



Interciencia

ISSN: 0378-1844

interciencia@ivic.ve

Asociación Interciencia

Venezuela

Nusetti, Osmar; Marcano, Leida; Zapata, Edgar; Esclapés, Mercedes; Nusetti, Sonia; Lodeiros, César  
Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla Pinctada imbricata (mollusca:  
pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil N°6  
Interciencia, vol. 29, núm. 6, junio, 2004, pp. 324-328  
Asociación Interciencia  
Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909306>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
EN LA OSTR PERLA *Pinctada imbricata* (MOLLUSCA: PTERIDAE)  
EXPUESTA A NIVELES SUBLETALES DE FUEL OIL N°6**

Osmar Nusetti, Leida Marcano, Edgar Zapata, Mercedes Esclapés,  
Sonia Nusetti y César Lodeiros

**RESUMEN**

Se evaluó las respuestas inmunológicas y de sistemas enzimáticos antioxidantes que participan en el control de toxicidad de oxidoradicales en la ostra perla *Pinctada imbricata*, después de la exposición aguda (7d) a 25 y 100% de la fracción soluble de Fuel Oil N°6 (FSA), una fuente de hidrocarburos poliaromáticos y de metales pesados en ecosistemas marinos. La actividad de lisozimas en la glándula digestiva y la fagocitosis en los hemocitos fueron determinadas como respuestas inmunológicas humoral y celular, respectivamente, usando levaduras muertas por calor como antígeno para el ensayo de la fagocitosis. La viabilidad y número total de hemocitos también fueron determinados. Las enzimas antioxidantes glutatona transferasa (GST), glutatona reductasa (GR), glutatona peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) fueron evaluadas en extractos

de glándula digestiva y manto. En la glándula digestiva, la exposición a FSA incrementó significativamente las actividades de GST y CAT. En el manto se produjo un aumento en la actividad de GPx y un descenso en las actividades de GST y GR, mientras que CAT no fue afectada. A excepción de la viabilidad celular a la exposición de 100% FSA, los indicadores inmunológicos no fueron afectados por el contaminante. Los resultados muestran la sensibilidad de las enzimas antioxidantes de la glándula digestiva y manto a la exposición subletal aguda de Fuel Oil N°6, sugiriendo un incremento en el flujo de oxiradicales y posibles manifestaciones bioquímicas perjudiciales asociadas con estrés oxidativo en ambos tejidos. Estos parámetros pueden ser utilizados como herramientas potenciales para el estudio de toxicidad de contaminantes en el medio marino.

**Introducción**

El combustible residual de la refinación del petróleo crudo pesado, conocido como Fuel Oil N°6 es ampliamente comercializado para utilizarse especialmente en calderas, motores de

navegación y plantas generadoras de energía eléctrica. El transporte marítimo asociado a la actividad comercial de este producto representa un riesgo de contaminación química para los océanos y ecosistemas costeros, debido a posibles derrames o

disposición inadecuada. Los componentes químicos incluyen, sulfuros, asfaltos, resinas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados (Miller, 1996; Irwin *et al.*, 1997), los que al ser liberados en el ambiente acuático pueden

distribuirse en los distintos niveles de la columna de agua y del sedimento, así como en la biota. En consecuencia pueden producir efectos adversos agudos o crónicos sobre la capacidad de sobrevivencia de las especies en los hábitats impactados.

**PALABRAS CLAVES / Enzimas Antioxidantes / Estrés Oxidativo / Fagocitosis / Lisozima / *Pinctada imbricata* /**

Recibido: 05/09/2003. Modificado: 24/04/2004. Aceptado: 27/04/2004.

Osmar A. Nusetti C. Ph.D. en Bioquímica, Universidad de Manitoba, Canadá. Profesor, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Dirección: Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente (UDO), Cumaná, Venezuela. e-mail: onusetti@cumana.sucre.udo.edu.ve

Leida Marcano. M.Sc. en Ecología, UDO. Profesor, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, UDO, Venezuela. e-mail: @sucre.udo.edu.ve  
Edgar A. Zapata V. M.Sc. en Ecología y Ecotoxicología, UDO. Profesor, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, UDO, Venezuela. e-mail: ezapata@sucre.udo.edu.ve

