



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

PARÁMETROS CITOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS Y ESTABILIDAD LISOSOMAL EN
HEMOCITOS DEL BIVALVO *Pinctada imbricata* EXPUESTO A FRACCIONES SOLUBLES DE
LUBRICANTES USADOS DE VEHÍCULOS.
(Modalidad: Investigación)


MARIANNY JOSÉ ANTÓN MOTA

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

CUMANÁ, 2011

PARÁMETROS CITOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS Y ESTABILIDAD
LISOSOMAL EN HEMOCITOS DEL BIVALVO *Pinctada imbricata* EXPUESTO A
FRACCIONES SOLUBLES DE LUBRICANTES USADOS DE VEHÍCULOS

APROBADO POR:




Prof. Edgar Zapata
Asesor



Prof. Osmar Nusetti
Co - Asesor



Prof. Marín Lemus
Jurado Principal



Prof. Leyda Marcano
Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
ORGANISMOS Y MANTENIMIENTO.....	6
PREPARACIÓN DE LA FRACCIÓN DE CONTAMINANTE.....	6
BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN.....	6
EXTRACCIÓN DE HEMOLINFA.....	7
PARÁMETROS CITOLÓGICOS.....	8
Número total de hemocitos y viabilidad celular.....	8
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS.....	8
Fagocitosis.....	8
LISOZIMA.....	9
ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA LISOSOMAL.....	10
PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	11
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	12
RESULTADOS.....	13
PARÁMETROS CITOLÓGICOS.....	13
Contaje celular y viabilidad celular.....	13
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS.....	15
Fagocitosis y actividad de la lisozima.....	15
ESTABILIDAD LISOSOMAL.....	16
PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
HOJA DE METADATOS.....	33

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por permitirme transitar por el camino de la vida que conduce a los conocimientos y la sabiduría, darme paciencia y fortaleza para afrontar los obstáculos presentados en él.

A mis padres Martha y Luís Ramón porque el cumplimiento de mis metas son la realización de sus sueños.

A mis hijos Ángel Xavier y Verónica Patricia por ser mi inspiración, gran motor e impulso para seguir adelante en el camino de la vida. LOS AMO.

A mis hermanos Alberto y Mirlen ya que siempre me ayudaron con sus alegrías, apoyo para que alcanzara mi gran meta. Sigán mi ejemplo.

A mi abuela Teodora Mota por sus valiosos y sabios consejos en los momentos difíciles durante el camino, cuando mis fuerzas decaían.

A mis tías María del Pilar y María Lourdes Mota siempre fueron ejemplo de superación y optimismo, nunca me faltó un consejo de su parte.

A cada uno de los miembros de mi familia que siempre estuvieron pendientes de la realización y alcance de mi meta.

A mi gran amiga Yolimar Natera porque siempre estuvo para apoyarme en todo momento.

Muy especialmente a la memoria de mi Hermano Douglas José porque se que desde el cielo se seguirá sintiendo muy orgulloso de mi al verme alcanzar mi más anhelado sueño. TE AMARÉ POR SIEMPRE HERMANO.

A mí por la dedicación, esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Edgar Zapata por su valiosa ayuda, guía y asesoría durante todo el desarrollo de la investigación.

Al Prof. Osmar Nusetti por albergarme en el laboratorio de Bioquímica y apoyo en insumos y materiales especializados.

A la Lcda. Gabriela Sánchez por brindarme su ayuda en el momento más propicio de la investigación.

A todos aquellos profesores del Departamento de Biología que de una u otra forma contribuyeron en mi formación durante la carrera.

A todas aquellas personas de la Universidad de Oriente que me prestaron su valiosa colaboración a lo largo de toda mi carrera.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Curva de calibración para estimar la actividad de la lisozima mediante halos de inhibición.	10
Tabla 2. Tabla de calibración para estimar las concentraciones de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contaje total de células en la hemolinfa del bivalvo <i>P. imbricata</i> expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	13
Figura 2. Viabilidad celular en la hemolinfa del bivalvo <i>P. imbricata</i> (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	14
Figura 3. Número de fagocitos en la hemolinfa del bivalvo <i>P. imbricata</i> (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	15
Figura 4. Actividad de la lisozima ($\mu\text{g/ml}$) en la glándula digestiva del bivalvo <i>P. imbricata</i> (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	16
Figura 5. Porcentaje de células con lisosomas desestabilizados en la hemolinfa del bivalvo <i>P. imbricata</i> (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	17
Figura 6. Niveles de malondialdehído (nmoles de MDA/gmh) en la glándula digestiva del bivalvo <i>P. imbricata</i> (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.	18

