, 1997) y a fracciones solubles de hidrocarburos (MARCANO *et al.*, 2006). La disminución de la actividad fagocítica en celomocitos aumenta los riesgos de infecciones bacterianas, en todo caso, el proceso de contaminación es el elemento estresor principal asociado a los cambios en el sistema interno de defensa, que son manifestaciones de efectos de toxicidad capaces de incidir negativamente en la condición de salud del organismo.

La fagocitosis es la primera línea de defensa contra la invasión de microorganismos.

Durante este proceso, el agente invasor es englobado, internalizado y destruido intracelularmente por los celomocitos, a través de mecanismos microbicidas conocidos. En distintas publicaciones ha sido demostrado que los celomocitos granulares son las células encargadas del proceso fagocítico. Tales células poseen lisosomas que pueden fundirse con las vesículas endosómicas o fagosomas, liberando una diversidad de factores inmunológicos como la finalidad de neutralizar y destruir a los agentes invasores, tales como enzimas hidrolíticas, factores microbianos y especies reactivas del oxígeno (GOVEN *et al.*, 1994; GOVEN y KENNEDY, 1996). CHENG (1988) y CHEUNG *et al.*, (2001) reportan efectos perjudiciales en los bivalvos *Crassostrea virginica* y *Perna viridis*, los cuales incluyen inmunosupresión celular en estos invertebrados marinos en presencia de xenobióticos. Contrariamente, NARANJO (2012) y ZAPATA-VÍVENES *et al.* (2012a) reportan una proliferación anormal de hemocitos en camarones y bivalvos expuestos de Cd y FALUMV, respectivamente.

La lisozima es una enzima antimicrobiana que 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 (GOVEN *et al.*, 1994). Este mecanismo de protección ha sido descrito en *E. complanata* (MARCANO *et al.*, 1997; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2005) y el bivalvo *Lima scabra* (SÁNCHEZ, 2008). Contrariamente, se ha observado incrementos en la actividades de la lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata* expuesta a corto plazo a FALUMV (ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012a).

En otro estudio, usando a *P. imbricata* como modelo, mostró que básicamente la capacidad fagocítica de los hemocitos y la actividad lítica microbiana de la lisozima no fueron adversamente comprometidos durante el proceso de contaminación subletal por fracciones acuosas de una formulación de petróleos pesados (NUSETTI *et al.*, 2004). La modulación del sistema inmunológico por agentes contaminantes ha sido descrita en una variedad de invertebrados acuáticos (LIVINGSTON *et al.*, 2001). Por lo general la exposición crónica a sustancias orgánicas (hidrocarburos aromáticos, pesticidas, bifenilos

policlorados, entre otros) ejercen efectos negativos sobre la actividad fagocítica (FOURNIER *et al.*, 2000). Sin embargo, esta tendencia de disfunción inmunológica no es una constante en condiciones agudas; puede ocurrir estimulación o inhibición de la fagocitosis. Los xenobióticos persistentes en el ambiente pueden afectar algunas funciones de los hemocitos, en particular la fagocitosis (BROUSSEAU *et al.*, 2000), la capacidad de agregación la cual es crucial para la encapsulación de partículas extrañas, cicatrización (ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2005) y la habilidad de producir especies reactivas del oxígeno como radicales antibacterianos (LIVINGSTON, 2001).

La sensibilidad en organismos acuáticos a los metales pesados depende de la actividad biológica del metal involucrado. Se sabe que el Cd no posee una función biológica conocida y que interfiere con los procesos fisiológicos normales. Al parecer en los sistemas biológicos el Cd puede competir con el zinc, cobre y calcio por los sitios de unión en las macromoléculas. Su competencia con el calcio, se debe a que este metal presenta un radio iónico semejante al calcio (SALAZAR-LUGO, 2009). A nivel molecular, los efectos del Cd están relacionados con la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, específicamente a nivel del complejo III en el sitio de unión de la semiubiquinona, afectando la transferencia de electrones. La semiubiquinona, transfiere un electrón al oxígeno molecular para formar el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (WU y CHEN, 2004).

ZAPATA-VÍVENES *et al.* (2005) reportan que las lisozimas de la pared corporal y la fagocitosis en el fluido celómico de *E. complanata* manifiestan ser elementos de un sistema de defensa adaptativo contra la infección microbiana, susceptible a la acción tóxica subletal aguda del cobre. Se conoce que el incremento en los niveles basales de la lisozima probablemente refleja un mecanismo de defensa humoral, el cual protege al organismo de bacterias que viven en su ambiente. La inducción de la actividad de la lisozima posiblemente está asociada a la función de un mecanismo de vigilancia de primera línea en los procesos de reconocimiento de la carga infecciosa bacteriana y potenciación de la capacidad bacteriolítica.

MARCANO *et al.* (1997) reportó que la contaminación subletal con cobre en poliquetos inhibió la actividad de la lisozima en los organismos sensibilizados con *M. lysoleickticus*. Estos autores demuestran que la exposición subletal aguda y crónica de *E. complanata* al cobre puede alterar la capacidad de los celomocitos de formar rosetas secretorias y eritrocíticas, indicando deficiencias en los mecanismos de reconocimiento antigénico y en la producción de lectinas con la consecuente disminución de la inmunocompetencia humoral y celular (CÓRDOVA-COVA, 1995; NUSETTI *et al.*, 1998). Observaciones similares han sido señaladas para la lombriz de tierra *L. terrestris* contaminada con bifenilos policlorados (RODRIGUÉZ-GRAU *et al.*, 1989; GOVEN *et al.*, 1994).

El ensayo del tiempo de retención del rojo neutro (TRRN) muestra el efecto que sobre la estabilidad e integridad de las membranas lisosomales que poseen algunos xenobióticos orgánicos e inorgánicos. Los resultados muestran que el sistema lisosomal en los poliquetos expuestos a Cd y FALUMV puede constituir un blanco subcelular susceptible. Los celomocitos de organismos controles retuvieron el colorante por largos períodos (> a las 4 horas de ensayo) mostrando la efectividad de reducir la toxicidad el colorante en el interior de la célula. En contraste, en células estresadas por ambos contaminantes se observó que el colorante difunde al citoplasma más rápidamente, dando reducidos valores en el TRRN. A pesar de existir diferencias significativas entre los tratamientos usados, los promedios en los organismos expuestos muestran la tolerancia que poseen los organismos en presencia de tóxicos.

En numerosas investigaciones, se ha estimado que el TRRN en células sanguíneas en invertebrados marinos contaminados oscila entre 60 a 120 minutos para alcanzar el 50 % de células dañadas por el colorante (NASCIMIENTO *et al.*, 2002). Se ha evidenciado que cuando se evalúa este parámetro en moluscos que habitan áreas impactadas puede reflejar el estrés químico de los organismos afectados. En anélidos terrestres se ha usado esta técnica para evaluar efectos de clorpirifos en celomocitos de *E. foetida*, registrándose valores reducidos en los organismos expuestos al toxico. En el camarón *L. vannamei* se

observó una disminución en el TRRN en organismos expuestos a Cd, manifestando una relación dosis-respuesta, en concentraciones relativamente bajas de este metal (NARANJO, 2012).

El incremento en los promedios entre la relación de proteínas (PT) y ADN sigue la activación de mecanismos de compensación bioquímica relacionados con la síntesis de proteínas. La formación de nuevas biomoléculas posiblemente se encuentre vinculada con la captación, defensa y desintoxicación de compuestos metálicos y orgánicos que ingresan en las células de la pared corporal. Dentro de estas proteínas se pueden encontrar moléculas de distintas masas moleculares, que incluyen a las metalotioneínas (MT). En el CAPÍTULO II se reportó el incremento en los niveles de proteínas totales y de estas proteínas especializadas, en un tiempo de duración más corto, en poliquetos expuestos a ambas fuentes de xenobióticos. Se puede justificar una alta capacidad de síntesis de macromoléculas en poliquetos asociada posiblemente con el crecimiento y regeneración de tejidos. Se conoce que la actividad de transcripción y síntesis de proteínas son de importancia en las fases iniciales de diferenciación en el proceso de regeneración tisular por traumas en el poliqueto *Owenia fusiformis* (FONTES *et al.*, 1980).

El contenido de ADN en la pared corporal del poliqueto al parecer es independiente de la condición nutricional, no así PT y ARN (SALAZAR *et al.*, 1997). Así, el radio ARN/DNA y la concentración de RNA reflejaron que la intensidad metabólica celular es similar en los poliquetos bajo tratamiento, considerando que la condición y el crecimiento no fueron afectados por los tóxicos. Similarmente, SALAZAR-LUGO (1993) y NUSSETTI *et al.* (1998) no hallaron cambios significativos en tales radios de crecimiento en *E. complanata* expuestos a una dosis subletal de Cu. En otro orden de ideas, MENDOZA-ALFARO *et al.*, (2002) considera que la concentración de DNA, es considerado un indicador del número de células y no presenta sensibilidad a los cambios en las condiciones ambientales.

En este trabajo no fueron evidenciados cambios en el crecimiento corporal de los

poliquetos controles cuando se contrastan con los organismo expuestos a Cd y FALUMV, lo que refleja que sus condiciones fisiológicas y corporales no fueron alteradas, al menos en relación a este parámetro. En síntesis, las respuestas inmunológicas en el poliqueto *E. complanata*, especialmente la fagocitosis, presentaron sensibilidad a los xenobióticos evaluados en organismos expuestos a largo plazo. Sugerimos que el incremento en la frecuencia de micronúcleos y desestabilización de la membrana lisosomales en celomocitos de poliquetos son marcadores biológicos adecuados para ser empleados en ambientes con posible sospecha de impacto por metales pesados y xenobióticos orgánicos.

CAPITULO IV

VARIACIÓN ESTACIONAL EN LAS RESPUESTAS ANTIOXIDANTES Y PARÁMETROS MOLECULARES DE CRECIMIENTO EN *Eurythoe complanata* Pallas, 1766 (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE)

RESUMEN

Las respuestas antioxidantes e índices molecular de crecimiento (proteínas/ARN, proteínas/ADN y ARN/ADN) han sido frecuentemente usados como biomarcadores de toxicidad en ensayos estáticos usando a *E. complanata*. Sin embargo, no se posee información sobre las variaciones de tales respuestas con respecto a los cambios de temperaturas registrados en su hábitat. Para tal fin, se realizaron colectas de poliquetos en las adyacencias de la Ensenada de Turpialito en el golfo de Cariaco ($10^{\circ} 27' 30''$ N, $64^{\circ} 01' 52''$ O), durante los meses de diciembre del 2009 ($26,03 \pm 0,64^{\circ}\text{C}$), febrero ($23,96 \pm 0,67^{\circ}\text{C}$), junio ($27,82 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$) y octubre del 2010 ($29,93 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$). Al mismo tiempo, se estimó en cada colecta se estimó el número de organismos en crecimiento (regenerados). Se realizaron ensayos de aclimatación en poliquetos bajo diferentes temperaturas (24 y 28°C). La pared muscular se usó para determinar la actividad de enzimas catalasa, glutatióna transferasa, glucosa-6-P deshidrogenasa, daño a lípidos de membranas, metalotioneínas y grupos tioles, y parámetros moleculares de crecimiento (índices PT/ARN, PT/ADN y ARN/ADN). Se demostró que las actividades de CAT, además de TBARS pueden ser moduladas durante los cambios estacionales de temperaturas, logrando un incremento significativo en los poliquetos expuestos a temperaturas que sobrepasan los 28°C ; temperaturas ambientales que corresponden con los meses de colecta de junio y octubre. Los niveles de ADN mostraron un incremento durante los meses de junio y octubre, los cuales tienen una correspondencia significativa con el número de individuos regenerados (37-62 %); cambios que no mostraron asociación con los índices moleculares. Estas ligeras variaciones en las defensas antioxidantes forman parte de los mecanismos bioquímicos de ajustes por producción de oxirradicales relacionados con cambios oscilantes de temperaturas. El índice ARN/ADN mostró un crecimiento continuo de la especie, sin variaciones. El elevado porcentaje de individuos con formación de nuevos segmentos revelan asociación con el ciclo de reproducción sexual o capacidad de crecimiento somático con los meses de elevada temperatura en aguas del golfo de Cariaco.

INTRODUCCIÓN

El uso de invertebrados marinos, con particular interés en bivalvos y anélidos, en el monitoreo ambiental ha incrementado significativamente en los últimos años, sobretodo en investigaciones sobre las variaciones naturales o estacionales, ya sea por efectos de sustancias antropogénicas que actúan como pro-oxidantes y la capacidad de acumulación en ambientes marinos. Se ha hecho de uso frecuente la determinación de las actividades de las enzimas y compuestos antioxidantes en organismos acuáticos con el objetivo de proveer información sobre las modulaciones que pueden inducir sobre los organismos marinos los cambios ambientales (temperatura), dietas y contaminantes (BOCCHETTI *et al.*, 2008); estos factores anteriormente nombrados pueden influenciar la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). Como los organismos dependen de la temperatura, muchos de los poliquetos deben cambiar su actividad basal y tasa metabólica concomitantemente con las fluctuaciones de temperatura que se registran en el ambiente, consecuentemente a estos eventos existe una oscilación en los niveles de EROs.

Existen pocos estudios que relacionen las variaciones de estatus antioxidantes en poliquetos en relación a efectos de agentes externos. Aunque, se ha demostrado que la generación de las EROs, la tasa de oxidación y el estatus de moléculas antioxidantes está relacionado directamente con la temperatura y la actividad metabólica en vertebrados (WILHELM-FILHO *et al.*, 2000). Los organismos están expuestos diaria y estacionalmente a cambios de temperaturas y disponibilidad de oxígeno, eventos que pueden modificar la producción de EROs, por tal motivo los cambios en las actividades de las enzimas y algunos biomarcadores de daños oxidativos p.e. la lipoperoxidación, han sido sugeridos como biomarcadores específicos de estrés oxidativo.

Se parte del criterio que las defensas moleculares antioxidantes pueden cambiar su actividad en relación a las modulaciones de las temperaturas ambientales. Este detalle está fundamentado en reportes de algunos trabajos que lo han demostrado en distintas taxas: *Liza ramada* (SHEEHAN y POWER 1999), *Mytilus galloprovincialis* (BORKOVIĆ *et al.*, 2005), *Modiolus modiolus* (LESSER *et al.*, 2004), *Mytilus edulis* (MANDUZIO *et al.*, 2004), *Perna perna* (WILHELM-FILHO, 2001), *Laeonereys acuta* (FERREIRA-CRAVO *et al.*, 2007) y *Callinectes amnicola* (OLAKOLU *et al.*, 2012)

La evaluación de los sistemas bioquímicos provee información acerca de los cambios que pueden provocar algunos tóxicos, a nivel celular y molecular. Tales sistemas constituyen la primera línea de respuesta frente a una situación de estrés. En distintas especies de invertebrados ha sido estudiado el sistema de monooxigenasa de función múltiple (MFO), encargado de la bio-transformación y activación de sustancias xenobióticas (LEE, 1981). Sin embargo, el metabolismo de xenobióticos puede conllevar la producción exacerbada de especies moléculas altamente reactivas tales como el anión superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet) (FRIDOVICH, 1998).

Las fuentes biológicas que originan radicales libres suelen ser diversas e incluyen fotosensibilización de pigmentos, radiaciones ultravioleta, reacciones mediadas por metales pesados de transición, ciclo redox de xenobióticos, fagocitosis, temperatura, entre otros. (HALLIWEL y GUTTERIDGE, 1984; LIVINGSTONE, 2001). Los radicales libres del oxígeno u oxiradicales producen variedades de efectos a nivel celular tales como peroxidación lipídica, daños a los ácidos nucleicos, efectos directos e indirectos sobre la síntesis del ATP, inactivación enzimática y degradación de proteínas (MARIN *et al.*, 1993).

Las EROs son controladas por un sistema de defensa antioxidante efectivo, capaz de reducirlas a niveles fisiológicamente aceptables. Dentro del sistema de defensa enzimático se encuentran la catalasa (CAT), glutatona reductasa (GR), glutatona peroxidasa (GPx), glutatona-S-transferasa (GST), las cuales participan efectivamente en barrer oxiradicales

como respuesta funcional contra los procesos de deterioro celular, evitando el estrés oxidativo. CAT y GPx funcionan conjuntamente para eliminar peróxido de hidrógeno y especies reactivas peroxidadas, respectivamente. GR contribuye al balance normal de la glutatona reducida y glutatona oxidada, cumpliendo un papel esencial en el metabolismo y control de agentes pro-oxidantes. GST interviene en la conjugación de algunos metabolitos electrofílicos (tales como epóxidos producidos por el P₄₅₀) con la glutatona reducida (GSH), permitiendo la excreción de sustancias tóxicas. Se incluye dentro del sistema antioxidantes a compuestos como GSH y las metalotioneínas. Las alteraciones en los niveles de estos compuestos y de los sistemas enzimáticos antioxidantes por influencia de agentes contaminantes, usualmente preceden a las manifestaciones asociadas con el estrés oxidativo, por ejemplo: deficiencias metabólicas, inmunológicas, incapacidad de cicatrización, crecimiento retardado, entre otras.

El crecimiento es una medida integral del metabolismo de los organismos, siendo sensible a efectos estresantes que incluyen factores físicos y químicos. *E. complanata* es un organismo de crecimiento corporal continuo, tanto para reproducción asexual como para regeneración de sus porciones corporales que son lesionadas (ZAPATA-VIVENES, 2001). Estos procesos implican un gasto energético importante que involucra la síntesis de biomoléculas para la división y el crecimiento celular. La determinación de los niveles de macromoléculas relacionadas con el crecimiento (proteínas, ARN y ADN) y sus respectivos cocientes se ha hecho de uso extensivo en organismos acuáticos colectados en ambientes naturales, bajo condiciones controladas en el laboratorio como indicadores de crecimiento o estrés (NUSETTI y MORALES, 1988, LEMUS, 2005).

Se presume que la cantidad de ADN por célula es estable, y su incremento puede dar referencias acerca de la actividad mitótica (proliferación celular). Sin embargo, el contenido de ARN (generalmente el ARNr) y proteínas totales (PT) indican la capacidad de la síntesis proteica, indicando disponibilidad de transcritos y ensamblaje de proteínas. En consecuencia, las relaciones PT/ADN, PT/ARN y ARN/ADN se han identificado como parámetros de crecimiento molecular instantáneo (BULOW, 1987). Estos valores y

relaciones de biomoléculas pueden ser afectadas por la condición nutricional del organismo (MENDOZA *et al.*, 2002), metales pesados (LEMUS, 1992) y temperatura (LEMUS, 2005).