Sonia Nusetti. Licenciada en Bioanálisis, UDO. Profesor, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, UDO, Venezuela.  
Mercedes Esclapés. M.Sc. en Ecología Acuática, Universidad de Maryland, EEUU. Consultor en Ambiente. Enviro Asesores C.A. Caracas. Venezuela. e-mail: mercedes.esclapes@enviroasesores.com

César Lodeiros. Ph.D. en Ecología Aplicada, Universidad Laval, Canadá. Profesor Asociado, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, UDO. e-mail: clodeiro@cumana.sucre.udo.edu.ve

## SUMMARY

The immune and antioxidant enzyme defenses in pearl oyster *Pinctada imbricata* were evaluated after short-term (7d) exposure to 25 and 100% water-soluble fraction (WSF) of Fuel Oil N°6, a source of polyaromatic hydrocarbon and heavy metal contamination of marine ecosystems. Lysozyme activity in the digestive gland and the phagocytic activity of hemocytes were measured as humoral and cellular immunological responses, respectively, using heat killed yeast cells as antigen for the phagocytosis assay. The viability and total number of hemocytes were recorded. The detoxifying enzymes Glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) were evaluated from the digestive gland and mantle extracts. In the digestive gland the exposure to

WSF treatments resulted in significant increases of GST and CAT. In the mantle, both experimental treatments increased GPx and decreased GST activity, while CAT was not affected. Immunological indicators were not affected by the treatments, excepting cellular viability which decreased under exposure to 100% WSF. The results suggest that the antioxidant enzymes in the digestive gland and mantle of *P. imbricata* are sensitive to short-term exposure to Fuel Oil N°6, suggesting an increased oxidant flux and biochemical manifestations of oxidative injury in both tissues. These parameters should be considered as potential tools for the biomonitoring of marine environmental contamination.

## RESUMO

Avaliou-se as respostas imunológicas e de sistemas enzimáticos antioxidantes que participam no controle de toxicidade de óxido radical na ostra pérola *Pinctada imbricata*, depois da exposição aguda (7d) a 25 e 100% da fração solúvel de Fuel Oil N°6 (FSA), uma fonte de hidrocarbonos poli-aromáticos e de metais pesados em ecossistemas marinhos. A atividade de lisozimas na glândula digestiva e a fagocitose nos hemócitos foram determinadas como respostas imunológicas humoral e celular, respectivamente, usando leveduras mortas por calor como antígeno para o ensaio da fagocitose. A viabilidade e número total de hemócitos também foram determinados. As enzimas antioxidantes glutathione transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) foram avaliadas em extratos de glândula digestiva e manto. Na glândula digestiva, a ex-

posição a FSA incrementou significativamente as atividades de GST e CAT. No manto se produziu um aumento na atividade de GPx e um descenso nas atividades de GST e GR, enquanto que CAT não foi afetada. A exceção da viabilidade celular à exposição de 100% FSA, os indicadores imunológicos não foram afetados pelo contaminante. Os resultados mostram a sensibilidade das enzimas antioxidantes da glândula digestiva e manto à exposição subletal aguda de Fuel Oil N°6, sugerindo um aumento no fluxo de oxidantes e possíveis manifestações bioquímicas prejudiciais associadas com estresse oxidativo em ambos tecidos. Estes parâmetros podem ser utilizados como ferramentas potenciais para o estudo de toxicidade de contaminantes no meio marinho.

La exposición a concentraciones subletales de los constituyentes del Fuel Oil N°6 está relacionada con el desarrollo de patologías asociadas con disfunción del sistema inmunológico y estrés oxidativo (alta incidencia de enfermedades infecciosas, cáncer, mutagénesis, aterogénesis) en una variedad de especies acuáticas. La transformación metabólica de contaminantes tales como hidrocarburos aromáticos y metales pesados, promueve el incremento en la generación de radicales libres, lo que tiene un papel en la aparición de patologías relacionadas con el estrés oxidativo y alteraciones de las defensas inmunológicas (Klein *et al.*, 1991; Di Giulio *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1999; Pipe *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2000; Livingstone, 2001).