Para proponer respuestas moleculares como herramientas de evaluación de calidad ambiental es necesario conocer como tales parámetros pueden variar en presencia de estresores ambientales por ejemplo, los cambios estacionales de temperatura. En referencia a lo antes expuesto, en esta investigación evaluó como varían estacionalmente una batería de biomarcadores moleculares y celulares donde se incluyen las respuestas antioxidantes, estabilidad lisosomal y composición biomoléculas (proteínas, ARN y ADN) en el poliqueto *E. complanata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Organismos

Los ejemplares del poliqueto *E. complanata* fueron colectados manualmente en aguas someras de la franja costera de la zona sur del Golfo de Cariaco, en las adyacencias de la ensenada de Turpialito (11° 22' 30'' N, 64° 04' 50'' O), en el mes de diciembre del 2009 ($26,03 \pm 0,64^{\circ}\text{C}$), febrero ($23,96 \pm 0,67^{\circ}\text{C}$), junio ($27,82 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$) y octubre del 2010 ($29,93 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$). El tracto intestinal de los individuos fue disecado y su porción muscular fue lavada con agua bidestilada y almacenada a -20°C . Los valores promedios mensuales de temperatura fueron registrados por un termógrafo.

Regeneración

En organismos colectados en el ambiente se determinó el número de individuos (expresado en porcentaje) con signos de formación de nuevos segmentos en la región anterior o posterior. También fue determinada la sumatoria del número de segmentos regenerados por cada individuo.

Bioensayos

Dos grupos de organismos ($n=20$), por separados, fueron mantenidos en acuarios a diferentes temperaturas $24,08 \pm 0,41$ (considerada 24°C) y $27,97 \pm 1,02$ (considerada 28°C) por un período de 36 días, en tiempos desfasados. Se procedió a medir, tanto en organismos colectados en las distintas épocas como en los ejemplares aclimatados a distintas temperaturas (considerados organismos referenciales), los niveles de compuestos antioxidantes (metalotioneínas y grupos sulfhidrilos), actividad enzimática de CAT, GST y

G6PDH, concentración de ADN, ARN y proteínas y sus respectivos cocientes relacionados.

Análisis Bioquímicos

Los niveles de metalotioneínas fueron estimados por el método de VIARENGO *et al.*, (1997) y grupos sulfhidrilos totales por método colorimétrico de ELLMAN (1958). La actividad de las enzimas CAT, GST y G6PDH fueron determinadas por los protocolos estandarizados propuestos por ZAPATA-VÍVENES (2001), y daño lipoperoxidativos (TBARS) por la metodología de OHKAWA *et al.*, (1979) (métodos descritos en CAPÍTULO II). Las concentraciones de biomoléculas: proteínas, ARN y ADN se realizaron por los métodos de LOWRY *et al.*, (1951), CAMBELL y SARGENT (1967) y BURTON (1956), respectivamente (métodos descritos en CAPÍTULO III). También fueron estimados los respectivos ratios PT/ARN, PT/ADN y ARN/ADN.

Análisis Estadísticos

Un Análisis de varianza de una vía fue aplicado usando el programa computarizado Statgraphics Plus versión 5.1 (ambiente Window), en el cual se determinaron las diferencias entre las respuestas bioquímicas en los distintos meses de colectas y su contrastes con los bioensayos de aclimatación. Para el contraste “a posteriori” se utilizó la prueba de Duncan (SOKAL Y ROHLF, 1981).

RESULTADOS

En la FIGURA 11 se muestran los niveles de metalotioneínas (MT) en la pared corporal en el poliqueto *E. complanata* colectados durante los meses de diciembre 09, febrero, junio y octubre 2010. Las concentraciones de MT no presentaron diferencias significativas entre los meses de colecta ($F_s=2,09$; $p>0,05$), tampoco se observaron diferencias en los poliquetos expuestos a 24 °C ($72,13 \pm 12,69$ μg de MT/gmh) y 28 °C ($80,31 \pm 17,73$ μg de MT/gmh), bajo condiciones controladas en el laboratorio. En el ambiente, los promedios de MT más elevados fueron encontrados en los meses de junio ($111,83 \pm 34,78$ μg de MT/gmh) y octubre ($110,36 \pm 49,08$ μg de MT/gmh).

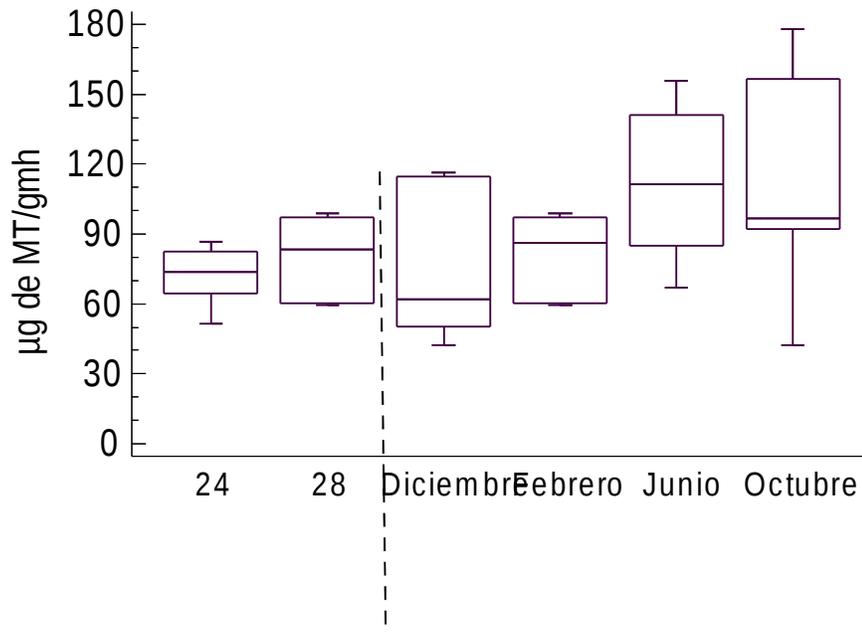


FIGURA 11. Concentración de metalotioneínas (MT) en *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas. Los datos se expresan en microgramos de MT por gramo de tejido fresco.

De igual manera, no se observaron diferencias entre los niveles de grupos tioles totales cuantificados en la pared corporal del poliqueto colectados en distintos meses (Fs=0,58, $p>0,05$). Los promedios de -SH totales oscilaron entre 41,09 y 50,64 $\mu\text{moles/gmh}$, tanto para los organismos colectados en el ambiente como para los expuestos a distintas temperaturas (24 y 28 °C) en el laboratorio (FIGURA 12).

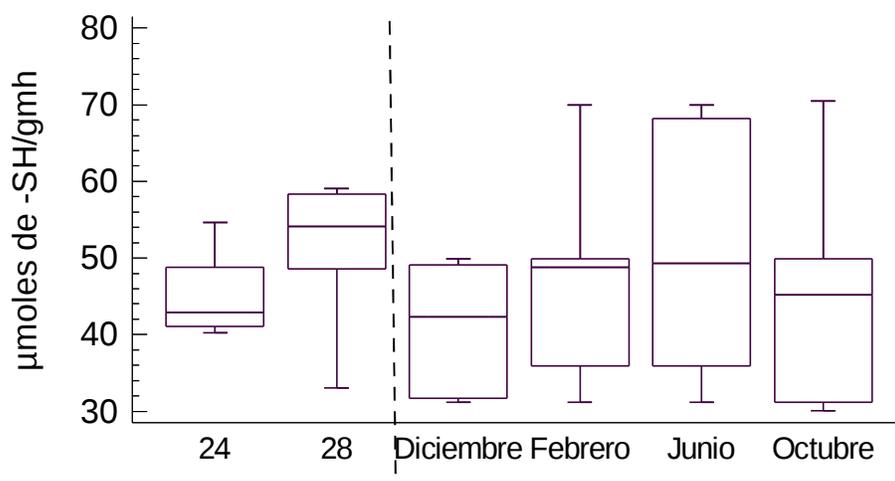


FIGURA 12. Niveles de tioles totales en *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas.

La variación de temperatura ambiental entre los meses Diciembre 2009 a Octubre 2010 produjo cambios significativos en los niveles de lípidos peroxidados (Fs=11,14, $p<0,001$). En la FIGURA 13 se muestran los incrementos en los niveles de TBARS desde el mes de febrero ($63,61 \pm 10,41$ nmoles de TBARS/mg proteínas) hasta octubre ($112,64 \pm 17,86$ nmoles de TBARS/mg proteínas), en un ascenso concomitante al aumento en la temperatura del mar. Incrementos similares fueron encontrados en los organismos aclimatados a 28 °C ($81,37 \pm 27,83$ nmoles de TBARS/mg proteínas), en contraste a los organismos aclimatados a 24 °C ($51,56 \pm 5,71$ nmoles de TBARS/mg proteínas).

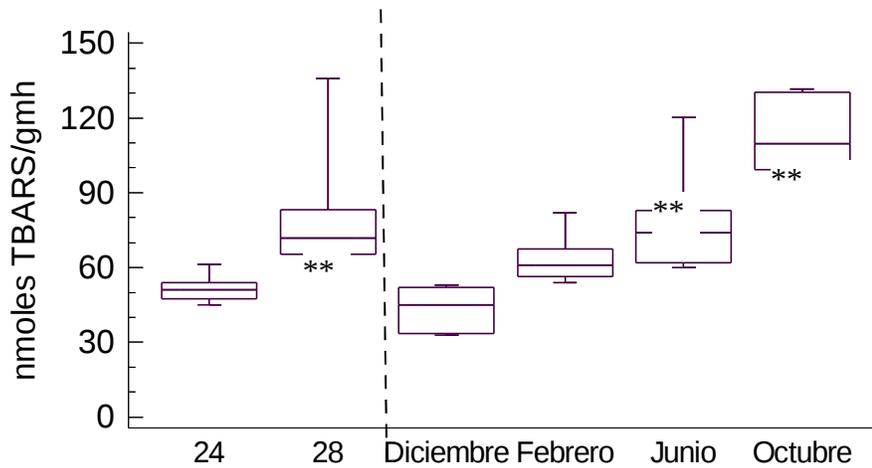


FIGURA 13. Niveles de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico en *E. complanata* en relación a los cambios de temperaturas mensuales. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

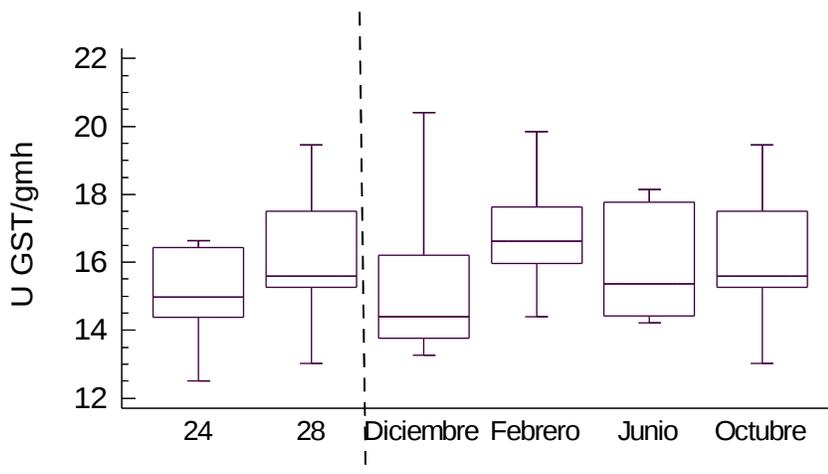


FIGURA 14. Actividad de glutatona-S-transferasa en *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas.

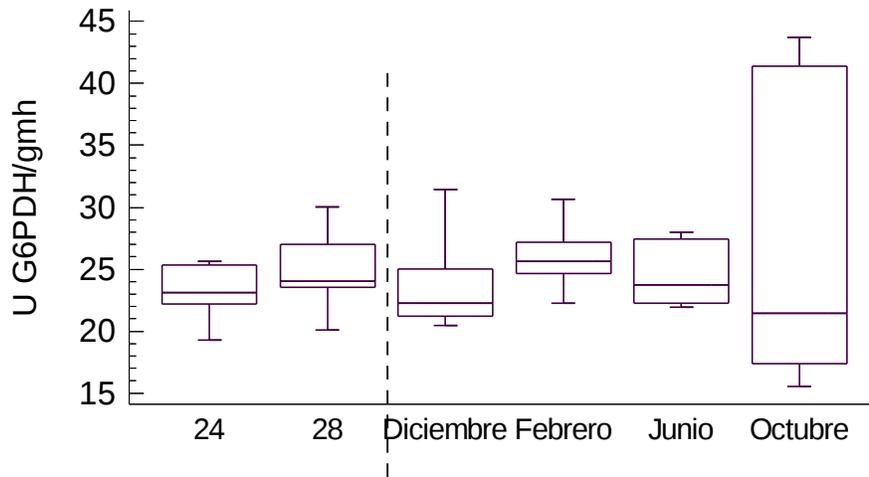


FIGURA 15. Actividad de glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) en *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas.

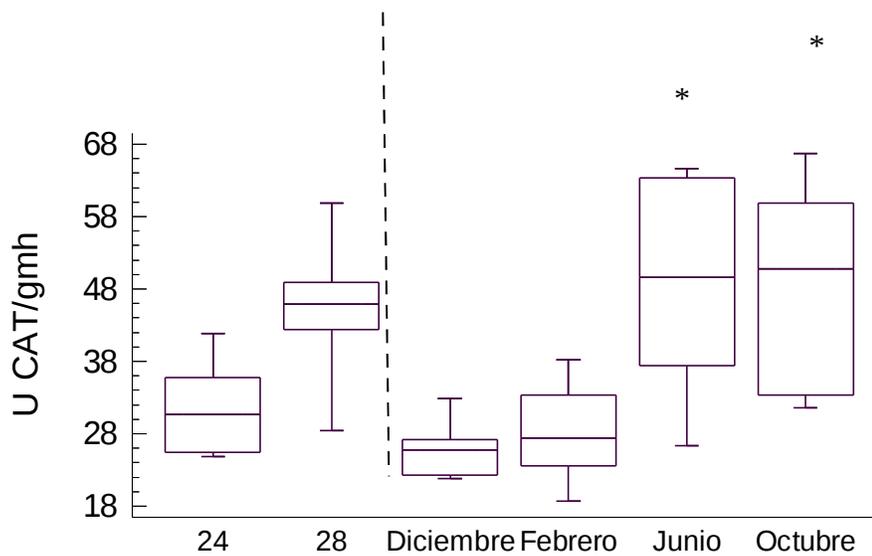


FIGURA 16. Actividad de la catalasa (CAT) en *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas.

La actividad de las enzimas GST y G6PDH no mostraron variabilidad con respecto a los cambios estacionales (FIGURAS 14 y 15, respectivamente). Sin embargo, la actividad de catalasa incrementó significativamente en los meses de Junio ($48,51 \pm 15,98$ U CAT/gmh) y octubre 2010 ($48,83 \pm 14,85$ U CAT/gmh), al igual que los poliquetos mantenidos durante 36 días a una temperatura promedio de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, mostrando promedios de $45,22$ U CAT/gmh (FIGURA 16). Los promedios más bajos fueron encontrados en los meses de diciembre, febrero y expuestos a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las concentraciones de de ADN se mostraron incrementadas en los organismos expuestos a 28°C concomitantemente como los individuos colectados en el ambiente en los meses de junio y octubre (FIGURA 17). Los niveles de ARN no mostraron variabilidad con respecto a los cambios de temperaturas en el ambiente ni bajo condiciones controladas. (FIGURA 18).

Las concentraciones de proteínas totales (FIGURA 19) no mostraron variaciones con respecto a los cambios de temperatura ambiental en casi un año de muestreos ($F_s=1,97$, $p>0,05$). Los promedios oscilaron entre $118,66 \pm 16,16$ a $140,46 \pm 41,21$ mg de proteínas/gmh para los meses de junio y febrero respectivamente. A su vez, no fueron encontrados cambios significativos en los niveles de proteínas de organismos expuestos a temperaturas controladas en el laboratorio.

Los cocientes PT/ADN, PT/ARN y ARN/ADN en *E. complanata* no presentaron variaciones con respecto a los meses de colectas. Los niveles de PT/ADN se mantuvieron con promedios similares durante diciembre, febrero y octubre, obteniéndose el más bajo en el mes de junio-2010. En cambio, se observó que el mayor promedio del índice ARN/ADN se evidenció en el mes de octubre.

El porcentaje de regeneración en individuos colectados en los distintos meses se presenta en la TABLA 4. Se muestra que la regeneración es un proceso común en los individuos colectados en cualquier época del año, pero los mayores promedios de crecimiento y número de segmentos (setígeros) recién formados en los individuos fueron

encontrados en los meses de junio y octubre del 2009.

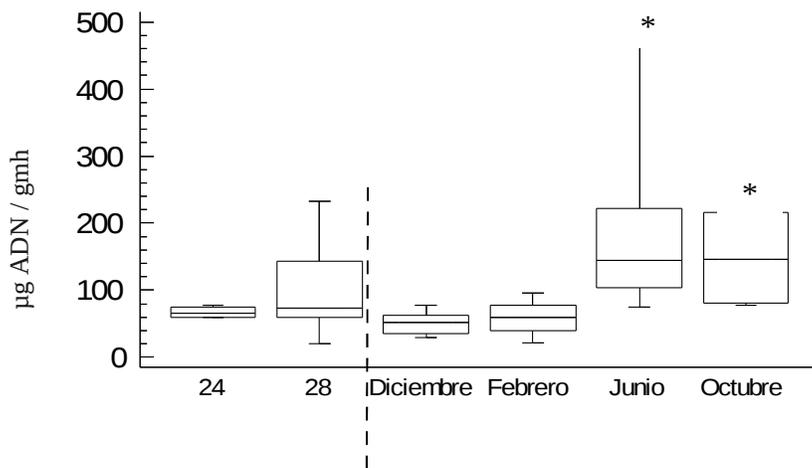


FIGURA 17. Concentración de ADN en el poliqueto *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

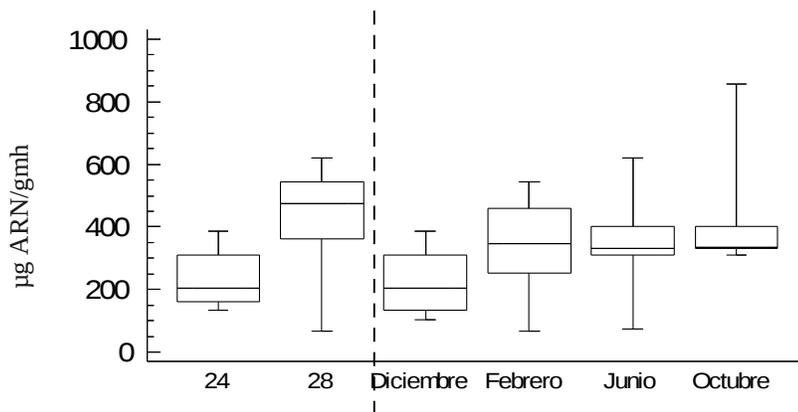


FIGURA 18. Concentración de ARN en el poliqueto *E. complanata* en relación a los cambios de temperaturas mensuales.

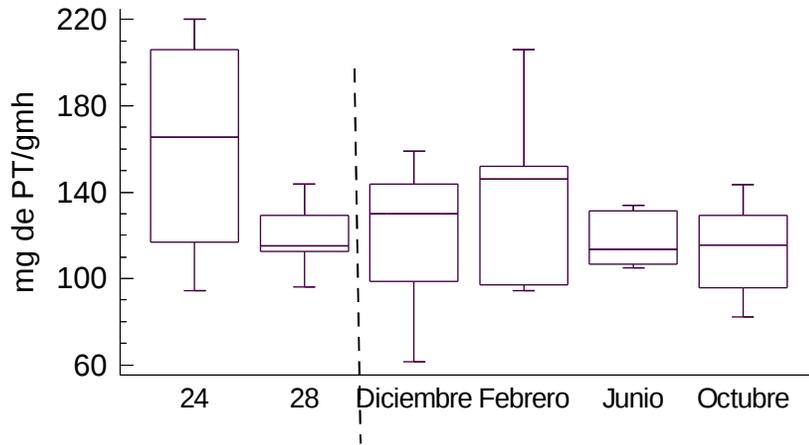


FIGURA 19. Niveles de proteínas totales solubles en *E. complanata* en relación a los cambios de temperaturas mensuales.

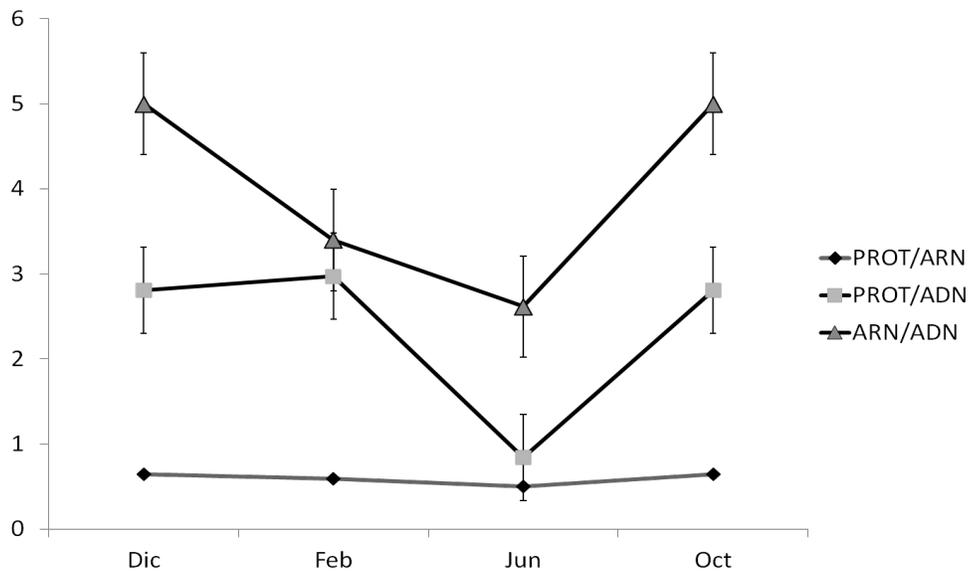


FIGURA 20. Coeficientes de crecimiento molecular (proteínas/ADN [x 100], proteínas/ARN [x 100] y ARN/ADN) en el poliqueto *E. complanata* en relación a los cambios mensuales de temperaturas.

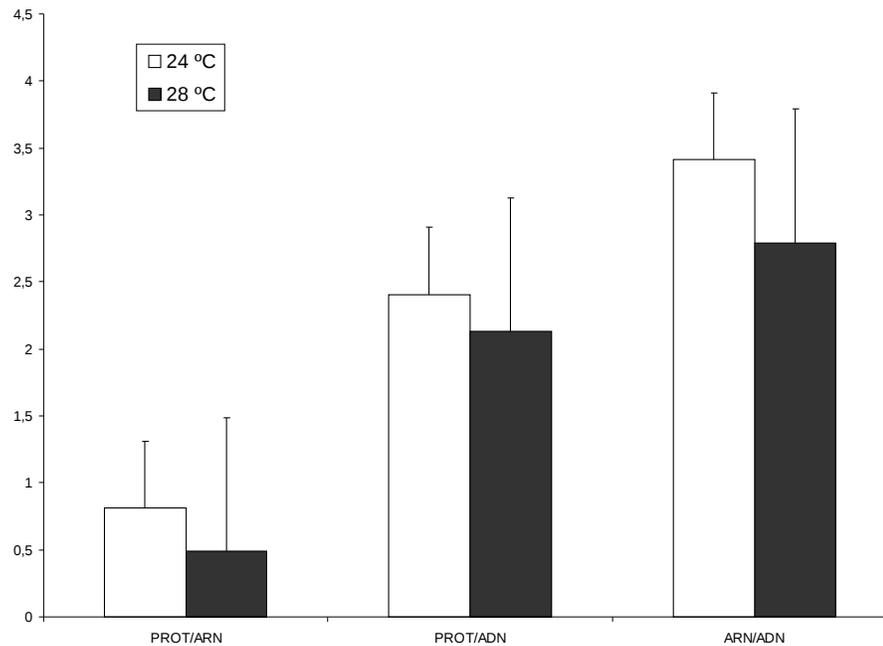


FIGURA 21. Coeficientes de crecimiento molecular (proteínas/ADN [x 100], proteínas /ARN [x 100] y ARN/ADN) en el poliqueto *E. complanata* en relación a 2 temperaturas. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

Meses	% de Regeneración	Nº de Segmentos
Diciembre	32	6,90 ± 2,07
Febrero	33	6,63 ± 1,92
Junio	56	9,00 ± 3,68 *
Octubre	52	10,00 ± 3,55 *

TABLA 4. Porcentaje de regeneración y número de segmentos (anteriores y posteriores) en *E. complanata* colectados en los distintos meses. El asterisco (*) muestra diferencias significativas al 95 % de confianza.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que a temperaturas elevadas el poliqueto *E. complanata* puede desarrollar una condición de estrés oxidativo, fundamentado en los incrementos en los niveles de lipoperoxidación (LPO) y en la actividad de la enzima CAT encontrada en los organismos colectados en el ambiente en los meses de junio (27,82 °C) y octubre (29,93 °C). Adicionalmente, fue evidenciada una respuesta fisiológica similar al estrés térmico en los organismos aclimatados a 28 °C. La actividad de CAT incrementó en los organismos perturbados térmicamente sugiriendo que esta elevación forma parte de las respuestas bioquímicas que controlan los niveles fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno (EROs) y presencia de moléculas pro oxidantes, especialmente H₂O₂.

Se parte del criterio que el incremento de la temperatura en aguas costeras del golfo de Cariaco induce el aumento de la tasa metabólica y respiración celular en *E. complanata*, y por ende sobreproducción de las EROs. Se ha considerado que la respiración celular puede producir entre 2-3 % de los oxiradicales a nivel mitocondrial. Esta relación entre la generación de EROs por cambios de temperatura estacionales ha sido demostrada usando mitocondrias aisladas en *A. marina*, donde se reporta modificaciones en el metabolismo energético durante el verano con un concomitante ascenso en las actividades de SOD, CAT y citrato oxidasa (KELLER *et al.*, 2004).

La respiración celular acoplada a la fosforilación oxidativa resulta en la reducción tetravalente del oxígeno molecular para formar agua, catalizada por citocromo oxidasa del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (CADENAS *et al.* 2000). En el curso de la conversión de O₂ a H₂O se forman secuencialmente el anión radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH \bullet) (ABELE y PUNTARULO, 2004). Estas especies moleculares reactivas oxigenadas son potencialmente tóxicas a los sistemas biológicos, especialmente OH \bullet que es un oxidante potente capaz de reaccionar indiscriminadamente con las biomoléculas de importancia, causando daños estructurales y

fisiológicos (FRIDOVICK, 1997).

Casos similares ocurren en áreas marino-costeras de zonas templadas donde existen diferencias bien marcadas en las actividades de las enzimas y otros compuestos antioxidantes en organismos colectados en invierno y verano. En verano, las elevadas temperaturas conllevan a incrementar la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx (WISTON y DI GÜILIO, 1991). Adicionalmente, en el mejillón *M. galloprovincialis* se ha reportado una marcada reducción en el sistema de defensa antioxidante enzimático durante el invierno (VIARENGO *et al.*, 1991) e incrementos en el poliqueto *Nereis diversicolor* en el verano (ABELE-OESCHGER *et al.*, 1994).

Estas variaciones en las defensas antioxidantes enzimáticas parecieran no presentar un patrón fijo con respecto a cambios estacionales en organismos de distintas taxa colectados en diversas localidades. Muchas enzimas tienden a la reducción en su actividad en organismos expuestos a bajas temperaturas, por ejemplo la xantina oxidasa (XO) en mejillones del océano atlántico y la actividad de GST en el vivíparo *Zoarces viviparus* en el mar Báltico (RONISZ *et al.*, 1999), sin embargo, en el músculo blanco del pez *Mullus barbatus* ocurre el caso contrario, algunas enzimas antioxidantes incrementan sus actividades en invierno por ejemplo SOD y GST, y otras en primavera CAT, GR y GPx (MATHIEU *et al.*, 1991; PAVLOVIĆ *et al.*, 2009). SHEEHAN y POWER (1999) consideran que la interpretación de la actividad de las enzimas antioxidantes se hace frecuentemente complicada, ya que pueden observarse niveles elevados en presencia de un amplio conjunto de sustancias contaminantes (por ejemplo metales pesados), que al mismo tiempo, su disponibilidad puede variar con los cambios ambientales climáticos y otros factores.

El efecto de la aclimatación a elevadas temperaturas deja mostrar que *E. complanata* posee un efectivo sistema de protección antioxidante en presencia de EROs formados por estímulo térmico. La capacidad total de respiración aeróbica es el primer proceso fisiológico afectado por variaciones de temperaturas (HAUSCHILD y GRIESHABER,

1997). Por ejemplo, en el poliqueto *A. marina* el cambio desde 6 a 22 °C, permite producir un incremento gradual (hasta 6 veces) en la tasa de ventilación y circulación (BAURNFALK, 1979). Además, es importante señalar que la exposición del cangrejo *Carcinus maenas* a cambios de temperatura y cobre puede causar variaciones en su frecuencia cardíaca (CAMUS *et al.*, 2004).

A pesar que las metalotioneínas (MT) y diversos compuestos contentivos de grupos tioles (-SH) que desempeñan funciones antioxidantes no mostraron variaciones frente al estrés térmico. Del mismo modo, no se encontró variación de MT y -SH en los individuos colectados. Hallazgos similares fueron encontrados en el guacuco *T. mactroides* colectados en playas aledañas en Complejo Criogénico de Oriente en distintas épocas del año, donde no se evidenció modificaciones de tales parámetros, incluso en organismos con elevados niveles de metales pesados acumulado (RODRIGUEZ, 2010). Pareciera ser que los incrementos de las EROs mediados por altas temperaturas pueden ser controlados efectivamente por las defensas antioxidantes enzimáticas.

El daño lipoperoxidativo es consecuencia directa de la sobreproducción de EROs. En *E. complanata* se observó que los niveles de LPO incrementaron paralelamente a la actividad de CAT, lo que sugiere que las defensas antioxidantes han sido sobrepasadas por la formación de radicales libres. Cuando ocurre un aumento en la producción de radicales libres se genera una serie de daños moleculares característicos de estado de estrés oxidativo, el cual demanda respuestas compensatorias antioxidantes para proteger la viabilidad funcional de las células y por ende de los tejidos. Estos ajustes metabólicos son particularmente importantes en la capacidad de la desintoxicación contra EROs y otras especies moleculares reactivas, inducida por factores endógenos o exógenos.

Un aspecto importante en esta investigación, es que demuestra que las temperaturas cercanas o superiores a 28 °C correspondiente a la temporada más caliente (junio a octubre), e inclusive bajo condiciones controladas, pueden elevar los niveles de lipoperoxidación a valores similares a los que pueden encontrar en poliquetos bajo la

exposición, a largo plazo, a xenobióticos tales como el Cd y fracciones solubles de lubricantes usados de motores de automóviles (CAPÍTULO II). Se presenta la incertidumbre de buscar nuevas herramientas que permitan cómo diferenciar el tipo de estímulo o efector, al momento de realizar las evaluaciones en organismos colectados el ambiente. Es recomendable que en los estudios o monitoreos de calidad ambiental, estén acompañados con determinaciones de otros parámetros ambientales y niveles de xenobióticos en el entorno, e incluso en los organismos de colecta.

La actividad metabólica es demostrada con el comportamiento de los individuos en los acuarios de aclimatación, ya que los organismos colocados a 24 °C presentaron menor actividad a lo largo del experimento (excepto cuando eran alimentados). Estos organismos mayoritariamente se mantenían enterrados o refugiados debajo de las rocas. Por el contrario, los organismos expuestos a 28°C presentaban mayor actividad, con movimientos continuos e intermitentes. Posiblemente, se presume que esta especie presenta adaptaciones que le permite cambiar su tasa metabólica y respiratoria, pasando de una respiración aeróbica a la activación de rutas anaeróbicas cuando están enterrados en el sedimento, lo que posiblemente reduzca el daño lipoperoxidativo que pueden provocar atmosferas de oxígeno normales.

Los promedios de biomoléculas tales como ARN y proteínas no presentaron variaciones con respecto a los cambios de temperaturas anuales. Sin embargo, los niveles de ADN se mostraron elevados tanto en poliquetos aclimatados a 28 °C como en poliquetos colectados en el ambiente en los meses donde la temperatura del agua es más caliente (junio y octubre). Esta concentración de ADN indica un mayor número y proliferación celular, a pesar de que su crecimiento somático (cambio de masa corporal) no marco diferencia entre los organismos colectados en tales meses. El aumento en las concentraciones de ADN en la pared corporal de los poliquetos colectados en Junio y octubre posiblemente sea atribuido al incremento de individuos juveniles y adultos en crecimiento (regeneración).

Los índices PT/ADN y ARN/ADN mostraron similitud en los organismos colectados en distintas épocas, al parecer *E. complanata* presenta un crecimiento continuo durante todo el año. Sólo el radio PT/ARN fue modificado ligeramente por los cambios de temperatura, tendiendo los menores promedios en el mes de octubre. La temperatura parece ser un factor determinante sobre las concentraciones de biomoléculas implicadas en el crecimiento (PT, ARN y ADN) y por ende en sus cocientes.

La temperatura es un factor importante que influye directamente los niveles de macromoléculas, conociéndose que organismos que habitan en zonas cálidas, donde la temperatura fluctúa entre 20-30 °C presentan mayor actividad metabólica. SEGNINI (1990) reporta que el incremento en la temperatura (30 °C) en el pez *Petenia kraussii* puede afectar la tasa respiratoria con respecto a ejemplares mantenidos a 22 °C. Los niveles de proteínas en *E. complanata* presentan sus mayores promedios en los organismos expuestos a baja temperatura bajo condiciones de laboratorio. Algunos autores reportan que temperaturas cercanas a los 20 °C incrementan los niveles de algunas biomoléculas. LEMUS (1992) y SEGNINI (1990) encontró que los niveles de ARN en juveniles del Pez *P. kraussi* y *O. massambicus* fueron mayores en peces que se encontraban a 22 °C con respecto a los organismos aclimatados a 30 °C, existiendo una relación positiva entre los valores de ARN y crecimiento. Igualmente para la especie antes nombrada se reporta disminución en el índice ARN/ADN y en los niveles de proteínas y ARN expuestos a 30 °C (LEMUS, 2005). SMITH *et al.* (2001) demostraron que la síntesis de proteínas en diferentes tejidos del pez *Oreochromis massambicus* expuestos a cobre puede disminuir, por una elevada demanda energética.

Los niveles de macromoléculas no presentaron una asociación directa con el porcentaje de organismos regenerados colectados. Casi un 30-41 % de la población de poliquetos colectada se autotomiza o presenta señales de formación de nuevos segmentos en la región anterior o posterior durante el periodo de junio a octubre; aunque la fragmentación en estos organismos es notoria todo el año. Esta formación de nuevos segmentos es independiente del tamaño del animal (KUDENOV, 1974). Estos resultados

muestran que existe cierta relación entre la temperatura y el ciclo de reproducción asexual (automización) de esta especie. Al parecer, existen otros factores, tales como algunos xenobióticos, inducir daños tisulares y autoincisión en el poliqueto en el *E. complanata* (CAPÍTULO II).

En síntesis, las temperaturas elevadas que se registran en las aguas superficiales de nuestras costas en los meses de Junio hasta octubre inducen cambios significativos en la actividad de CAT y daño lipoperoxidativos, coincidiendo con las mayores tasas de crecimiento de los poliquetos. Al parecer el estatus basal antioxidantes en estos organismos responde naturalmente a cambios térmicos ambientales. Este hecho debe tomarse en cuenta al realizar los monitoreos ambientales, ya que puede llegar a confundir el efecto de xenobióticos incorporado en los organismos con respuestas naturales de defensas moleculares medio s con temperaturas elevadas.

CAPITULO V

BIOMARCADORES EN E. complanata (Polychaeta: Amphinomidae) COMO HERRAMIENTAS EN LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

RESUMEN

Con el interés de evaluar las condiciones de algunos ecosistemas de zonas marino-costeras del estado Sucre, se determinaron una gama de marcadores moleculares (enzimas antioxidantes, lisozimas, metalotioneínas, lipoperoxidación y grupos tioles) y celulares (hematograma, fagocitosis, micronúcleos y desestabilización de las membranas lisosomales) en el Amphimonido *Eurythoe complanata*. Se contrastaron tales respuestas en poliquetos de dos zonas costeras: la ensenada de Turpialito (sur del Golfo de Cariaco) e isla Caracas (Parque nacional Mochima), con respecto a sustancias referenciales tales como cadmio y sedimentos contaminados por mezclas de contaminantes (fracción acuosa de lubricantes usados) en un período de exposición de 36 d. Los resultados mostraron que *E. complanata* presenta la habilidad de acumular niveles significativos de metales pesados, con una alta capacidad metabólica y de defensas antioxidantes en presencia de xenobióticos referenciales, mostraron alta sensibilidad. La actividad de catalasa fue ligeramente mayor en los organismos colectados en la zona de Turpialito. La tasa de crecimiento corporal y los coeficientes de crecimiento instantáneo (Proteínas/ARN y Proteínas/ADN) mostraron un incremento en los organismos de la localidad de la isla Caracas; valores que pueden verse afectados por la exposición a tóxicos referenciales. El número de celomocitos totales fue mayor en los poliquetos en la localidad de isla Caracas, sin embargo un porcentaje de -4% en la frecuencia de micronúcleos y una incrementada desestabilización de las membranas lisosomales de celomocitos fue observada en los organismos colectados en Turpialito. Los niveles de metalotioneínas, tioles totales y lisozimas no presentaron variaciones interlocalidades, pero sí en presencia de tóxicos referenciales. En síntesis, los marcadores biológicos usados mostraron un saludable estado en los poliquetos que habitan en ambas zonas evaluadas. Este trabajo demuestra la aplicabilidad que tienen las defensas antioxidantes, composición de ácidos nucleicos-proteínas, y parámetros inmunológicos y celulares en el biomonitoreo de zonas marino-costeras.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados forman parte de los elementos constituyentes de los sedimentos marinos, los mismos provienen de los procesos de vulcanización, hidrotermalismo, erosión de rocas y fuentes antropogénicas (GUTIÉRREZ-GALINDO *et al.*, 1999). La persistencia y biodisponibilidad de xenobióticos metálicos en los sedimentos marinos es alta, a pesar de que se encuentren en bajas concentraciones. Los metales pesados pueden ser incorporados fácilmente a los tejidos de los organismos que habitan el entorno, produciendo consecuencias perjudiciales sobre algunas respuestas biológicas específicas (DEL VALLS y CONRADI, 2000; NICHOLSON y LAM, 2005).