Los niveles fisiológicos de radicales libres son mantenidos por defensas antioxidantes no enzimáticas (glutathione reductase, vitaminas A, C y E) y enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase y glutathione transferase). Un aumento en la

producción de radicales libres pueden generar una condición de estrés oxidativo que demanda respuestas compensatorias antioxidantes (Di Giulio *et al.*, 1995). Este ajuste funcional es particularmente importante en el control de la toxicidad de productos contaminantes pro-oxidantes.

Se han descrito alteraciones de las respuestas inmunológicas y de las actividades de las enzimas antioxidantes en diversas especies de bivalvos expuestos a una variedad de xenobióticos (Regoli y Principato, 1995; Labrot *et al.*, 1996; Regoli *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1999; Cannesi *et al.*, 1999; Pipe *et al.*, 1999; Regoli, 2000). Sin embargo, estos aspectos no han sido suficientemente documentados en especies caribeñas, especialmente impactadas por mezclas complejas de productos refinados del petróleo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar efectos tóxicos agudos de una fracción soluble acuosa de Fuel Oil N°6 sobre las defensas inmunológicas y antioxidantes del bivalvo *P. im-*

*bricata*. Los bivalvos han sido reconocidos como buenos indicadores de contaminación, ya que sus cambios fisiológicos y bioquímicos pueden reflejar impactos biológicos de sustancias en el medio ambiente marino. La ostra perla *P. imbricata* se utilizó como organismo modelo por ser ampliamente distribuido en el Atlántico occidental, desde Carolina del Norte hasta Brasil (Lodeiros *et al.*, 1999), su fácil recolección en el campo y mantenimiento en el laboratorio. Por su abundancia en las zonas costeras de Venezuela, dicha especie representa un recurso biológico útil para estudios de evaluación de contaminación de la región y el Caribe, dada la importante actividad industrial petrolera regional que implica riesgos potenciales de impactos adversos en los ecosistemas marinos.

Se determinaron las actividades de enzimas antioxidantes en la glándula digestiva y el manto. Alteraciones de estos sistemas enzimáticos permiten predecir cambios en la condición fisiológica del organismo debido a la

integración funcional de estos tejidos en su metabolismo energético. Las respuestas inmunológicas evaluadas fueron la actividad fagocítica de los hemócitos y la lisozima de la glándula digestiva, las cuales representan defensas de primera línea frente a agentes infecciosos en invertebrados (Cooper, 1976; Goven *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1999; Pipe *et al.*, 1999). Las respuestas del sistema de defensa inmunológico innato (fagocitosis y lisozima) permiten alertar tempranamente sobre riesgos de inmunotoxicidad de xenobióticos en distintas especies, por ser parámetros fisiológicos filogenéticamente conservados (Goven *et al.*, 1994; Nusetti *et al.*, 1998, 2001).

## Materiales y Métodos

Ejemplares de talla promedio entre 50 y 60mm fueron capturados en la zona costera del Golfo de Cariaco (Cumaná, Venezuela) y mantenidos durante una semana en acuarios con agua de mar natural (salinidad  $36 \pm 1\text{‰}$ ; pH  $7,6 \pm 0,2$ ; a  $25$

ACTIVIDADES\* DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE *P. imbricata*

Enzimas	Controles	25%	100%
GST	31,43±4,43a	93,54±26,69b	65,07±34,62b
GPx	37,84±4,66	37,69 ±6,15	35,52 ±3,80
GR	0,37±0,13	0,58 ±0,19	0,44 ±0,14
CAT	0,53±0,16a	0,81 ±0,17b	0,74 ±0,12b

\* U/g masa húmeda. Controles y expuestos a 25 y 100% FSA de Fuel Oil N°6. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). Tratamientos sin letras son significativamente iguales (ANOVA p>0,05). Letras iguales indican tratamientos significativamente iguales (Duncan p>0,05).