Investigaciones recientes han reportado incrementos en las concentraciones de metales pesados en sedimentos de algunas áreas costeras del estado Sucre (MARTINEZ y SENIOR, 2001; MARTINEZ, 2002). Algunos de estos registros llegan a alcanzar valores dentro de los rangos considerados no permisibles por agencias ambientales internacionales. Estas concentraciones no muestran en realidad cual es la fracción biodisponible para causar efectos tóxicos subletales en la biota, sin embargo su persistencia en el medio puede ser una fuente latente para su acumulación continua en los organismos.

Dentro de la comunidad científica y agencias ambientales ha sido aceptado que los riesgos en el ambiente no sólo deben ser basados en los análisis químicos del contenido de metales pesados u otros contaminantes, ya que estas muestras no proveen ninguna indicación de efectos deletéreos sobre la biota (MARIGÓMEZ *et al.*, 2004). Los biomarcadores han sido incorporados a programas de monitoreos en ambientes marino-costeros en Europa y Estado Unidos de América. En casos específicos, el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP) aplicado en el mar Mediterráneo, incluyó como novedad, una variedad de marcadores biológicos para evaluar la calidad de los ecosistemas (VIARENGO *et al.*, 2000b; VIARENGO *et al.*, 2000c, UNEP/MAP, 2007).

Los biomarcadores incluyen mediciones de respuestas que reflejan efectos a

distintos niveles de organización biológica, desde lo molecular hasta individual, lo cual provee una gama de opciones de suma importancia en los estudios de calidad ambiental. Diferentes parámetros pueden ser determinados para evaluar el estado de salud de los ecosistemas, incluyen el riesgo ecológico, bioensayos y marcadores biológicos (biomarcadores). Los biomarcadores tienen la potencialidad para anticipar cambios en niveles de organización biológica altos tales como población, comunidad o ecosistemas, sirviendo de herramientas de alerta temprana para medir efectos sobre los organismos (PORTE *et al.*, 1991; CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Los parámetros usados como biomarcadores a nivel celular, permiten la detección de cambios en grupos celulares específicos cuando en tejidos con composición es heterogénea, en algunos casos donde solo ciertos tipos de células responden a un contaminante específico. A través del uso de marcadores celulares se puede obtener una visión global de efectos de contaminantes, asociados a procesos bioquímicos y fisiológicos (ZHOU *et al.*, 2004; WANG y ZHOU, 2006a; WANG y ZHOU, 2006b).

Existe información sólida que demuestra cambios en parámetros bioquímicos, p.e. el sistema de defensa antioxidante incrementa su actividad en presencia de concentraciones bajas de contaminantes, generalmente manifestada bajo condiciones de estrés oxidativo (VALAVANIDISA *et al.*, 2006; WANG y ZHOU, 2006). Existen diversas fuentes antropogénicas que pueden incrementar la producción de oxiradicales y otros radicales libres, las cuales incluyen: metales pesados (Cd, Cu, Fe, Pb y As), contaminantes orgánicos (compuestos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos) y otros contaminantes. Las enzimas y compuestos antioxidantes han sido utilizados en diversas especies de poliquetos tales como *Arenicola marina* (BUCHNER *et al.*, 1996; MORALES-CASELLES *et al.*, 2009), *Heteromastus filiformis* (ABELE *et al.*, 1998), *E. complanata* (NUSETTI *et al.*, 2001); *Laenonereis acuta* (GERACITANO *et al.*, 2004^a; GERACITANO *et al.*, 2004b), *Sabella spallanzanii* (BOCCHETTI *et al.*, 2004), *N. diversicolor* (MOREIRA *et al.*, 2006), como biomarcadores de estrés oxidativo en ambientes acuáticos.

En Venezuela, los estudios ecotoxicológicos son de reciente data, y en especial la

aplicación de biomarcadores de estrés oxidativo y crecimiento en estudios campo. Otro detalle importante es que no existen rangos fisiológicos referenciales trazables en especies consideradas centinelas en presencia de diversos xenobióticos. Se ha adelantado mucho en proporcionar las posibles relaciones de causas y efectos de contaminantes en diferentes invertebrados marinos, usando ensayos estáticos de exposición crónica o aguda a tóxicos. Sin embargo, son escasas las publicaciones científicas de aplicación de biomarcadores en organismos colectados *in situ*. Recientemente se han evaluado ciertas zonas costeras usando biomarcadores aislados, por ejemplo en los bivalvos *Lima scabra* (CEDEÑO, 2012) en la isla de Coche y *P. viridis* en costas del estado Sucre (ROJAS *et al.*, 2005; ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012c). Estos últimos estudios contrastan la calidad de zonas costeras determinando marcadores bioquímicos e inmunológicos.

Las costas del estado Sucre presenta una franja importante de arrecifes coralinos. Es de conocimiento que estos ecosistemas son altamente sensibles a perturbaciones ambientales, en especial la contaminación. En la actualidad, se han realizado trabajos de investigación donde se determinan algunos biomarcadores bioquímicos directamente en los corales hermetípicos y octorales, lo que implica de alguna manera su manipulación y deterioro antropogénico. Por tal motivo, en esta investigación se usó al poliqueto errante *E. complanata* por ser una especie asociada a tales ecosistemas, que pudiera dar representación a lo que ocurre en el entorno donde el habita. Esta evaluación combinó algunos análisis químicos y biomarcadores como herramientas para la evaluación de impactos sobre organismos marinos y salud de ecosistemas. Este capítulo enfoca la aplicabilidad de una batería de biomarcadores (multibiomarcadores), a nivel molecular y celular, determinados en el poliqueto *E. complanata* para evaluar la calidad de dos ecosistemas costeros: la ensenada de Turpialito en el Golfo de Cariaco, y la isla Caracas, localizada Parque Nacional Mochima; ambos son ecosistemas coralinos. Al mismo tiempo se contrastan los biomarcadores con ensayos referenciales de exposición subletal con sedimentos contaminados por cadmio o mezclas complejas con xenobióticos. Se discute la utilidad de esta especie de poliqueto como organismo sensor para evaluar la calidad de ecosistemas costeros

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos y sitios de estudio

Se colectaron entre 30 a 40 ejemplares de *E. complanata* ($1,45 \pm 0,95$ g), sin distinción de sexo en aguas someras de la franja costera de la Ensenada de Turpialito ($10^{\circ} 27' 30''$ N, $64^{\circ} 01' 52''$ O) (sur del golfo de Cariaco) y playa escondida en la isla Caracas (Parque nacional Mochima) ($10^{\circ} 15' 41''$ N, $64^{\circ} 28' 48''$ O) (FIGURA 22). Los organismos fueron colectados de forma manual por buceo nocturnos a profundidades de 0 a 10 m, entre los meses de diciembre y enero del año 2009. Los individuos fueron transportados en envases de aislamiento térmico y aireación hasta el laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias.

Los organismos de ambas localidades fueron mantenidos en acuarios de 30 litros por un período de máximo de 2 días, durante el cual no fueron alimentados, sin arena, protegidos de la luz y aireados continuamente. A los animales se les extrajo el líquido celómico para realizar los ensayos celulares e inmunológicos. Además, se les disecó el tracto digestivo y su pared muscular fue almacenada a -20°C hasta el momento de los análisis bioquímicos.

Ensayo Referencial de Toxicidad

Usando poliquetos escogidos al azar provenientes de la ensenada de Turpialito ($1,48 \pm 1,00$ g) y Mochima ($1,50 \pm 0,65$), , en proporciones iguales, se realizó un bioensayo de toxicidad por 36 días, usando dos tipos de sedimentos contaminados preparados en laboratorio: (1) contentivo de $200\ \mu\text{g}$ de cadmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en $200\ \text{g}$ de sedimento ($1\ \mu\text{g}/\text{g}$), y (2) consistió de una mezcla de lubricantes usados de motores de vehículos ($40\ \text{g}/\text{ml}$) en sedimento, y posteriormente secados a temperatura ambiente por dos días. Los sedimentos usados fueron obtenidos de playas de la región sur del golfo de Cariaco, esterilizados a 200°C por 2 horas, antes de su uso, y tamizados (luz de malla $1\ \text{cm}^2$). La

temperatura de la sala durante los ensayos permaneció en 25 ± 1 °C.

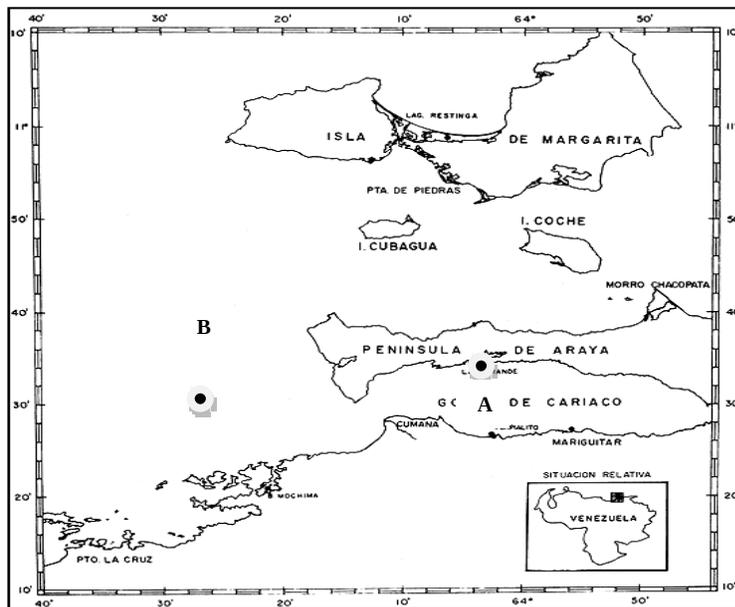


FIGURA 22. Sitios de colectas de ejemplares de la especie *E. complanata*: ensenada de Turpialito (a, $10^{\circ} 27' 30''$ N, $64^{\circ} 01' 52''$ O) y playa escondida en la isla Caracas (b; $10^{\circ} 15' 41''$ N, $64^{\circ} 28' 48''$ O).

Metales Pesados

Los sedimentos húmedos (0,5-1 Kg) colectados en cada localidad fueron colocados en bolsas plásticas. En el laboratorio, se extrajeron los restos de conchas y vegetales. Se secaron 100 g fueron secados a 60 °C/72 h y posteriormente disgregado y pulverizados en morteros de porcelana (CHARZEDDINE *et al.* 2002). Se pesó un gramo, por triplicado, en un matraz Erlenmeyer (125 ml) y se agregó 10 ml de una solución buffer (acetato de sodio al 1 mol/l) a pH 5 (TESSIER *et al.*, 1979). La solución fue filtrada en embudos con papel Watman 42 en balones aforados (25 ml) y se trasvasaron a viales plásticos que se refrigeraron a 4° C. Para el control de la calidad de los reactivos usados, se prepararon tres blancos, bajo las mismas condiciones que las muestras. Los metales analizados fueron: zinc (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), cadmio (Cd), y plomo (Pb).

La determinación de metales pesados en la pared corporal de los individuos colectados en ambas localidades y expuestos a xenobióticos fue realizado según ROJAS *et al.*, 2002 (Descrita en CAPÍTULO II)

Enzimas Antioxidantes

Para la determinación de las actividades enzimáticas se usó el protocolo propuesto por ZAPATA-VÍVENES (2001) (CAPITULO II).

Parámetros Celulares e Inmunológicos

Para medir viabilidad celular, número total y estabilidad de las membranas lisosomales de celomocitos, frecuencia de micronúcleos se usaron las metodologías descritas en el CAPÍTULO III.

Determinación de Proteínas y Ácidos nucleicos

Para determinar proteínas se procedió de acuerdo al método de LOWRY *et al.*, 1956, ARN por el método de revelación por orcinol según CAMBELL y SARGENT (1967), y ADN mediante la reacción de difenilamina (BURTON, 1956), descritos en el CAPÍTULO III.

Análisis Estadísticos

Para el procesamiento de los datos se utilizó un análisis de varianza de una vía para determinar las posibles diferencias estadísticas entre localidades y con respecto a los sedimentos referenciales. Se calculó la asociación entre los metales pesados y las respuestas bioquímicas mediante un análisis de correlación (SOKAL y ROHLF, 1981) mediante el programa computarizado Statgraphics Plus versión 5.1 (ambiente Window).

RESULTADOS

Metales pesados

Las concentraciones de los metales pesados en sedimentos colectados en la ensenada de Turpialito e isla Caracas, y sedimentos referenciales se muestran en la FIGURA 25. Los niveles de metales pesados evaluados no variaron entre los sedimentos de las dos localidades, presentando valores dentro de los rangos estipulados para zonas no contaminadas (BONILLA *et al.*, 2002; SAQUID, 2002). Los mayores promedios en todos los elementos determinados fueron encontrados en concentraciones elevadas en el sedimento mezclado con la FALUMV.

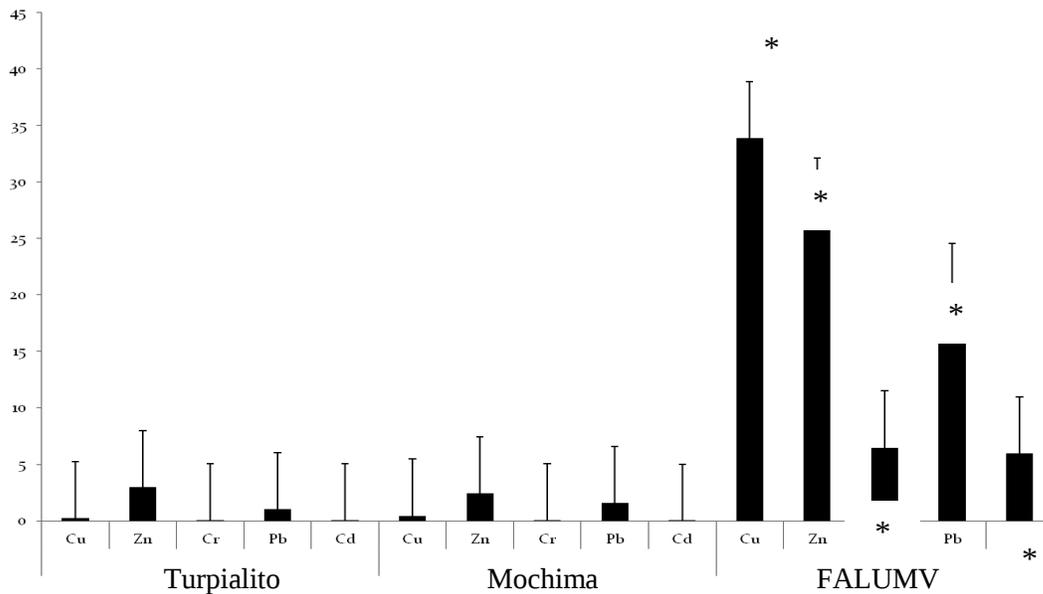


Figura 23. Niveles de metales pesados en sedimentos de las localidades de Turpialito (Golfo de Cariaco), Isla Caracas (Parque Nacional Mochima) y sedimentos contaminados con FALUMV. La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

Metalotioneínas y grupos tioles

En la FIGURA 24 se muestran los niveles de compuestos ricos en grupos sulfhidrilos, metalotioneínas (A) y grupos tioles totales (B). Las concentraciones de estas dos moléculas no mostraron variación entre las localidades. Sin embargo, los poliquetos expuestos a los dos sedimentos contaminados muestran un incremento casi paralelo tanto de MT como -SH (Fs= 10,23; $p < 0,05$ y Fs= 9,33; $p < 0,05$, respectivamente).

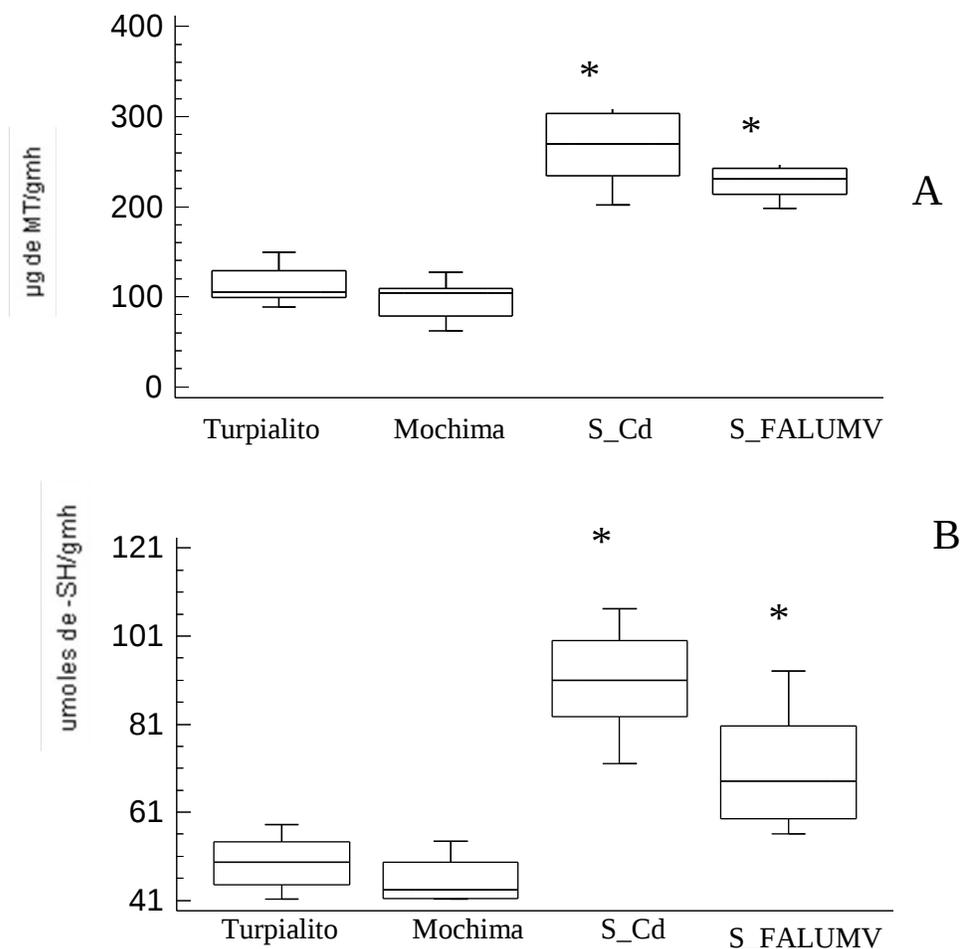


FIGURA 24. Concentración metalotioneínas y grupos tioles solubles en *E. complanata* colectado en la ensenada de Turpialito (GC, Golfo de Cariaco) e islas Caracas (Mochima).

Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

Enzimas antioxidantes y daño oxidativo

La actividad de CAT se mostró relativamente elevada en los poliquetos colectados en la ensenada de Turpialito ($26,08 \pm 2,31$ U/gmh) con respecto a los organismos de Mochima ($21,64 \pm 2,1$ U/gmh) (FIGURA 25A). A pesar de esto, tales actividades son menores en comparación a las que se presentan en los organismos expuestos a tóxicos referenciales (Cd y FALUMV), siendo estos últimos quienes presentaron mayores promedios ($F_s = 7,34$; $p < 0,05$). La actividad de GST no mostró variabilidad en los organismos inter-localidades (FIGURA 25B). Sin embargo, la actividad de la enzima se muestra sensiblemente elevada en los organismos expuestos al sedimento con la FALUMV ($F_s = 71,48$; $p < 0,001$). Contrariamente, la actividad de la enzima G6PDH no mostró variaciones entre los organismos de las zonas evaluadas y sustancias tóxicos referenciales (FIGURA 25C) ($F_s = 1,49$; $p > 0,05$).

Las concentraciones de TBARS para los poliquetos colectados en la ensenada de Turpialito ($58,28 \pm 6,32$ nmoles/mg de proteínas) mostraron promedios más elevados con respecto a la localidad de Mochima ($51,08 \pm 5,02$ nmoles/mg de proteínas) (FIGURA 25D). Un incremento notorio en los niveles de TBARS fue observado en los organismos expuestos a FALUMV seguido de los organismos expuestos Cd.

Índices PT/ARN/ADN

Los coeficientes moleculares de crecimiento PT/ARN (FIGURA 26A), PT/ADN (FIGURA 26B) y la actividad de lisozima (FIGURA 26D) estimada no muestran variaciones estadísticas cuando se contrastan los organismos de ambas localidades en evaluación y los expuestos a sedimentos contaminados. Sólo se evidenció un descenso en la tasa de recambio ARN/ADN en los organismos expuestos a Cd y FALUMV (FIGURA 26C).

Parámetros inmunológicos y celulares

La viabilidad de celomocitos en los organismos de las dos zonas evaluadas no

registró variaciones. Sin embargo los poliquetos expuestos a los sedimentos contentivos de las sustancias referenciales mostraron una reducción significativa en el número de células viables (FIGURA 27A). El número total de celomocitos (NTC) no mostró variaciones significativas entre los organismos colectados en las dos localidades y los expuestos a xenobióticos en el laboratorio. Aunque, el promedio en NTC fue mayor en los organismos colectados en Mochima que en los organismos de la ensenada de Turpialito (FIGURA 27B).

La frecuencia de micronúcleos (FM) fue mayormente observada en los organismos expuestos a FALUMV con respecto a los colectados en el ambiente (FIGURA 27C). Los poliquetos colectados en la ensenada de Turpialito mostraron promedios mayores con respecto a los poliquetos colectados en Mochima. La desestabilización de las membranas lisosomales de celomocitos obtuvo sus menores promedios en los poliquetos expuestos a los dos tóxicos referenciales, presentándose un reducido tiempo de retención de rojo neutro en los organismos expuestos a Cd; mientras que los poliquetos de las dos localidades en estudios no mostraron ninguna diferencia estadística. Con respecto a la actividad de lisozimas, esta enzima bacteriolítica no mostró variación significativa en los organismos de las dos localidades ni en los organismos expuestos ($F_s=1,55$, $p>0,05$) (FIGURA 27D).

Correlaciones de variables

Los análisis de correlación mostraron asociaciones positivas de moderada a fuerte entre algunos metales pesados y las variables bioquímicas determinadas (TABLA 6). El Zn y Pb fueron los metales más correlacionados con los niveles de MT, -SH, CAT, GST y TBARS. Adicionalmente, se encontraron asociaciones negativas fuertes entre los niveles de Zn (-0,759) y Pb (-0,831) con la viabilidad; Cd con el número total de células (-0,741) y Pb mostró correlación positiva con la frecuencia de micronúcleos en celomocitos (0,703). El contenido de ARN estuvo asociado negativamente a los niveles de Zn (-0,826) y Pb (-0,877). Los coeficientes molecular de crecimiento PT/ARN y ARN/ADN mostraron asociación con los mismos metales.

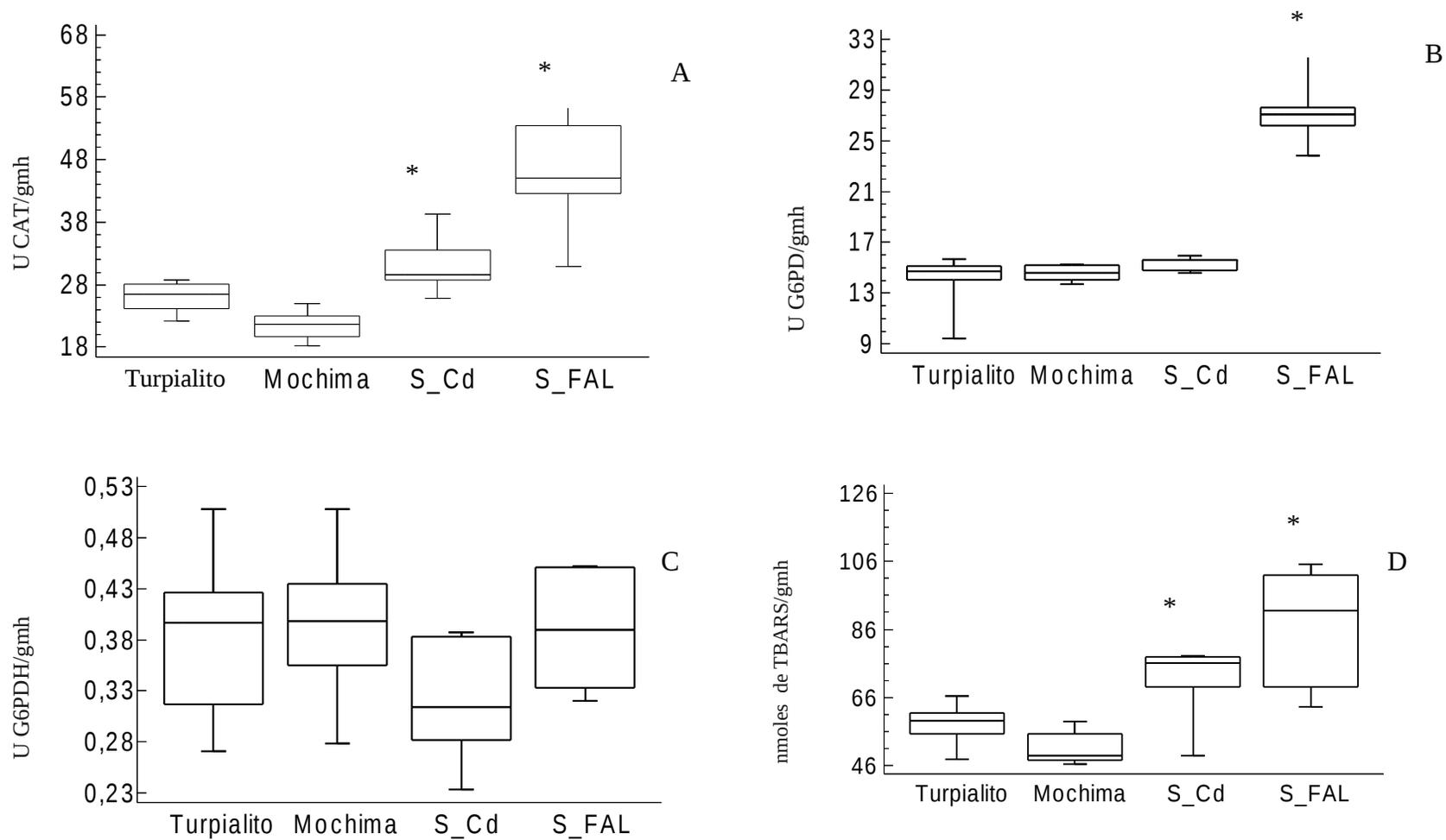


FIGURA 25. Actividades de la enzimas CAT (A), GST (B), G6PDH (C) y TBARS (D) en *E. complanata* en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. S_Cd: Sedimento con Cadmio; S_FAL: Sedimento con F

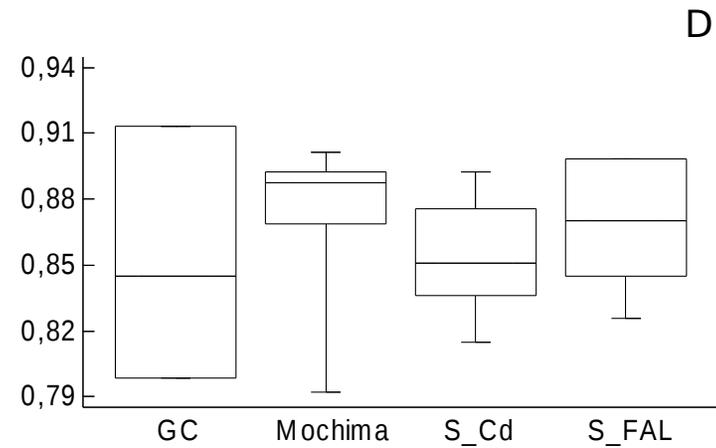
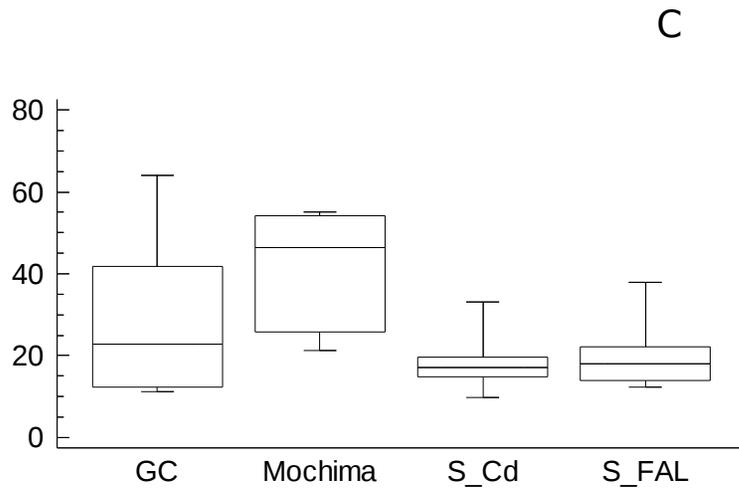
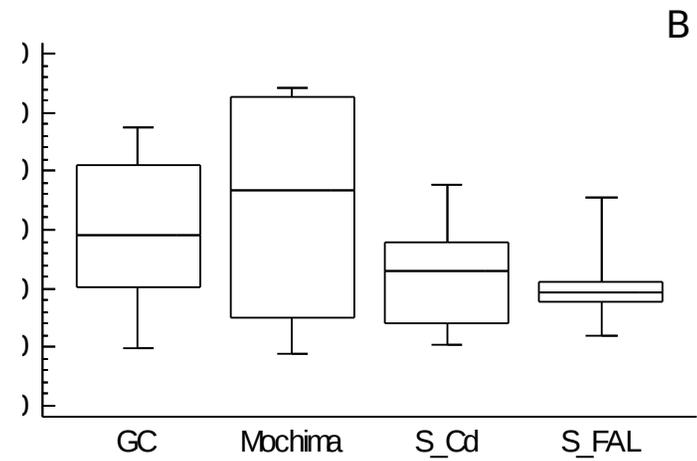
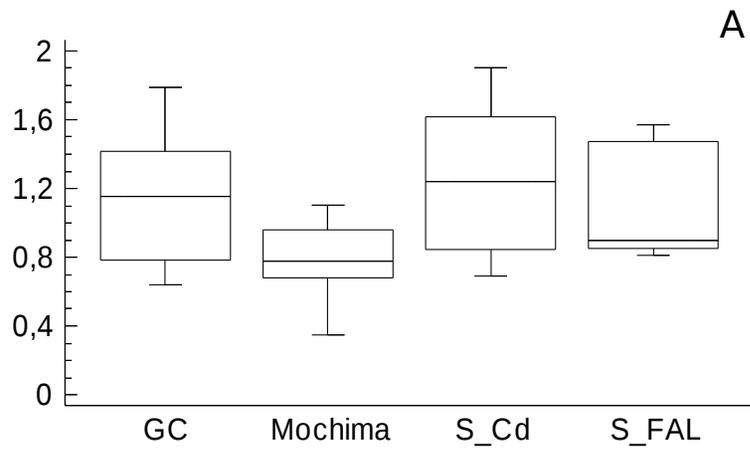


FIGURA 26. Coeficientes proteínas/ARN (A), Proteínas/ADN (B), ARN/ADN (C) y lisozimas (D) en *E. complanata* en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza.

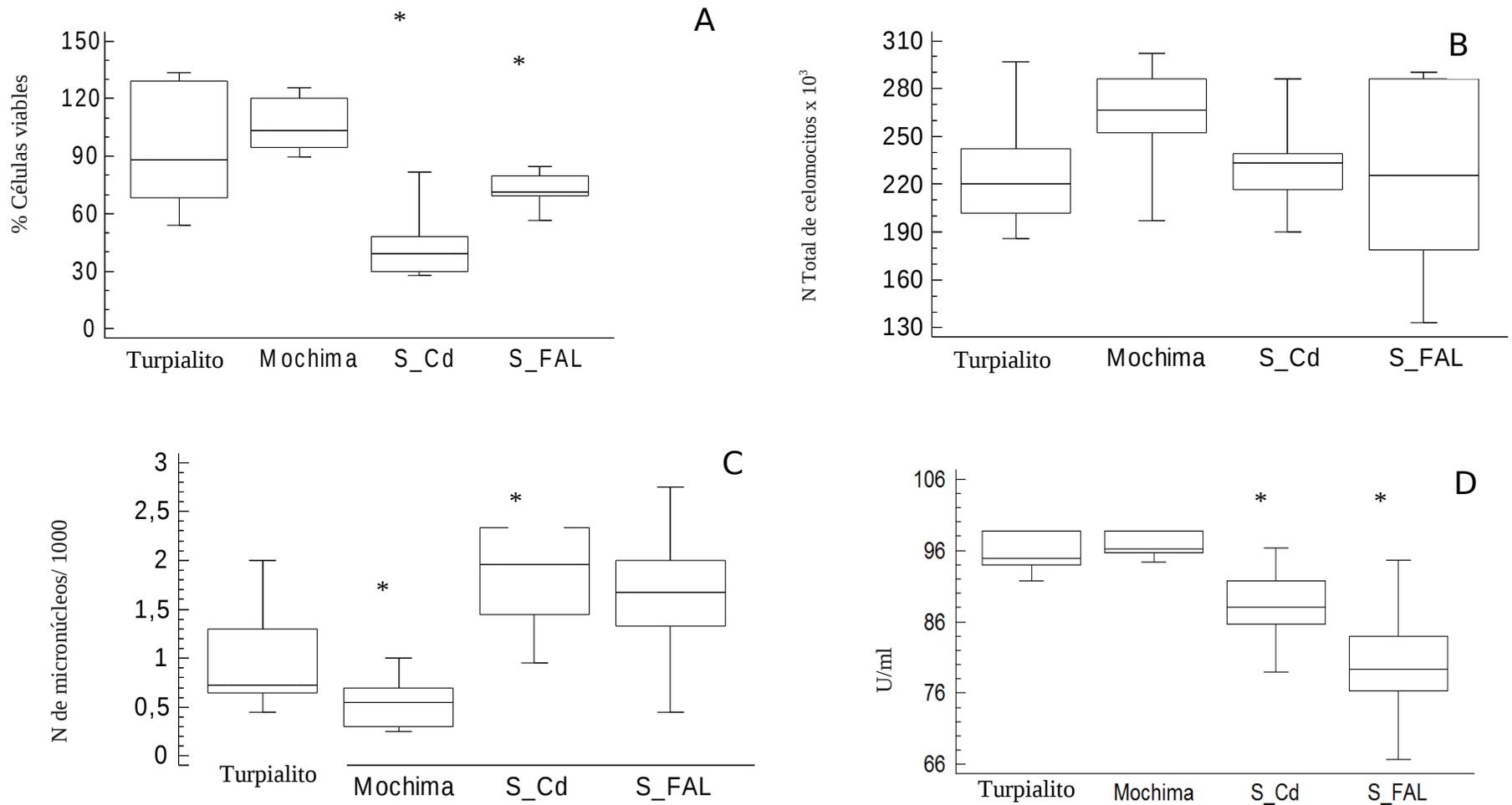


FIGURA 27. Viabilidad (A), número total (B), frecuencia de micronúcleos (C) y desestabilización de las membranas lisosomales (D) en *E. complanata* en la localidad de Turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. La línea central denota el promedio, las cajas desviación estándar y error típico y las extensiones los rangos de cada grupo. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %. S_Cd: Sedimento con Cadmio; S_FAL: Sedimento con FALUMV

Metales	<i>MT</i>	<i>-SH</i>	<i>CAT</i>	<i>GST</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TBARS</i>
A						
Zinc	0,82 (63,20) *	0,64 (41,81) *	0,718 (51,60)	0,878 (77,20)	0,115 (1,33)	0,787 (62,00)
Cobre	0,164 (2,70)	0,08 (0,77)	0,306 (9,41)	0,306 (9,41)	-0,150 (2,26)	0,505 (25,59)
Cadmio	-0,375 (14,09)	-0,39 (15,94)	-0,479 (22,99)	-0,479 (22,99)	0,374 (14,04)	0,520 (27,06)
Plomo	0,84 (71,36)	0,704 (49,65) *	0,904 (81,89)	0,904 (81,89)	-0,03 (0,12)	0,750 (56,30)
Metales	<i>Viabilidad</i>	<i>NTC</i>	<i>Fagocitosis</i>	<i>Lisozima</i>	<i>FMN</i>	<i>TRRN</i>
Zinc	-0,75 (57,75) *	-0,16 (2,75)	-	0,04 (0,21)	0,50 (25,07)	-0,47 (22,52)
Cobre	0,142 (2,03)	-0,74 (54,99) *	-	0,21 (4,62)	0,33 (11,02)	0,17 (3,06)
Cadmio	0,56 (31,45)	-0,06 (0,38)	-	0,241 (5,83)	-0,289 (8,36)	0,394 (15,56)
Plomo	0,831 (69,20) *	0,01 (0,02)	-	0,156 (2,44)	0,703 (49,48)*	0,347 (12,08)
Metales	<i>Proteínas</i>	<i>ARN</i>	<i>ADN</i>	<i>PT/ARN</i>	<i>PT/ADN</i>	<i>ARN/ADN</i>
Zinc	-0,12 (1,49)	-0,82 (68,27) *	0,135 (1,83)	0,584 (34,21)	-0,266 (7,09)	-0,62 (38,63) *
Cobre	0,035 (0,12)	-0,097 (0,95)	0,075 (0,567)	-0,133 (1,79)	0,100 (1,10)	0,03 (0,15)
Cadmio	0,426 (18,19)	0,381 (14,56)	0,282 (7,99)	-0,136 (1,86)	0,458 (21,09)	0,455 (20,79)
Plomo	0,03 (0,09)	-0,87 (77,04) *	-0,04 (0,16)	0,658 (43,42) *	-0,077 (0,604)	-0,599 (35,94) *

TABLA 5. Coeficientes correlación entre los metales contentivos y los biomarcadores determinados en *E. complanata* en la localidad de turpialito (GC, Golfo de Cariaco) y Las Caracas (Mochima). Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticamente significativas al 95 %.