±1°C), con aireación constante y alimentados con las microalgas *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros gracilis* a una razón de 16000 y 200000cel/ml de concentración en el acuario, respectivamente, una vez diaria, siendo el agua de los acuarios visualmente transparente después de las 6h del suministro alimenticio, indicativo de eliminación del alimento. Los acuarios, de 6l, (3 réplicas por tratamiento) se cubrieron con una tapa de vidrio para minimizar la evaporación del agua de mar. Para los ensayos de toxicidad se colocaron 12 individuos por acuario, conteniendo concentraciones nominales de 25 y 100% de una fracción acuosa de Fuel Oil N°6 (FSA), simulando un escenario de vertido de corta permanencia en un hábitat costero, en función de examinar la sensibilidad del organismo a contaminantes potenciales. Un grupo control se mantuvo en agua de mar sin el contaminante. Durante el período experimental los organismos fueron alimentados con la mezcla de microalgas indicada arriba. La fracción concentrada de FSA fue preparada mezclando 1g de Fuel Oil N°6 con 1l de agua de mar filtrada (0,45µm). Esta mezcla se agitó durante 5min y luego de un período de reposo de 20min se separó la capa acuosa, a partir de la cual se preparó la concentración de 25%. Durante el bioensayo de toxicidad se hicieron recambios del agua y contaminante cada tres días, para minimizar efectos tóxicos de los productos de desecho metabólico. Finalizado los tratamientos con FSA, se muestrearon 6 organismos para los ensayos inmunológicos y los análisis de las enzimas antioxidantes, respectivamente.

La hemolinfa fue extraída por punción directa al seno venoso con una jeringa hipodérmica de 3ml con aguja calibre 20 para evaluar el número total de hemocitos, viabilidad celular y fagocitosis. Los hemocitos fueron obtenidos por centrifugación y el precipitado celular se resuspendió en 1ml de agua de mar estéril-EDTA 0,01mM, pH 7,8. La actividad fagocítica fue determinada de acuerdo al protocolo descrito por Nusetti *et al.* (1998), utilizando levadura inactivada por calor (50mg/ml en agua de mar estéril) como antígeno.

La actividad de la lisozima fue evaluada en extractos de la glándula digestiva. Se preparó un homogeneizado del tejido al 20% (p/v) en buffer  $KH_2PO_4$  100mM, pH 6,2; seguido de centrifugación a 1000g por 10min, 25°C. Alícuotas de 40ml del sobrenadante se sembraron en lisoplasmas de agarosa 1%, conteniendo *Micrococcus lysodeikticus* 0,06% como sustrato (McHenery *et al.*, 1979; Marcano *et al.*, 1997). Después de 24h de incubación de las lisoplasmas a temperatura ambiente, se midieron los diámetros de los halos de lisis. La actividad de la lisozima se determinó utilizando una curva de calibración con un rango de concentraciones de 0,25 a 32µg/ml, preparada con lisozima estándar de clara de huevo de gallina (5mg/ml en buffer fosfato 100mM, pH 6,2; HEL, Sigma Chemical), aplicando un modelo de regresión lineal. La actividad enzimática se expresó como unidad equivalente de la lisozima estándar en µgHEL/ml, según la ecuación  $\mu gHEL/ml = \text{antilog}_{10} [a+b (\text{diámetro en mm})]$ , y posteriormente transformados a µgHEL/g te-

ACTIVIDADES\* DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
DEL MANTO DE *P. imbricata*

Enzimas	Controles	25%	100%
GST	0,39 ±0,19a	0,15 ±0,05b	0,14 ±0,04b
GPx	55,82 ±2,32a	86,08±19,05b	75,5 ±13,93b
GR	0,53 ±0,07a	0,34 ±0,10b	0,40 ±0,04b
CAT	0,058±0,01	0,042±0,013	0,052±0,02

\* U/g masa húmeda. Controles y expuestos a 25 y 100% FSA de Fuel Oil N°6. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). Tratamientos sin letras son significativamente iguales (ANOVA p>0,05). Letras iguales indican tratamientos significativamente iguales (Duncan p>0,05).

jido húmedo, siguiendo las indicaciones en Marcano *et al.* (1997).

Para los ensayos de las enzimas antioxidantes glutatona transferasa (GST, EC 2.5.1.18), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), glutatona peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y glutatona reductasa (GR, EC 1.11.1.9) se emplearon extractos de la glándula digestiva y el manto. Inmediatamente después de los tratamientos experimentales, se extrajo el manto y la glándula digestiva, seguido de congelación en  $N_2$  líquido y almacenamiento a -70°C durante 10–20 días, antes de realizarse los ensayos enzimáticos. Los tejidos fueron homogeneizados (10% p/v) a 4°C con un homogeneizador Potter Elvehjem, en una solución conteniendo sucrosa 0,5mM, EDTA- $Na_2$  1mM, ditiotritol 1mM, KCl 0,15mM, ácido fenil metil sulfónico (PMSF) 0,2mM, tamponado a pH 7,4 con Tris-HCl 20mM. Los homogeneizados fueron centrifugados a 5000 y 12000g a 4°C por 20min en una centrífuga Sorval RC2-B. Se tomaron los sobrenadantes como fuente de enzimas y las actividades fueron medidas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 2S basado en su programa cinético-Lambda 2. Las actividades máximas de CAT, GR y GPx fueron determinadas de acuerdo a los procedimientos descritos por Nusetti *et al.* (2001). Así, CAT fue monitoreada siguiendo el desdoblamiento de  $H_2O_2$  75mM a 340nm (coeficiente de extinción:  $40M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) en buffer fosfato de potasio 50mM, pH 7,0. GR fue medida a 340nm siguiendo la oxidación de NADPH (coeficiente de extinción:  $6,2mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) por glutatio-

na oxidada (GS-SG) 1,2mM en buffer fosfato de potasio 100mM, pH 7,5. GPx fue determinada siguiendo la oxidación de NADPH 0,19mM por GS-SG acoplada a la reacción auxiliar de GR 2U/ml (Sigma Chemical, Levadura Beaker Tipo III), usando  $H_2O_2$  2mM como sustrato, GSH 7,0mM y  $Na_2S_2O_3$  1mM como inhibidor de CAT en buffer fosfato 100mM, pH 7,4. La actividad de GST fue determinada con 1-cloro-2,4-dinitro benceno (CDNB) 1mM y GSH 1mM, siguiendo la formación del complejo dinitrofenil-glutona (coeficiente de extinción:  $9,6mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) a 340nm en buffer fosfato de potasio 100mM, pH 6,5. Las actividades fueron expresadas en unidades por gramo de masa húmeda (U/g masa húmeda). En ensayos preliminares se encontró que el periodo de congelación de los tejidos no afectó las actividades de las enzimas.

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA de una vía y la prueba de Duncan para determinar diferencias significativas ( $p=0,05$ ) entre tratamientos (control, exposición 25 y 100% del contaminante) cuando existieron diferencias significativas en el ANOVA ( $p<0,05$ ) en un tejido. Algunas variables (GST en el manto, glándula digestiva, CAT en el manto y número total de hemocitos) fueron transformadas en  $\log_{10}$  para normalizar sus distribuciones, siguiendo las recomendaciones en Zar (1984).

## Resultados y Discusión

Al final del experimento no se encontraron organismos muertos, reafirmando el carácter subletal de las concentraciones

de FSA utilizadas. Las mediciones de las actividades enzimáticas antioxidantes evidenciaron distintas respuestas de estrés oxidativo entre la glándula digestiva y el manto de los organismos sujetos a la exposición de la mezcla contaminante (Tablas I, II). Ambos tejidos exhibieron niveles constitutivos de glutatióna-S-transferasa (GST), sugiriendo una mayor importancia en la glándula digestiva, donde aumentó su actividad por efectos de la contaminación experimental ( $p < 0,01$ ). El aumento de GST en la glándula digestiva por la exposición a FSA es indicativo de la actividad de este órgano en los procesos de bioacumulación y depuración de los compuestos contaminantes. La GST cataliza la conjugación de una variedad de productos electrofílicos, incluyendo especies reactivas derivadas del metabolismo de xenobióticos orgánicos con glutatióna reducida y los transforma en sustancias hidrosolubles de fácil excreción (Di Giulio *et al.*, 1995). Además, existen evidencias que sugieren la participación de la enzima en el transporte intracelular de compuestos lipofílicos endógenos y exógenos (xenobióticos) hacia la membrana microsomal para su biotransformación primaria por el sistema de monooxigenasa de citocromo P<sub>450</sub> (Di Giulio *et al.*, 1995).