DISCUSIÓN

El presente estudio propone la combinación de biomarcadores, junto a la determinación de xenobióticos (metales pesados) acumulados en pared corporal del poliqueto *E. complanata* para ser usados en la evaluación de la calidad de ambientes marino-costeros. La efectividad de los biomarcadores usados fue comprobada en organismos expuestos a sedimentos contentivos de Cd y una mezcla compleja de xenobióticos en ensayos subletales estáticos a largo plazo. Estos sedimentos representaron las áreas referenciales de un posible escenario de contaminación.

Los sedimentos colectados en la ensenada de Turpialito e isla Caracas mostraron niveles de metales pesados dentro de los rangos considerados como no contaminados (SAQUID, 2002; BONILLA *et al.*, 2003), sin embargo es importante considerar la presencia de Pb y Cd, aunque en bajas concentraciones, en ambas zonas. Estos elementos han sido considerados altamente tóxicos y se ha comprobado que pueden alterar la función de las membranas celulares e inhibir la actividad de enzimas que participan en rutas metabólica (ARIAS y GARCÍA, 2001; ZAPATA-VÍVENES, 2005).

La exposición subletal a sedimentos contaminados con Cd y FALUMV causó una condición de estrés oxidativo en el poliqueto *E. complanata*, reflejada por el incremento de los siguientes biomarcadores: la peroxidación lipídica (TBARS) y la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutationa-S-transferasa (GST). Tales parámetros revelan la elevación de daños oxidativos sobre los lípidos de membranas por formación exacerbada de especies reactivas del oxígeno (EROs), asociado por la activación de los mecanismos de biotransformación y excreción de compuestos metálicos y orgánicos en los organismos expuestos a xenobióticos. Uno de los biomarcadores que señaló la activación de respuestas de defensas moleculares contra la sobreproducción EROs fue la enzima CAT. El incremento en su actividad puede sugerir la efectividad de desdoblamiento del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) intracelular, posiblemente generado por el ingreso de metales pesados o ciclo metabólico vía redox de los compuestos contentivos en la FALUMV.

Las defensas antioxidantes no enzimática no presentaron diferencias en los organismos colectados en las dos localidades estudiadas, lo que indica que su metabolismo basal antioxidante no se encuentra perturbado por contaminación química. Aunque, las concentraciones de la metalotioneínas (MT) y grupos sulfhidrilos totales en *E. complanata* expuestos a los sedimentos contaminados muestran la sensibilidad de inducción que presentan de estas moléculas ricas en grupos tioles como marcador de ingresos de iones metálicos, específicamente a Cd, al cuerpo del organismo. Las MT juegan un papel importante en la captación y excreción de metales pesados (MARCANO *et al.*, 1996), además de su capacidad metabólica de remoción de radicales libres (VIARENGO *et al.*, 2000). El Cd es el ion metálico que presenta mayor fuerza de unión para algunas isoformas de MT, ligándose a las cisteínas y quedando sus átomos enclaustrados fuertemente a la proteína. Se ha demostrado que la inducibilidad de las MT está asociada trazablemente con los niveles de metales pesados disponibles en su entorno señalan (REYES, 1999).

Las respuestas celulares mostraron ligeras diferencias entre los poliquetos de ambas localidades costeras. El número de celomocitos totales presentó mayores promedios en los poliquetos en la localidad de isla Caracas, sin embargo en los organismos colectados en la ensenada Turpialito se observó un incremento débil (4‰) en la frecuencia de aparición micronúcleos (FMN). Este tipo de alteraciones no mostró asociación estadísticas con los niveles de metales pesados en sedimentos y tejido corporal. Este parámetro indica daños a nivel genómico debido a efectos clastogénicos y alteraciones en la división mitótica en celomocitos precursores (DIALIANIS *et al.*, 2003). Posiblemente, algunos metales como el Pb estén alterando a las células precursoras de celomocitos; aunque no muestran asociación con la viabilidad y NTC.

La FMN ha sido evaluada en *E. complanata* colectado en el campo permite determinar la incidencia de MN en poblaciones de poliquetos bajo condiciones de ausencia de riesgo medioambiental en posibles zonas de referencia. En mejillones del Mediterráneo se ha sugerido que frecuencias por encima de un 5,0 % en células de la branquia se consideran una respuesta elevada, e identifican puntos de riesgo medioambiental (CAMPILLO *et al.*, 2007; FERNANEZ

et al., 2011).

Los micronúcleos son fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos que no consiguen migrar con alguno de los núcleos hijos en la anafase mitótica y que permanecen en el citosol una vez finalizada la división celular (HEDDLE *et al.*, 1991). La FMN ha sido recomendada como un biomarcador no específico de genotoxicidad en estudios de contaminación marina. Este daño puede ser producido endógenamente, por el ataque al ADN de productos generados en el metabolismo normal de la célula, o exógenamente, por la exposición a radiación, toxinas naturales o compuestos químicos de origen antropogénico. La frecuencia de micronúcleos observada puede ser considerada como un índice de los daños genéticos acumulados durante el ciclo de vida celular actuando como una respuesta integrada de la exposición a mezclas de contaminantes capaces de actuar como genotóxicos.

El tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) en celomicitos es reducido en organismos expuestos a Cd y FALUMV. Al parecer, este ensayo es mínimamente afectado por parámetros ambientales tales como la temperatura y la salinidad (RINGWOOD *et al.*, 1998), por el contrario pareciera ser una respuesta sensible en presencia de contaminantes (CAPÍTULO III). Se ha demostrado que en otras especies como guacucos y bivalvos, el TRRN decrece en organismos expuestos a metales pesados (VIARENGO *et al.*, 2000b; MATOZZO *et al.*, 2001, RIVERA, 2004;) y contaminantes orgánicos (LOWE *et al.*, 1995). En estudios de campo, este ensayo ha sido aplicado a hemocitos de ostras (RINGWOOD *et al.*, 1999), mejillones (FERNLEY *et al.*, 2000) y langostas (LOWE *et al.*, 1992) mostrando alta efectividad. Los daños sobre la membrana lisosomal fueron demostrados en presencia de las sustancias de referencia toxicológica, Cd y FALUMV, obteniéndose reducidos tiempos de retención $44,14 \pm 19,83$ y $72,18 \pm 9,71$ min, respectivamente. Aunque, no se conoce como los cambios estacionales pueden modificar a este parámetro (HAUTON *et al.*, 1998). ZAPATA-VÍVENES *et al.*, (2012c) reportan que en mejillones colectados en Río Caribe y San Antonio del Golfo, dos zonas costeras del estado Sucre, no se observaron daños en el 50% de las hemocitos al menos durante 120 minutos. Se ha considerado que el daño de la membrana lisosomal puede ser causado por agentes tóxicos (FERNLEY, 2000), fagocitosis (NARANJO, 2012) y estresores naturales (DAILIANIS *et al.*, 2003), todos

estos factores vinculados con la formación de EROs.

El grado de estabilidad de la membrana lisosomal (LMS) es un biomarcador de efecto que indica un estrés general en la fisiología del poliqueto. La disfunción de los procesos lisosomales ha sido relacionada con muchos aspectos de patologías asociadas a la toxicidad química y procesos degenerativos (ZHAO *et al.*, 2011). La autofagia lisosomal proporciona una segunda línea de defensa en los organismos contra el estrés oxidativo y la capacidad para regular al máximo de manera efectiva este proceso. Por ello, es un factor significativo que probablemente contribuye a la capacidad de ciertos organismos para tolerar ambientes contaminados y con condiciones estresantes. La disminución de la estabilidad de la membrana lisosomal se ha relacionado con la exposición a muchos tipos de contaminantes químicos, aunque no se pueden considerar como los únicos factores que alteran este biomarcador citológico.

Numerosas investigaciones avalan la utilidad de los biomarcadores en estudios de campo. SUN y ZHOU (2008) reportan cambios en las enzimas superóxido dismutasa y un decrecimiento en las actividades de peroxidasas, y niveles de proteínas citosólicas en el poliqueto *N. diversicolor* expuestos a Cd y a hidrocarburos. En estudios similares se ha demostrado la sensibilidad que poseen los biomarcadores moleculares (actividad de enzimas antioxidantes) y celulares (cometas, fagocitosis) cuando se contrastan zonas de presumible impacto por xenobióticos, en especial metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos. MORALES-CASELLES *et al.*, (2009) encontraron en zonas impactadas por derrames petroleros de Prestige´2002 correlaciones significativas, de moderadas a fuertes, con daños en el ADN del poliqueto *A. marina*.

Se es conocido que la calidad de los sedimentos costeros está cambiando por acción antropogénica. Algunas investigaciones de línea base han señalados que los niveles de metales pesados (MARTÍNEZ y SENIOR, 2001, MARTINEZ, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2002) e hidrocarburos (BONELL, 1996; DAKDOUK-ORTIZ, 2009) en sedimentos colectados en el golfo de Cariaco y otras zonas costeras del estado Sucre muestran incrementos ligeros en contrastes a valores de décadas pasadas. En este sentido, los

biomarcadores moleculares y celulares determinados en *E. complanata* son efectivos para alertar tempranamente sobre ecosistemas químicamente impactados.

En el estado Sucre pocos son los registros realizados sobre la condición basal-fisiológica de los organismos que habitan ecosistemas marino-costeros y su relación con los contaminantes de su entorno. Como trabajo pioneros en este tipo de evaluación se encuentran: ROJAS (2005) quien relacionó los niveles de metalotioneínas y metales pesados en temporadas de lluvia y sequía en el mejillón *Perna viridis*. De igual manera, ZAPATA-VÍVENES *et al.*, 2012c comparó biomarcadores inmunológicos y de daño oxidativos usando como modelo *P. viridis* colectados en bancos naturales de explotación y acuicultivos.

En el presente estudio revela un estado saludable en los dos ecosistemas evaluados, fundamentado en los valores basales de las respuestas determinadas en los poliquetos colectados, niveles de metales pesados corporales y en sedimentos, en contraste a los sedimentos contaminados referenciales. De acuerdo a los biomarcadores implementados se demuestra que ambas localidades, tanto la ensenada de Turpialito como Isla Caracas en Mochima, pueden ser consideradas localidades no afectadas por xenobióticos metálicos. No obstante, los niveles de CAT, TBARS y FMN podrían estar indicando algún tipo de alteración temprana en el ecosistema arrecifal de la ensenada de Turpialito, especialmente en los índices de correlación obtenidos con Cd y Pb.

La relación ARN/ADN y PT/ARN indican en poliqueto *E. complanata* un óptimo estado fisiológico, asociado a la capacidad de síntesis de proteínas y crecimiento corporal. En esta investigación se demuestra que tales parámetros pueden ser ligeramente reducidos en organismos expuestos a sedimentos contaminados. Posiblemente estas respuestas bioquímicas indiquen una adaptación metabólica para mantener el balance energético, que implique la reducción de los requisitos del crecimiento y de las actividades fisiológicas básicas, y mayor gasto de energía hacia la activación de los mecanismos encargados de la defensa y desintoxicación de xenobióticos.

Para sobrevivir bajo una condición de estrés oxidativo *E. complanata* se necesita un gasto significativo de energía. Esta demanda energética puede ser relacionada con el metabolismo de proteínas, un mecanismo de compensación bioquímico que conlleva a una reducción de la tasa de crecimiento (SANCHO *et al.*, 1998; MOSLEH *et al.*, 2005). El contenido de proteínas depende del equilibrio dinámico entre la tasa de su síntesis, utilización y degradación. Se ha demostrado que los radios de crecimientos pueden variar por cambios de salinidad y niveles de Zn (CHOPITE, 1990). Sin embargo, algunos índices de crecimientos tales como PT/ADN pueden incrementar bajo condiciones de contaminación por FALUMNV (CAPÍTULO III).

LEMUS (2005) reporta que en juveniles del pez *P. krausii* expuestos a dos dosis de cobre (0,2 y 1,2 mg/l) durante una semana, el radio ARN/ADN y PT/ADN tienden a disminuir, potenciado por una temperatura elevada (30 °C). LODEIROS *et al.*, (1996) evaluaron el efecto ambiental sobre diferentes tallas de *Euvola (Pecten) ziczac*, demostrando correlación entre índice ARN/ADN con el crecimiento y la condición fisiológica. CEDEÑO (2012) reporta que la relación ARN/ADN en el músculo abductor de ejemplares del bivalvo *Lima scabra* está asociada con las condiciones naturales de su hábitat.

Los biomarcadores determinados en *E. complanata* a niveles molecular, bioquímico y celular, tanto en poblaciones naturales expuestos a sedimentos contaminados, marcan diferencias de la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante, pudiendo ser extrapolado en el diagnóstico de hábitats impactados por sustancias tóxicas. La batería de biomarcadores en el orden molecular y celular usados, estuvieron fundamentados en probar los efectos de los contaminantes que son evidentes en el ecosistema, comprobándose que tales niveles de organización son ideales para estudiar relaciones causa-efecto y los mecanismos de acción de los contaminantes.

A pesar que los experimentos de exposición referenciales fueron realizados a largo plazo (36 días), las concentraciones escogidas son relativamente bajas en contraste a las

usadas en ensayos letales. Se ha demostrado que la mayoría de los biomarcadores determinados en *E. complanata* pueden ser utilizado como sistema de alarma temprano, de manera que puedan tomarse medidas de mitigación antes de que el ecosistema se vea afectado. Adicionalmente, estos biomarcadores muestran valor diagnóstico que podrían ayudar de forma predictiva en la toma de decisiones.

En general, se recomienda utilizar una batería de biomarcadores, organizados de forma jerárquica y relacionada funcionalmente entre ellos. El análisis de biomarcadores de exposición y de efecto son instrumentos claves para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los ecosistemas, normalmente en combinación con otras aproximaciones para la evaluación de la calidad del medio, como los análisis químicos convencionales y bioensayos a largo plazo, utilizando como especie centinela a *E. complanata*.

En conclusión los resultados mostrados en la presente investigación sugiere que el poliqueto *E. complanata* es un sensor biológico del bentos marino, adecuado para el estudio de factores causantes de estrés, usando como biomarcadores de metabolismo oxidativo, la peroxidación de los lípidos y a las actividades de las enzimas antioxidantes relacionadas. Además, se recomienda la determinación de biomoléculas (PT, ARN y ADN) como índices de condición fisiológica en los organismos, y sus posibles alteraciones en presencia de xenobióticos.

Este trabajo considera a *E. complanata* como una especie sensor para estimar perturbaciones químicas y niveles de contaminación en ecosistemas costeros. Esta especie suministra señales, a distintos escalas de organización biológica, indispensables para diagnosticar niveles de contaminación en sedimentos. Las alteraciones en su población de células celómicas y variaciones en sus componentes celulares (enzimas, moléculas) son consideradas excelentes biomarcadores que reflejan de forma medible los cambios ante alteraciones ambientales en presencia de xenobióticos. Aunque, existe la desventaja que no todos los biomarcadores cuantificados son independientes a agentes externos.

CONCLUSIONES

- Se demostró la existencia de un patrón de acumulación diferencial de metales pesados en el poliqueto *E. complanata*, mostrando un significativo nivel de almacenamiento de metales hacia la porción posterior del animal.
- Se evidenció variaciones en las defensas antioxidantes constitutivas, tanto enzimáticas y no enzimáticas, en el poliqueto *E. complanata* con diferentes potencialidades en presencia de xenobióticos de distinta naturaleza química. Las respuestas antioxidantes tienden ser inducibles a lo largo del cuerpo por los distintos xenobióticos probados, mostrando las mayores actividades enzimáticas en las regiones media.
- Las respuestas inmunológicas innatas-celulares, especialmente la fagocitosis, y algunos parámetros celulares (TRRN y FMN) pueden ser alterados por dosis subletales de xenobióticos (Cd y FALUMV). Las respuestas a nivel celular parecen ser parámetros sensibles para determinar toxicidad.
- Los resultados muestran algunos beneficios en la combinación de multibiomarcadores para ser usados en impactos subletales relacionados con metales pesados. Aunque, al parecer, los marcadores moleculares determinados presentaron una mayor sensibilidad en comparación a los biomarcadores celulares e inmunológicos.
- Los marcadores biológicos determinados en *E. complanata* son magnificados tanto en presencia de sedimentos contaminados como en presencia de xenobióticos disueltos en agua.
- Las elevadas temperaturas que se registran en nuestras costas entre los meses de junio hasta octubre inducen cambios significativos en la actividad de CAT y daño lipoperoxidativos, meses que coinciden con las mayores tasas de crecimiento de los poliquetos.
- Al parecer el estatus basal antioxidantes en estos organismos responde naturalmente a

cambios térmicos ambientales. Este hecho debe tomarse en cuenta al realizar monitoreos de rigor, ya que puede llegar a confundir un efecto de xenobiótico incorporado con alteraciones de la temperatura en el medio.

- Las localidades costeras del estado Sucre contrastadas, la ensenada de Turpialito e isla Caracas (Mochima), pueden ser consideradas como zonas no impactadas, las mismas pueden ser denominadas zonas referenciales “limpias” para ser contrastadas, en próximas investigaciones, con posibles áreas donde se sospeche de contaminación.
- Los biomarcadores seleccionados y aplicados demuestran la utilidad de los biomarcadores como nuevas herramientas para su aplicación en estudios ambientales, usando como organismo sensor al poliqueto *E. complanata*.

REFERENCIAS

- ABELE-OESCHGER, D.; OESCHGER, R. y THEEDE, H. 1994. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 106: 101-110.
- ABELE, D.; GROGPIETSCH, H. y PFRTNER, H.O. 1998. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental pO₂, temperature, H₂O₂ and H₂S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 163: 179–191.
- ABELE, D. y PUNTARULO, S. 2004. Formation of reactive species and induction antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138 A: 405-415.
- ACOSTA, V. 2001. Estado fisiológico de poblaciones del guacuco *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en ambiente con diferentes grados de contaminación. Trabajo de postgrado. Departamento de Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná.
- ACOSTA, V. Y LODEIROS, C. 2003. Índice ARN/ADN en poblaciones de la almeja *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae) provenientes de localidades con diferentes niveles de contaminación. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 5 (13): 378-382.
- ARIAS-D., A. y GARCÍA, J. 2001. Concentración de los metales pesados Cu y Pb y su relación con la actividad enzimática glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa en el mejillón (*Perna viridis*). *Zootecnia Trop.*, 19(2): 115-129
- AUSTEN, M.C.; LAMBSHEAD, P.J.D.; HUTCHINGS, P.A.; BOUCHER, G.; SNELGROVE, P.V.R.; HEIP, C.; KING, G.; KOIKE, I. y SMITH, C. 2002.

Biodiversity links above and below the marine sediment–water interface that may influence community stability. *Biodiversity and Conservation*, 11: 113–136.

ATSDR. 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.

AZEVEDO, F. A. y DA MATTA, A.A. 2004. As bases toxicológicas da ecotoxicología. Intertox. Rima, São Pablo, Brasil. 322 pp.

BEYTUT E. y AKSAKAL, M. 2002. The effects of long-term supplemental dietary cadmium on lipid peroxidation and the antioxidant system in the liver and kidneys of rabbits. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 26: 1055-1060.