Las actividades de la catalasa (CAT) aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en la glándula digestiva de los organismos contaminados con FSA, sugiriendo una respuesta de defensa contra el desarrollo de un estado de estrés oxidativo, presumiblemente asociado con una excesiva producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxirradicales ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ , alcoxirradicales, peroxirradicales, etc.), derivados de la biotransformación de xenobióticos (Di Giulio *et al.*, 1989, Livingstone, 2001). La glándula digestiva en bivalvos concentra niveles elevados de sustancias orgánicas e inorgánicas, cuya biotransformación resulta en un incremento en la generación de radicales libres, acentuando el riesgo de peroxidación lipídica y cambios estructurales en las proteínas y ácidos nucleicos si

no emerge una respuesta adecuada antioxidante (Viarengo *et al.*, 1990; Winston y Di Giulio, 1991; Porte *et al.*, 1991; Di Giulio *et al.*, 1995). Por lo tanto, es factible que el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes en la glándula digestiva de los organismos contaminados con FSA esté asociado con la activación de procesos celulares de control de la toxicidad de radicales libres. La CAT descompone el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ , limitando así la producción celular de  $\cdot OH$  por reacciones cíclicas redox; la glutatióna reductasa genera glutatióna reducida para su utilización en diversas reacciones antioxidantes, tales como la conjugación con radicales libres, agente reductor de peróxidos orgánicos y  $H_2O_2$  a través de la actividad de GPx, y cofactor de GST (Fridovich, 1998, Livingstone, 2001).

La exposición a 100% de FSA aumentó las actividades de CAT y GST en la glándula digestiva ( $p < 0,05$ ), alcanzando niveles no mayores a las observadas a 25% de FSA, aunque significativamente iguales ( $p > 0,05$ ). Las actividades de GR y GPx permanecieron similares a las del grupo control ( $p > 0,05$ ). Presumiblemente, las respuestas similares de CAT y GST a la exposición de 25 y 100% de FSA, es una manifestación de efectos tóxicos a la mayor concentración del contaminante sobre los procesos metabólicos que determinan la capacidad de expresión de las proteínas (catalítica o biosíntesis). Alternativamente, las enzimas pudieron responder adaptativamente ante la situación de estrés oxidativo, alcanzando un nivel umbral, y se activaron otras reacciones antioxidantes, o rutas de depuración capaces de

controlar la toxicidad de la alta dosis de FSA. El desarrollo de resistencia a elevadas concentraciones de mezclas complejas de xenobióticos ha sido demostrado en vertebrados e invertebrados marinos, incluyendo bivalvos (Bard, 2000). Cajarville *et al.* (1998) describió variaciones de CAT similares a las observadas en el presente estudio, en la glándula digestiva del mejillón *Mytilus galloprovincialis* expuesto durante un breve período (horas) a distintas concentraciones de una fracción acuosa de petróleo.

En el manto, los niveles basales de GST y CAT son aproximadamente 100 veces menores que en la glándula digestiva (Tabla II); la primera fue inhibida por la exposición a la FSA ( $p < 0,05$ ) mientras que CAT no fue afectada. Aparentemente, GST es sensible a la acción tóxica de FSA y no desempeña una función importante en el metabolismo de xenobióticos orgánicos. Posiblemente GST participa en el control de los niveles fisiológicos de moléculas orgánicas endógenas potencialmente tóxicas (Di Giulio *et al.*, 1995). En consecuencia, su inhibición representaría un riesgo de efectos perjudiciales sobre las funciones del tejido. Por otra parte, los niveles constitutivos de GPx fueron elevados en comparación con los de la glándula digestiva, lo cual podría desempeñar una función importante en el control de la producción de peróxidos en el tejido, evidenciado además por el incremento significativo de su actividad en respuesta a los tratamientos con 25 y 100% de FSA ( $p < 0,01$ ). La magnitud de este cambio fue similar en las dos condiciones experimentales, sugiriendo una posible estabilización o inhibición de la respuesta de la enzima a 100% de

FSA. No obstante, la función antioxidante de GPx podría ser limitada por la disminución significativa de la actividad de la enzima GR ( $p < 0,05$ ), lo cual podría tener implicaciones tóxicas para el tejido.

La modulación del sistema inmunológico por agentes contaminantes ha sido descrito en una variedad de invertebrados acuáticos, incluyendo moluscos bivalvos (Pipe *et al.*, 1999, Livingstone *et al.* 2000). Por lo general la exposición crónica a sustancias orgánicas (hidrocarburos aromáticos, pesticidas, bifenilos policlorados, entre otros) ejercen efectos negativos sobre la actividad fagocítica de los hemocitos (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. La respuesta bacteriolítica de lisozimas como biomarcadores en inmunoensayos de biotoxicidad de xenobióticos no ha sido ampliamente examinada en moluscos. No obstante, Pipe *et al.* (1999) evidenció efectos tóxicos agudos del Cu sobre la actividad de la enzima en mejillones. 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 supresión de la actividad fagocítica de los hemocitos aumenta el riesgo de infección; la estimulación de la fagocitosis es energéticamente costosa en detrimento de las funciones fisiológicas básicas.

En contraste a los resultados de los análisis enzimáticos, los ensayos citológicos e inmunoló-

TABLA III  
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN LA HEMOLINFA DE *P. imbricata*

Parámetros	Controles	25%	100%
Viabilidad (%)	91,4 $\pm$ 6,5a	94,5 $\pm$ 2,7a	85,0 $\pm$ 4,3b
Recuento (cel/mL)	9,2x10 <sup>5</sup> $\pm$ 3,7x10 <sup>5</sup>	6,94x10 <sup>5</sup> $\pm$ 1,6x10 <sup>5</sup>	8,6x10 <sup>5</sup> $\pm$ 4,3 x10 <sup>5</sup>
Fagocitosis (%)	17,7 $\pm$ 4,9	15,3 $\pm$ 2,8	16,8 $\pm$ 2,9
Lisozima (mg/g.t.h)	66,0 $\pm$ 12,7	50,0 $\pm$ 15,6	46,4 $\pm$ 16,4

Controles y expuestos a 25 y 100% FSA de Fuel Oil N°6. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm SD$  (n=6). Tratamientos sin letras son significativamente iguales (ANOVA  $p > 0,05$ ). Letras iguales indican tratamientos significativamente iguales (Duncan  $p > 0,05$ ).

gicos no revelaron alteraciones estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) en las primeras líneas de defensa contra agentes microbianos en los bivalvos expuestos a la FSA de Fuel Oil N°6 (Tabla III). Básicamente la capacidad fagocítica de los hemocitos y la actividad lítica microbiana de la lisozima en la glándula digestiva no fueron adversamente comprometidos durante el proceso de contaminación subletal. Probablemente, la condición de estrés manifestado en el organismo durante la exposición aguda a FSA no tuvo mayores implicaciones en la capacidad de respuestas inmunológicas asociadas con el potencial fagocítico de los hemocitos y la actividad bacteriolítica de la lisozima, a pesar que el organismo desarrolló un estado de estrés oxidativo que en ciertos casos se corresponde con efectos inmunotóxicos (Anderson *et al.*, 1999). Solamente la viabilidad disminuyó significativamente en la exposición del 100% FSA de Fuel Oil N°6, alcanzando un 85%, lo cual muestra cierto grado de estrés, aunque sin mayores repercusiones sobre la sobrevivencia del organismo en el transcurso del experimento.

Existen evidencias de un incremento de la enzima catalasa en bivalvos marinos expuestos a una variedad de xenobióticos orgánicos, siendo la respuesta enzimática rápida, en horas o en pocos días, lo que implicaría un ensayo agudo (Cajaraville *et al.* 1998). En adición, esta tendencia de la enzima fue mantenida por tres meses en *Mytilus edulis*, expuestos a altas concentraciones de petróleo crudo (Livingstone *et al.*, 1990). En concordancia con estos resultados es posible sugerir que los cambios de las actividades enzimáticas, en los tejidos de *P. imbricata* expuestos a la fracción acuosa de hidrocarburos reflejan alteraciones biológicas asociadas con el metabolismo de los componentes de la mezcla contaminante asociada con una generación de radicales libres, que podrían tener efectos negativos en corto término sobre el organismo.

Por otra parte es posible concluir que las respuestas inmunológicas innatas, actividad fago-

cítica de los hemocitos y la actividad lítica de la lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata*, no fueron sensibles a la exposición aguda de la mezcla de FSA, lo cual limita su uso como biomarcadores en el diagnóstico de efectos inmunosupresores por la exposición aguda de mezclas complejas de hidrocarburos. En virtud de que *P. imbricata* es abundante y ampliamente distribuida en las costas caribeñas podría ser considerada como una especie bioindicadora apropiada para investigaciones de contaminación ambiental a corto y largo plazo, principalmente en regiones con abundante actividad industrial petrolera. En este sentido, el estudio sugiere continuidad de la investigación de *P. imbricata* como organismo bioindicador, donde las investigaciones deben ser centradas en observar los efectos de un contaminante de forma continua y observar respuestas en el medio natural.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió soporte financiero de PDVSA Intevep, Venezuela. Se agradece el apoyo logístico del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente.