BOCCHETTI, R.; VIRNO LAMBERTI, C.; PISANELLI, B.; RAZZETTI, E.M.; MAGGI, C.; CATALANO, B.; SESTA, G.; MARTUCCIO, G.; GABELLINI, M. y REGOLI, F. 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.*, 66, 24–26.

BAURNFALK, Y.A. 1979. On the pumping activity of *Arenicola marina*. *Neth. J. Sea Res.*, 13:422-427

BONELL, D. 1996. Contaminación por hidrocarburos en el agua superficial del Golfo de Cariaco y Río Manzanares. Trabajo de ascenso a Prof. Agregado. Universidad de oriente, Cumaná, Venezuela. 42 pp.

BONILLA, J.; ARANDA, S.; RAMÍREZ, C.; MOYA, J. y MÁRQUEZ, A. 2003. Calidad de los sedimentos superficiales de la ensenada grande del obispo, estado Sucre-Venezuela.

BORKOVIĆ, S.S.; ŠAPONJIĆ, J.S.; PAVLOVIĆ, S.Z.; BLAGOJEVIĆ, D.P.; MILOŠEVIĆ, S.M.; KOVAČEVIĆ, T.B.; RADOJIČIĆ, R.M.; SPASIĆ, M.B.;

- ŽIKIĆ, R.V. y SAIČIĆ, Z.S. The activity of antioxidant defense enzymes in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2005**, *141*, 366–374.
- 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.
- BUCHNER, T.; ABELE-OESCHGER D. y THEEDE H. 1996. Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. *Mar. Ecol. Progr. Series*;143:141–150.
- BULOW, F.J. 1987. RNA-DNA ratios as indicator of growth in fish. En: SUMMERFELT, J.R. y COBB, C. S. (Eds): age and growth in fish. Iowa state university Press, Ames, Iowa, pp. 255-367.
- BOUCHE, M.L.; HABETS, F.; BISGIANTI-R., B. y VERNET, B. 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *T. tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, *46* (3): 246-251.
- BURTON, K.1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, *62*: 315-323.
- CADENAS, E.; KELVING, J. y DAVIES, A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, *29*:222-230.
- CAMBELL, P.N. y SARGENT, J.R. 1967. Estimation of ARN by orcinol method of mejbum (1939). En: Techniques in protein biosynthesis. Vol. I: Cambell P.N. y SARGENT, J.R (Edit). Academic Press. London, pp.301-302.

- CAMPILLO, J.A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ, B.; BENEDICTO, J.; VALDÉS, N. J.; 2007. Biological effects of contaminants in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Iberian Mediterranean coast. 101-115. En UNEP/MAP/MED POL: MED POL Biological Effects Monitoring Programme: Achievements and Future Orientations: Proceedings of the Workshop, Alessandria, Italy, 20 - 21 December 2006. MAP Technical Report Series No. 166. UNEP/MAP: Athens.
- CAMUS, L.; DAVIES, P.E.; SPICERS, J.L. y JONES, M.B. 2004. Temperature dependent physiological responses of *Carcinus maenas* exposed to copper. *Mar. Environ. Res.*, 58 (2-5): 781-785.
- CEDEÑO, A. 2012. Metales Pesados, Metalotioninas y Relación ARN/ADN del Bivalvo *Lima Scabra*, Colectado en dos Zonas de la Isla De Cubagua, Estado Nueva Esparta, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciada en bioanálisis.
- CHANG M., WANG W.N., WANG A.L., TIAN T.T., WANG P., ZHENG, Y. y LIU, Y. 2009. Effects of cadmium of respiratory burst, intracellular Ca^{+2} and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149 C:581-586.
- CAJARAVILLE, M.; BEBIANNO, M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. y VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.*, 247: 295-311.
- CHARZEDDINE, L., J. ANDRADE, C. MARTINS, S. CHARZEDDINE y M. PÉREZ. 2002. Variación de metales pesados en *Americanuphis magna* (Annelida: Polichaeta) y en sedimentos de la región nororiental de Venezuela. *Saber*, 14 (2):119-125.
- CHENG, T. 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defenses mechanism of

- Crassostrea virginica*: total and differential haemocyte counts. *J. Invert. Pathol.*, 51: 207-214.
- 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.
- CHOPITE, J. y NUSETTI, O. 1989. Efectos del Zinc y el cambio de salinidad sobre el contenido de proteínas, ARN, ADN y las actividades máximas de las enzimas claves glucolíticas y oxidativas en tejidos de juveniles de *Orthopristis ruber* (Pisces: Haemulidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente*, 18 (1&2): 151-158.
- CHÓPITE, J. 1990. Efectos del zinc y la salinidad sobre el crecimiento y el metabolismo energético del musculo blanco e hígado de juveniles del coro-coro *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1930) PISCES: HAEMULIDAE. Tesis para optar al grado de Magister Scintiarum en Biología Aplicada.
- CORDOVA-COVA, L.A. 1995. Sensibilidad de pruebas inmunológicas y bioquímicas en *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomididae) como ensayos para evaluar la toxicidad de cadmio y cobre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciada en biología.
- DAKDOUK-ORTIZ, S. 2009. Determinación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en química. 74 pp.
- DA ROSA, C.; LUMAN, M.; ABREU, P.; GERACITANO, L. Y MONSERRAT, M. 2005. Antioxidant mechanisms of the nereidae *Laeonereis acuta* (Annelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide. *Physiol. Biochem. Zool.*, 78 (4): 641-

649.

- DA ROSA, C.E., BIANCHINI, A. y MONSERRAT, J.M. 2008. Antioxidant responses of *Laeonereis acuta* (Polychaete) after exposure to hydrogen peroxide. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 41: 117-121.
- DAS, K.; DEBACKER, V. y BONGUEGNEAU, M. 2000. Metallothioneins in marine mammals. *Cell. Mol. Biol.*, 46: 283-294.
- DHAINAUT, A. y SCAPS, P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.*, 79: 233-253.
- DEAN, H.K. 2008. The use of polychaetes (Annelids) as indicator species of marine pollution: a review. *Rev. Biol. Trop.*, 4: 11-38.
- DEL VALLS, T. y CONRADI, M. 2000. Avances en ecotoxicología marina: Comparación entre tests de laboratorio y estudios *in situ* para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. *Ciencias Marinas*, 26(1): 39-64.
- DEPLEDGE, M. H. y RAINBOW, P. S. 1990. Models of regulations and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B: 783-786.
- DEMUYNCK S y DHAINAUT-COURRTOIS N. 1994. Metal protein binding patterns in the polychaete worm *Nereis diversicolor* during short-term acute cadmium stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C: 59-64.
- DIALIANNIS, S.; DOMOUHTSIDO, G.P., RATTOPOULOU, E. KALOYIANNI, M. Y DIMITRIADIS, V.K. 2003. Evaluation of neutral red retention assays, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, 56: 443-470.
- DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDER, B.M. y VANVELD, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En: RAND, G.M.

- (Ed). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Segunda Edición. pp. 223-255.
- ELLMAN, G.L. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.*, 74: 443-450.
- ENGEL, D.W. y BROEWER, M. 1991. Short-term Metallothionein and copper changes in blue crabs at ecdysis. *Biol. Bull.*, 180: 447-452.
- ERCAL, M., GURER-ORHAN, H. Y AYKIN-BURNS, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Top. Med. Chem.*, 1: 529-539.
- FANG, J., WU, R., ZHENG, G., LAM, P. y SHIN P. 2008. [Induction, adaptation and recovery of lysosomal integrity in green-lipped mussel *Perna viridis*](#). *Mar. Pollut. Bull.*, 57(6-12): 467-72.
- FERNÁNDEZ, B.; CAMPILLO, J.A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, C. y BENEDICTO, J. 2011. Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in Mediterranean waters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52: 479-491.
- FERNLEY, P. W.; MOORE, M. N. ; LOWE, D.M.; DONKIN, P. y EVANS, S. 2000. Impact of the Sea Empress oil spill of lysosomal stability in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.*, 50:451-455.
- FERREIRA-CRAVO, C.; PIEDRAS, M.; MORAES, F.M.; FERREIRA, J.L.R.; de FREITAS, D.P.S.; MACHADO, M.D.; GERACITANO, M.A. y MONSERRAT, J.M. 2007. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the stuarine polychaeta *Laeonereys acuta* (Nereididae). *Chemosphere*, 66: 1367-1374.
- FRIDOVICH, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.

- FONTES, M.; [MARILLEY M](#), [LE PARCO](#) y [THOUVENY Y](#). 1980. Variations in accessibility of DNA during traumatic regeneration by *Owenia fusiformis* (Polychaete: annelid). *Cell. Differ.*, 9(2):83-93.
- 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. *Am. Zool.*, 40: 412-420.
- 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 No. 50, London, International Maritime Organization. pp 66–69.
- GERACITANO, L.A.; BOCCHETTI, R.; MONSERRAT, J.M.; REGOLI, F. y BIANCHINI, A. 2004a. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Mar. Environ. Res.*, 58: 1-17.
- GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M. Y BIANCHINI, A. 2004b. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.*, 58: 625-630.
- GOVEN, A. J; FITZPATRICK, L. y VENABLES, B. 1994. Chemical toxicity and host defense in earthworms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 712: 280-299.
- GOVEN, A.; CHEN, S.; FITZPATRICK, L. Y. VENABLES, B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) celomic and celomocytes: enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3: 607-613.
- GOVEN, A.; FITZPATRICK, L. Y VENABLE, B. 1996. Chemical toxicity and host defence in earthworm. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 712: 280-299.
- GOVEN, A.J. y KENNEDY J. 1996. Environmental pollution and toxicity in invertebrates:

- An earthworm model for immunotoxicology. *Adv. In Comp. and Envirom. Physiol.* 24: 170-211.
- GUTIÉRREZ-GALINDO, E.; VILLAESCUSA-CELAYA, J. y ARREOLA-CHIMAL, A. 1999. Bioacumulación de metales en mejillones de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Ciencias Marinas*, 25(4): 557-578.
- HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, J.M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metal and disease. *Biochem. J.*, 219: 1–14.
- HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, J. 1999, Free radicals in biology and medicine. 3th Edition. Claredon Press. Oxford and New York. 936 pp.
- HAUSCHILD, K. y GRIESHABER, M. K. (1997). Oxygen consumption and sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina* (L.) at different ambient oxygen partial pressures and sulfide concentrations. *J. Comp. Physiol.*, 167 B, 378–388.
- HAUTON, C., HAWKINS, L.E. y HUTCHINSON, S. 1998. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp. Biochem. Phys. B*, 119: 619-623.
- HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.J.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, PH.; MACGREGOR, J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-91.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M. Y STOREY, K. B. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. En: *K.B. Storey and J.M. Storey Vol. 2: Protein Adaptations and Signal Transduction. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 263-287.*
- HERNÁNDEZ, A. 2006. Metalotioneínas y lipoperoxidación en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* expuesta a cadmio. Tesis de grado. Departamento de Biología,

Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela.

- HOMA, J.; STÜRZENBAUM, S.; MORGAN, A. Y PLYTYCZ, B. 2007. Disrupted homeostasis in coelomocytes of *Eisenia foetida* and *Allolobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals. *European J. Soil Biol.*, 43: 273-280.
- HUTCHING, P. 1998. Biodiversity and functioning of the polychaetes in bentic sediments. *Biodiversity and conservation*, 7: 1133-1145.
- KELLER, M., SOMMER, A.M. PÖRTNER, H.O. y ABELE, D. 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.*, 207: 2529-2538.
- KUDENOV, J.D. 1974. The reproductive biology of *Eurythoe complanta* (Pallas, 1766), (Polychaete: Amphinomidae). Ph. D. Dissetation. Arizona University.
- LAM, K.S. y GRAY, J.S. 2003. The use of biomarkers in enviromental monitoring programmes. *Mar. Pollut.Bull.*, 46: 182-186.
- LEE, R.F. 1981. Mixed function oxygenases (MFO) in invertebrates marine. *Mar. Biol. Lett.*, 2:87-105.
- LEE, R.F. 1998. Annelids cytocrome P450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121C:173-179.
- LEMUS, M. 1992. Influencia de la temperatura sobre la acumulación y depuración de cobre en juveniles de *Petenia kraussi*, Steindachner, 1878 (Pisces: Cichlidae), efecto sobre su condición fisiológica. Trabajo para optar al título de Magister Scientuiarum en Biología Aplicada.
- LEMUS, M. 2005. Relación ARN/ADN como indicador de condición fisiológica de juveniles de peces expuestos a metales pesados. Trabajo de ascenso a la categoría de Profesor asociado. Universidad de Oriente.

- LESSER, M.P. y KRUSE, V.A. 2004. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: Metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 137, 495–504
- LIÑERO, I. 1978. Algunos aspectos biológicos y ecológicos de los poliquetos errantes. *Lagena*, 41-42:45-53.
- LINERO-ARANA y DIAZ, O. 2010. Amphinomidae y Euprosinidae (Annelida: Polychaeta) de la costa nororiental de Venezuela. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 107-120.
- LIVINGSTONE D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 42:656–666.
- LODEIROS, C.; FERNÁNDEZ, R.; BONMATI, A.; HIMMELMAN, J. y CHUNG, K. 1996. Relation of RNA/DNA ratios to grow for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. *Mar. Biol.*, 126: 245-251
- LOWE, D.; MOORE, M. y EVANS, B. 1992. Contaminant impact of interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab, *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 135-140.
- LOWE, D.; FOSSATO, V. y DEPLEDGE, M. 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Venice lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129: 189-196.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDAL, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUCAN BOUCHE, M.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; ARSAC, F. y VERNET, C.1999. An original decontamination process developed by aquatic *oligochaete Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat. Toxicol.*, 45: 9-17.

- MANDUZIO, H.; MONSINJON, T.; GALAP, C.; LÉBOULENGER, 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.
- MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M.; ORBEA, A.; CANCIO, I. y CAJARAVILLE, M. 2004. Biomonitoring of environmental pollution along the Basque coast, using molecular, cellular and tissue level biomarker: an integrative approach. En: Borja, A. y Collins, M. (Eds). *Oceanography Marine Environment of the Basque Country*. Elsevier Oceanography Series N° 70, Elsevier Amsterdam. pp. 335-364.
- MARCANO, L.; NUSSETI, O.; RODRÍGUEZ GRAU, J. y VILAS, J. 1996. Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal binding protein in the polychaeta *Eurythoe complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114: 179-184.
- MARCANO, L.; NUSETTI, O.; RODRÍGUEZ-GRAU, J.; BRICEÑO, J. y VILAS, J. 1997. Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59:22-28.
- MARCANO, O.; NUSETTI, O.; ZAPATA-VÍVENES, E.; NUSETTI, S. y ESCLAPÉS, M. M. No. 6. 2006. Fuel Oil Effects on Antioxidant Enzymes and Immunological Responses in the Fish *Thalassophryne maculosa* (Pisces: Batrochoididae). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1 (1): 31-35.
- MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M.; ORBEA, A.; CANCIO, I. y CAJARAVILLE, M. 2004. Biomonitoring of environmental pollution along the basque coast, using molecular, cellular and tissue level biomarker: an integrative approach. En: *Oceanography marine of environment of the Basque Country*. Borja, A. & Collins, M. (eds). Elsevier Oceanography Series N° 70, Elsevier Amsterdam. 335-364 pp

- MARÍN, R.; PROVERBIOS, T.; RODRÍGUEZ, A.J. y TISKOW, G.1993. Peroxidación lipídica y actividades ATPásicas. *Acta Cient. Ven.*, 44: 125-130.
- MARTIN, N.A. 1986. Toxicity of pesticides to *Allobophora caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae). *N.Z.J. Agr. Res.*, 29: 699-706.
- MARTÍNEZ, G. y W. SENIOR. 2001. Especiación de metales pesados (Cd, Zn, Cu y Cr) en el material en suspensión de la pluma del río Manzanares, Venezuela. *Interciencia* 26: 53-61.
- MARTÍNEZ, G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos del golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 41: 83-93.
- MARTINEZ, G., RODRÍGUEZ, L. y SENIOR, W. 2002. Especiación de Cd, Zn, Cr y Pb en núcleos de sedimentos de la Bahía de Bergantín, Edo. Anzoátegui, Venezuela. *Interciencia* 27 (4): 173-179.
- MARTÍNEZ, G. 2006. Contaminación por metales pesados en sedimentos superficiales de seis regiones marino-costera del oriente de Venezuela. Trabajo para optar a la categoría de profesor asociado. Departamento de Oceanografía, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- MATHIEU, A.; LEMAIRE, P.; CARRIERE, S.; DRAI, P.; GIUDICELLI, J.; LAFAURIE, M. 1991. Seasonal and sexlinked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 22, 45-57.
- MATOZZO, V., BALLARIN, L., PAMPANIN, D.M. Y MARIN, M. G. 2001. Effects of copper and cadmium exposure of functional responses of the hemocytes of clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 163-170
- MÉNDEZ, N. y PAÉZ-OSUNA, F. 1998. Trace metals in two populations of the fireworm

- Eurythoe complanata* from Mazatlán bay: effect of body size on concentrations. *Environm. Pollut.*, 102: 279-285.
- MENDOZA, A.R., AGUILERA_G., C. y CARREÓN, M.L. 2002. Ácidos nucleicos para evaluar las condiciones de larvas de peces. *Ciencia UANL*, 5 (2): 210-217.
- MONSERRAT, J.M. 2006. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C*
- MORGAN, A.; STÜRZEMBAUM, S.; WINTERS, C.; GRIME, G.; AZIZ, N. y KILLE, P. 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57:11-19.
- MOREIRA, S.M., LIMA, I., RIBERO, R. y GUIHERMINO, L. 2006. Effects of estuarine sediment contaminated on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hedistes diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquat. Toxicol.*, 78: 108-210.
- MORALES-CASELES., C., LEWIS, C., RIBA, I., DEL VALLS, T. y GALLOWAY, T. 2009. A multibiomarker approach using the polychaete *Arenicola marina* to assess oil-contaminated sediments. *Environ, Sci. Pollut. Res.*, 16: 618-629.
- MOSLEH, Y., PARIS-PALACIS, S., COUDERCHET, M., BIAGIANTI-RISBOURG, S. y VERNET, G., 2005. Effects of the herbicide isoproturon on metallothioneins, growth, and antioxidative defenses in the aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Ecotoxicology*, 559–571
- NARANJO, C. 2012. Efectos del cadmio sobre las respuestas inmunológicas y estabilidad lisosomal en *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca: Penaeidae) y posterior estimulación con bacterias. Trabajo de grado para optar por el título de Magister Scientiarum en Biología Aplicada. UDO.
- NASCIMENTO, E. 2006. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos:

- biotransformação. En: ZAGATTO, P.A. Y BERTOLETTI, E. (Eds). Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. Rima Editora, Sao Pablo, Brasil.
- NICHOLSON, S. 2003. Lysosomal membrane stability phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal copper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.
- NICHOLSON, S. y LAM, P. 2005. Pollution monitoring in southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ. Inter.*, 31(1):121-132.
- NICHOLSON, S. y SZEFER, P. 2003. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 46:1040-1043.
- NUSETTI, O. y MORALES, D. 1988. Crecimiento en algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L.1758): composición de ADN, relaciones ARN/ADN y reservas energéticas. *Acta Cient. Ven.*, 39: 289-293.
- NUSETTI, O.A.; SALAZAR-LUGO, R.; RODRÍGUEZ-GRAU, J. y VILAS J. 1998. Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentrations of copper. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119C: 177-183.
- NUSETTI, O.; ESCALPÉS, M.; SALAZAR, G.; NUSETTI, S. y PULIDO, S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 576-581.
- NUSETTI, O.; MARCANO, L.; ZAPATA, E.; ESCLAPÉS, M.; NUSETTI S. Y LODEIROS, C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales

de fuel oil nº 6. *Interciencia*, 29: 324-329.

- NUSETTI, O.; ZAPATA-VÍVENES, E.; ESCLAPÉS, M. Y ROJAS, M. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polichaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 1-6.
- OHKAWA, H. OHISHI, N. y YAKI, K. 1979. Assays for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 331-358.
- OLAKOLU, F.C.; HASSAN, A.A. y AKINDELE, S.K. 2012. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in gills and muscle of blue crabs *Callinectes amnicola* from Lagos lagoon. *Euro. J. Sci. Res.*, 80 (3): 406-415.
- PAVLOVIĆ, S. Z.; BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S.; RADOVANOVIĆ, T.B.; PERENDIJA, B.R.; DESPOTOVIĆ, S.G.; GAVRIĆ, J. y SAIČIĆ, Z. Activity of oxidative stress biomarkers in the white muscle of red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic sea. *Arch. Biol. Sci.*, 61 (4), 693-701
- PIPE, R. y COLES, J. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish. Shellfish. Immun.*, 5: 581-595.
- PORTE, C, SOLÉ, M. BORGHI, V., MARTÍNEZ, M., CHAMORRO, J., TORREBLANCA, A., ORTIZ, M., ORBEA, A., SOTO, M y CAJARAVILLE, M.P. 1991. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. *Biomarkers*, 6 (5): 335-350.
- RAMOS R. y GARCÍA E. 2007. Induction of mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes in the coral *Montastrea faveolata* on acute exposure benzo(a)pyreno. *Comp. Biochem. Physiol.*, 144 (4): 348-355.
- REISH, D. J. 1986. Benthic invertebrates as indicators of marine pollution: 35 years of

- study. IEEE Oceans`86 Conference Proceedings. Washington, D.C., September 23-25, pp. 885-888.
- REISH, D.J. 1998. The use of larvae and small species of polychaetes in marine toxicological testing. En: WELL, P., LEE, K. y BLAISE, C. (Ed)., *Microscale Testing in Aquatic Toxicologic: Advances, Techniques and Practice*. CRC Press. First Edition. pp 383-392.
- REISH, D. y GERLINGER, T. 1997. A review of the toxicological studies with polychaetous annelids. *Bull. Mar. Sci.*, 60(2): 584-607.
- REYES, R. 1999. Metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia*, 24(6).
- RINGWOOD, A.H.; CONNERS, D.E. y HOGUET, J. 1998. Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 166: 163-171.
- RINGWOOD, A.H., CONNERS, D.E., KEPPLER, C.J. y DINOVO, A.A. 1999. Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed in situ. *Biomarkers*, 4: 400-415.
- RIVERA, L. 2004. Evaluación de la actividad lisosomal como bioindicador de cambios por metales pesados en *Tivela mactroides* de una zona costera del estado Anzoátegui, Venezuela. Tesis de pregrado.
- RODRÍGUEZ-GRAU, J., VENABLES, B., FITZPATRIC, L., GOVEN A. y COOPER, E. (1989). Suppression of secretory rosette formation PCBs in *Lumbricus terrestris*, and earthworm immune assays for humoral immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8:1201-1207.
- RODRIGUEZ, W. 2010. Metalotioneínas y metales pesados en el guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia), colectado en playa Caicara, estado Anzoátegui,

Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en biología.

RODRÍGUEZ, J. y ESCAPLÉS, M. 1996. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Gerencia General de Tecnología del Departamento de Ecología y Ambiente. (INTEVEP-PDVSA).pp.

ROESEJADI, G. 2000. Metal transfer as a mechanism for metallothionein mediated metal detoxification. *Cell. Mol. Biol.*, 46: 493-405.

ROMÉO, M., GHARBI-BOURAONI S., GNASSIA-BARELLI, M., DE LLAI M. y AISSA, P. 2006. Responde of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. 359 (1-3): 135-144.

ROMERO, D. 2010. Distribución y comportamiento de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas organoclorados en sedimentos superficiales del sector oriental del golfo de Cariaco, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título Magister Scientiarum en Ciencias Marinas mención Oceanografía Química.

RONISZ, D.; LARSSON, D.G.J.; FORLIN, L.1999. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 124, 271–279.

ROJAS DE ASTUDILLO, L.; CHANG, I.; AGARD, J.; BEKELE, I. y HUBBARD, R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oysters (*Crassostrea* sp.) from Trinidad and Venezuela. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 410-415.

ROJAS DE ASTUDILLO, L.; CHANG YEN, I. y BEKELE, I. 2005 Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*,

53(1): 41-53.

SALAZAR-LUGO, R. 1993. Efecto de dosis subletales de cobre en el sistema inmunitario, metabolismo y crecimiento del poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae). Trabajo para optar por el título de Magister Scientiarum en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente.

SALAZAR-LUGO, R., O. NUSETTI & J. RODRÍGUEZ-GRAU. 1997. Efecto del cobre sobre los mecanismos de defensa celular del poliqueto *Eurythoe complanata*.- Viabilidad, viabilidad total de células y respuesta fagocítica. pp. 3-6.

SALAZAR-LUGO, R. 2009. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *REDVET*, 10 (11): 1-16

SÁNCHEZ, G. 2008. Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten *Lima scabra* (Born, 1178) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciada en biología.

SANCHO, E., FERRANDO, M.D., FERNANDEZ, C. y ANDREU, E. 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41 :168–175.

SANDRINI, J.Z., REGOLI, F., FATTORINI, D., NOTTI, A., FERREIRA, A.I., LINDE-ARIAS, A.R., LAURINO, J., BAINY, A.C.D., MARINS, L.F.F., MONSERRAT, J.M., 2006. Short-term responses to cadmium exposure in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): sub-cellular distribution and oxidative stress generation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 1337–1344.

SADIQ, M. 2002. *Toxic metals in marine environments*. Marcel Dekker Inc, New York.

SAUVÉ, S.; HENDAWI, M.; BROUSSEAU, P. y FOURNIER, M. 2002. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace

elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52: 21-29.

SEGNINI, M.I. 1990. Algunos aspectos ecofisiológicos de *Petenia kraussii* Steindachner 1878 (Pisces: Cichlidae). Trabajo de grado para optar por el título de Magister Scientiarum en Biología Aplicada. UDO. Sucre.

SEIS, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free. Rad. Biol. Med.*, 27 (9/10): 916-921.

SHEEHAN, D. y POWER, A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 123, 193–199.

SMITH, R.W.; BLANEY, S.C.; DOWLING, K.; STURM, A., JONSSON, M. y HOULIHAN. 2001. Protein synthesis costs could account for the tissue-specific effects of sub-lethal copper on protein synthesis in rainbow (*Oreochromis massambicus*). *Aquat. Toxicol.*, 53 (3-4): 265-277.

SNELGROVE, P.V.R.; BLACKBURN, T.H.; HUTCHINGS, P.A.; ALONGI, D.M.; GRASSLE, H.; HUMMEL, G.; KING, I. y KOIKE, P.J.D. 1997. The importance of marine sediment biodiversity in ecosystem processes. *Ambio*, 26:578–583.

SOKAL, R. y ROHLF. 1979. Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blumme. Ediciones Madrid. 872 pp.

SRAIN, B. y RUDOLPH, A. 2010. Acetylcholinesterase activity, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the clam *Semele solida*: can this species be used as a bioindicator?. *Rev. Biol. Mar. Ocean.*, 45 (2):227-233.

SUN, F.H., ZHOU, Q.X. y ZHANG, Q.R. 2006. Influences of petroleum on accumulation of copper and cadmium in the polychaete *Nereis diversicolor*. *J. Environ. Sci.*, 18 (1), 127–132.

- SUN, F. y ZHOU, Q. 2008. Oxidative stress biomarkers of the polichaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, 70: 106-114.
- STOREY, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1715–1733.
- STÜRZEMBAUM, S.; WINTERS, C.; GALAY, M.; MORGAN, A. y KILLE, P. 2001. Metal ion trafficking in earthworms: Identification of a cadmium-specific metallothionein. *J. Biol. Biochem.*, 276: 34013-34018.
- TESSIER A.; CAMBELL, P. y BISSON., M. 1979. Sequential extraction procedure for speciation of trace metals. *Anal. Chem.*, 51: 844-851
- TOYOKUNI, S., OKAMOTO, K., YODONI, J. y HIOCI, H. 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters*, 358 (1-3):
- UNEP/RAMOGÉ. 1999. Manual on the biomarker recommended for the MED POL biomonitoring programme, UNEP, Athous, 92 pp.
- UNEP/MAP/MED. 2007. Biological Effects Monitoring Programme: Achievements and Future Orientations: Proceedings of the Workshop, Alessandria, Italy, 20 - 21 December 2006. MAP Technical Report Series No. 166. UNEP/MAP: Athens.
- VALAVANIDISA, A., VLAHOGIANNIA, T., DASSENAKISB, M. y SCOULLOS, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64, 178–189.
- VÁSQUEZ-NÚÑEZ, R.; MÉNDEZ, N. y GREEN-RUIZ, C. 2007. Bioaccumulation and elimination of Hg in the fireworm *Eurythoe complanata* (Annelida:Polychaeta) from Mazatlan, México. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 52 (4): 541-548.
- VIARENGO, A.; CANESI, L.; PERTICA, M. y LIVINGSTONE, D.R. 1991.

Seasonal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 187–190.

VIARENGO, A. y NOTT, J.A. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C: 355-372.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F. y FABBRI. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.*, 44 (1): 69-84.

VIARENGO A., BURLANDO, B., CARATTO, N. y PANFOLI, I. 2000a. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.*, 46 (2): 407-417.

VIARENGO, A.; LAFAURIE, M.; GABRIELIDES, G.P.; FABBRI, R.; MARRO, A. Y ROMÉO, M. 2000b. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Mar. Environ. Res.*, 49: 1-18.

VIARENGO, A., BURLANDO, B., GIORDANA, A., BOLOGNESI, C. y GABRIELIDES, G.P., 2000c. Networking y expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. *Mar. Environ. Res.*, 49: 483-486.

VIDAL, D. y HORNE, A. 2003. Mercury toxicity in the aquatic oligochaete *Sparganophilus pearsei* II: Autotomy as a novel form of protection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 45: 462-467.

WANG, W.X. 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar. Ecol. Pro. Ser.*, 243: 295-309.

WANG, M.E. y ZHOU, Q.X., 2006a. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels. *Environ. Pollut.*, 144: 572–580.

- WANG, M.E. y ZHOU, Q.X., 2006b. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 190–197.
- WEEKS, J. y SVENDSEN, C. 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (10): 1801-1805.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; MARCON, J.L.; FRAGA, C.G. y BOVERIS, A. 2000. Comparative antioxidant defenses in vertebrates—emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.*, 7: 33–45.
- WILHELM FILHO, D.; TRIBES, T.; GASPARI, C.; CLAUDIO, F.D.; TORRES, M.A. y MAGALHAES, A.R.M. 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, 203, 149–158.
- WISTON, G.W. y DI GIULIO, R.T. 1991. Proxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19:137–161.
- WISTON, G.W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110C:173–176.
- WU, J-P. y CHEN, H-C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) *Chemosphere*. 57: 1591–1598.
- YOUNG y ROESIYADI, 1983. Reparatory adaptation to copper-induced injury and occurrence of a copper-binding protein in the polychaete, *Eudistylia vancouveri*. *Mar. Poll. Bull.*, 14 (1): 30-32.
- ZAPATA-VIVENES, E. 2001. Regeneracion tisular y estrés oxidativo en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) expuestos a concentraciones

subletales de una fracción de lubricantes usados de motores de vehículo. Tesis de licenciatura.

ZAPATA-VÍVENES, E. 2005. Metalotioninas y enzimas glucolíticas regulatorias en el mejillón verde *Perna viridis* sujeto a estrés oxidativo. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster Scientiarum en Biología Aplicada, mención Ecología y Toxicología Ambiental

ZAPATA-VÍVENES, E.; NUSETTI, O.; MARCANO, L.; ESCALPÉS, M. y ARREDONDO, L. 2005. Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas*, 31 (1): 1-9.

ZAPATA-VÍVENES, E. Y NUSETTI, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shell. Res.*, 26 (2): 1-10.

ZAPATA-VÍVENES E., NUSETTI O., SANCHEZ G. y ANTÓN M. 2012a. Inmunotoxicidad y daño lisosomal en la ostra perla *Pinctada imbricata* expuesta a fracciones acuosas de aceites usados de motores de automóviles. *LA J. Aquat. Res.* (En Revisión)

ZAPATA-VÍVENES, E., TOVAR-SÁNCHEZ, M., NUSETTI, O., y LEMUS, M. 2012b. Metalotioneínas, defensas antioxidantes y tolerancia a la anoxia en el mejillón verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) bajo exposición aguda a cadmio. *J. Soc. Br. Ecotox.* (in press).

ZAPATA-VÍVENES, E., ROJAS-ASTUDILLO, L., SÁNCHEZ, G. y BARRETO, M. 2012c. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) colectado en costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38 (3): 517-528.

- ZORRILA-GARCÍA, A. E. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 21 (3): 178-185.
- ZHOU, Q.X.; KONG, F.X. y ZHU, L., 2004. *Ecotoxicology: Principles and Methods*. Science Press, Beijing, pp. 161–217.
- ZHAO, C, XIAOXU L., SHIBIN L. y CHANG, Y. 2011. Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. *African J. Biotechnol.*, 10(64): 13968-13973.

HOJA DE METADATOS

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

Título	<i>Eurythoe Complanata</i> Pallas 1766 (Polychaeta: Amphinomidae) Como Organismo Sensor De Contaminación En Costas Del Estado Sucre, Venezuela
---------------	--

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Zapata V, Edgar A	CVLA C	
	e-mail	edzapata2002@yahoo.co m
	e-mail	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

estabilidad lisosomal
Camarones
Hemocitos
<i>L. vannamei</i> ,
respuestas inmunológicas
lisozima.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOLOGÍA MARINA
	ECOTOXICOLOGÍA
	BIOMARCADORES

Resumen (abstract):

Con el interés de evaluar la calidad ambiental de dos zonas de arrecifales localizadas en costas del estado Sucre (Venezuela), la ensenada de Turpialito (Golfo de Cariaco) e isla Las Caracas (Parque Nacional Mochima), se realizó la determinación de una gama de marcadores de contaminación, a diferentes niveles de organización biológica (molecular, celular y tisular), usando como organismo sensor al poliqueto *E. complanata* (Amphinomidae). Adicionalmente, se realizaron ensayos subletales referenciales en presencia de los siguientes xenobióticos: cadmio, peróxido de hidrógeno y una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV), durante períodos de exposición (7, 14 y 21 días); cambio de temperatura (24 y 28 °C) y sedimentos contaminados por mezclas de contaminantes. Para los distintos tratamientos y zonas de estudios se procedió a determinar los niveles de metales pesados contentivos en la pared corporal del poliqueto y en el sedimento; además de parámetros bioquímicos tales como la actividad de enzimas catalasa (CAT), glutatona reductasa (GR), glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH), daño a lípidos de membranas (TBARS), glutatona transferasa (GST), metalotioneínas (MT) y grupos tioles solubles (-SH), actividad de lisozimas, niveles de proteínas (PT), ARN y ADN; parámetros celulares tales como viabilidad, número total (NTC), fagocitosis, frecuencia de micronúcleos (FMN), desestabilización de las membranas lisosomales (TRRN) de celomocitos; y parámetros tisulares: crecimiento y frecuencia autotómica (FA). El poliqueto *E. complanata* presentó la habilidad de acumular metales pesados en su región corporal posterior, con una alta capacidad metabólica y de defensas antioxidantes hacia la región media del organismo. Estas respuestas pueden ser inducidas en presencia de xenobióticos específicos o mezclas complejas de éstos. Durante los 21 días de exposición, la viabilidad, NTC y TRRN fueron reducidas en presencia de la FALUMV, no así con Cd. La actividad de las enzimas y compuestos antioxidantes fueron modulados durante los cambios estacionales de temperatura, tanto en el ambiente como bajo condiciones controladas, logrando un incremento de CAT y G6PDH en los poliquetos colectados en los meses de colecta de junio y octubre (temperaturas > 28 °C). Los niveles de las macromoléculas (proteínas, ARN) no mostraron variabilidad estacional, sin embargo, las concentraciones de ADN aumentan en los meses de altas temperaturas. El coeficiente de crecimiento ARN/ADN mostró sus mayores promedios durante los meses de Octubre y Diciembre, aunque tales variables no se encuentran asociadas a

las tasas de crecimiento corporal determinadas. Estos coeficientes pueden verse afectados por la exposición a tóxicos referenciales, especialmente a la FALUMV. La actividad de CAT se mostró elevada en los organismos expuestos a tóxicos referenciales, al igual que en los organismos colectados en la zona de Turpialito con respecto a los colectados en Mochima. La tasa de crecimiento corporal y los coeficientes proteínas/ARN y proteínas/ADN mostró sus mayores promedios en los organismos de la localidad de la isla Caracas. El NTC fue relativamente mayor en los poliquetos en la localidad de isla Caracas; y un porcentaje de -0,4% en la frecuencia de micronúcleos e incrementada desestabilización de las membranas lisosomales de celomocitos fue observada en los organismos colectados en la ensenada de Turpialito; no obstante sus registros se encuentran por debajo que los mostrados por organismos expuestos a tóxicos de referencia. Los niveles de MT, -SH y lisozimas no presentaron variaciones entre las localidades, pero sí en presencia de contaminantes referenciales. En general, el contraste de los marcadores biológicos usados en poliquetos colectados en el ambiente mostró un estado saludable en ambas zonas evaluadas. Esta investigación demuestra (1) la aplicación de baterías de respuestas biológicas (multibiomarcadores), a nivel molecular, celular y tisular en *E. complanata* para la evaluación de áreas costeras; (2) algunos parámetros sugeridos como biomarcadores específicos de contaminación en presencia de xenobióticos pueden ser alterados por cambios de temperaturas; y (3) esta información fundamenta el uso del poliqueto *E. complanata* como organismo sensor para estudios ecotoxicológicos y la determinación calidad ambiental de ecosistemas marino-costeros.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Osmar Nusetti	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	
Lya ne	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	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	Raquellugo@yahoo.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

--	--	--

Lenguaje: Esp

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-ZapataEdgar.doc	Application de word

Alcance:

Espacial : (Opcional)

Temporal: (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

Nivel Asociado con el Trabajo: DOCTORADO

Área de Estudio:

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

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Letdo el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA *05/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Telemática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



M.SC. Edgar Zapata