#### REFERENCIAS

- Anderson SR, Patel KM, Roesijadi G (1999) Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: Implications for hemocyte defense responses. *Devel. Comp. Immunol.* 23: 443-449.
- Bard SM (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48: 357-389.
- Cajaraville MP, Uranga JA, Angulo E (1998) Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels-3. Quantitative histochemistry of enzymes related to the detoxication metabolism. *Biochem. Physiol.* 103C: 369-377.
- Canessi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G (1999) Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissue. *Aquat. Toxicol.* 46: 67-79.
- Cooper EL (1976) Phagocytosis. En Cooper EL (Ed.) *Comparative Immunology*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ, EEUU. pp. 40-60.
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wennig RJ, Winston GW, Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 1103-1123.
- Di Giulio RT, Benson WH, Sander BM, Vanveld PA (1995) Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En Rand GM (Ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis. Washington DC, EEUU. pp. 523-561.
- Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Long ER (2000) Survey of oyster *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: Association of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51: 115-138.
- Fournier M, Cyr DG, Brousseau P, Tryphonas H (2000) Biomarkers in Immunotoxicity: evolutionary perspective. En Gillette L, Crain D (Eds.) *Environmental endocrine disruptors*. Taylor & Francis. New York, EEUU. pp.182-216.
- Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-1209.
- Goven AJ, Fitzpatrick L, Venables B (1994) Chemical toxicity and host defense in earthworms. *Ann NY Acad. Sci.* 712: 280-299.
- Irwin RJ, Van Mowerik M, Stevens L, Seese MD, Basham W. (1997) *Environmental contaminants encyclopedia*. Water Resources National Park Service. Fort Collins, CO, EEUU. pp. 5-52.
- Klein CB, Frenkel K, Costa M (1991) The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 592-604.
- Labrot F, Ribera D, Dennis MS, Narbone FJ (1996) In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1: 21-28.
- Livingstone DR, García P, Michel x, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D, Winston GW (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in common mussel, *Mytilus edulis* L. and other mollusks. *Funct. Ecol.* 4: 415-424.
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, Minier C, Michelson MN, Peters LD, Pipe RK (2000) Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*) and other mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.* 13:56-91.
- Lodeiros C, Marin B, Prieto A (1999) *Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela. Clase Bivalvia*. APU-DONS. Cumaná, Venezuela. 110 pp.
- Marcano L, Nusetti O, Rodríguez-Grau J, Briceño J, Vilas J (1997) Colomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 22-28.
- McHenry JB, Birbeck TH, Allen J (1979) The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 25-28.
- Miller AC (1996) *Hazardous air pollutants from the combustion of an emulsified heavy Fuel-Oil in a firetube boiler*. Environmental Protection Agency. EPA/600/SR-96/019. Cincinnati, OH, EEUU. 3 pp.
- Nusetti O, Salazar-Lugo R, Rodríguez-Grau J, Vilas J (1998) Immune and biochemical responses on the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C: 177-183.
- Nusetti O, Escapés M, Salazar G, Nusetti S, 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.
- Pipe RK, Coles F, Carissan FM, Ramanathan K (1999) Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46: 43-54.
- Porte CM, Solé M, Albaiges J, Livingstone DR (1991) Response of mixed function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus edulis* to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 183-186.
- Rand GM (1995) *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, Environmental fate and risk assessment*. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis Publisher. Washington DC. EEUU. pp. 523-561.
- Regoli F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50: 351-361.
- Regoli F, Principato G (1995) Glutathione dependent antioxidants enzyme in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metal under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarker. *Aquat. Toxicol.* 31: 143-164.
- Regoli F, Nigro M, Orlando E (1998) Lysosomal antioxidant responses to metals in the anthracite scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40: 375-392.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in tissue of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C: 37-42.
- Winston GW, Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161.
- Zar J (1984) *Biostatistical analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall. New Jersey, EEUU. 120 pp.