RESUMEN

Los desechos de lubricantes usados por motores constituyen un problema potencial de contaminación en ecosistemas marinos costeros, debido a que sus componentes tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados y compuestos policlorados pueden solubilizarse, quedando disponibles a la biota circundante. La absorción y biotransformación de estos xenobióticos en invertebrados marinos puede conllevar a alteraciones de las respuestas inmunológicas e inducir condiciones de estrés oxidativo por una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y otros radicales libres. En tal sentido, en este estudio se evaluaron los efectos ocasionados, a corto plazo, por una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) sobre el sistema inmune-inespecífico, estabilidad lisosomal en hemocitos y su relación con daños oxidativos sobre lípidos en glándula digestiva de la ostra perla *Pinctada imbricata*; un organismo representativo de los ecosistemas arrecifales caribeños. Los ejemplares fueron expuestos, bajo condiciones controladas, a tres concentraciones subletales de FALUMV (0, 10 y 20 % v/v) durante 3, 5 y 7 días. Algunos parámetros celulares (conteo y número total de hemocitos), junto a las defensas inespecíficas celulares (fagocitosis) y humoral (lisozima) fueron usados como marcadores para evaluar efectos inmunotóxicos. Adicionalmente, el tiempo de retención del colorante rojo neutro en hemocitos y producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la glándula digestiva fueron utilizados como indicadores de la desestabilización de las membranas lisosomales (DML) y daño oxidativo, respectivamente. Descensos significativos fueron encontrados en la mayoría de los parámetros inmunológicos-celulares en organismos expuestos a las distintas concentraciones de FALUMV a partir del quinto día de exposición, asociados a una elevada DML. La más alta concentración de FALUMV (20%) coincidió con un estado de inmunosupresión. Los niveles de TBARS mostraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones experimentales. Esta investigación evidenció un efecto inmunosupresor, principalmente del componente celular (viabilidad, número total de células y fagocitos), inducidos posiblemente por los compuestos hidrosolubles contentivos en FALUMV. El declive en algunas respuestas celulares indica concentraciones tóxicas mínimas que restringen la capacidad de defensa contra microorganismos patógenos invasores. La determinación de los parámetros celulares, inmunológicos y la desestabilización lisosomal suministran una efectiva información de alteraciones relacionadas con mezclas de xenobióticos de origen antropogénico.

INTRODUCCIÓN

El aceite usado de automóviles es un líquido aceitoso, pardo a negro, que se remueve del motor aproximadamente cada 5 000 km (Pruell y Quinn, 1988; ATSDR, 1997). Los lubricantes usados de motores de automóviles se encuentran ubicados dentro de los contaminantes que mayor impacto ejercen sobre los ecosistemas marinos, ya que estos están constituidos de una mezcla de componentes potencialmente tóxicos entre los cuales se pueden nombrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos clorados y metales pesados (GESAMP, 1997; Nusetti *et al.*, 2005). Estos lubricantes una vez usados, son vertidos de manera directa al mar a través de los desagües de estaciones de servicios, autolavados y talleres mecánicos.

En la ciudad de Cumaná existen más de 20 establecimientos encargados de los cambios de aceites de motores, los mismos prestan servicios a un promedio de 10 automóviles diarios, estimándose entre aproximadamente 50-100 litros de aceite por día que son drenados hacia los desagües. El manejo inadecuado y disposición final de estos lubricantes constituyen un problema potencial de contaminación en ecosistemas costeros, ya que la mayoría de los xenobióticos contentivos en estos lubricantes son persistentes en el ambiente, quedando disponibles a la biota marina en la columna de agua, sedimento y alimentos.

Existen en la actualidad protocolos estandarizados de rápida respuesta y alta sensibilidad, que permiten estimar la toxicidad de contaminantes en organismos representativos de medios potencialmente impactados. Para la evaluación de ambientes impactados por xenobióticos se ha desarrollado una variedad de técnicas de experimentación biológica, que incluyen bioensayos estáticos de toxicidad letal y subletal, los cuales pueden indicar las posibles concentraciones mínimas de un xenobiótico o mezcla de éstos, que alteran la fisiología de los organismos experimentales (Marigómez *et al.*, 2004). Estos ensayos simulan los posibles efectos que producen eventuales derrames de contaminantes al ambiente.

Hoy por hoy, se diagnostica la salud de los ecosistemas usando marcadores a diferentes niveles de organización biológica en organismos asociados al medio. Estos indicadores, denominados biomarcadores, son respuestas biológicas que permiten revelar cambios significativos en la calidad ambiental y la fisiología de los organismos (Hamza-Chaffai *et al.*, 2003; Nicholson, 2003; Regoli *et al.*, 2004). Tales respuestas proveen información útil sobre los efectos de xenobióticos, sirviendo como señales de alerta temprana a posibles procesos de contaminación (Cajaraville *et al.*, 1998). En particular, las respuestas inmunológicas innatas, tanto celulares como humorales, y las defensas antioxidantes han sido los biomarcadores mayormente utilizados en estudios de monitoreo ambiental.

Una variedad de biomarcadores han sido usados en invertebrados marinos, especialmente organismos bentónicos, preferiblemente aquellos que se alimentan mediante la filtración de partículas suspendidas en la columna del agua, como es el caso de los bivalvos. Debido a la importancia que tienen los bivalvos en los ecosistemas marinos y su capacidad de respuestas de defensa para evitar daños por xenobióticos, éstos han sido sugeridos como eficientes modelos biológicos para estudios de impacto ambiental inducido por contaminantes (Dyrynda *et al.*, 2000).

El sistema inmune de los bivalvos ofrece aspectos de interés para su aplicación en estudios de toxicología ambiental (Nicholson, 2003). Este lo conforman un conjunto de elementos funcionales no específicos, humorales (aglutininas, enzimas lisosomales, moléculas opsonizantes, péptidos antimicrobianos) y celular-mediados (fagocitos) que presentan cierta analogía u homología a los mecanismos de inmunidad de otros organismos, tanto acuáticos y terrestres, de diferentes grupos taxonómicos. Los fagocitos (hemocitos) representan defensa interna contra parásitos, patógenos y material extraño, jugando un papel relevante en la prevención de enfermedades. Su función está regulada por factores internos, tales como hormonas presentes en el suero, y es altamente sensible a factores ambientales como la temperatura, salinidad y en particular la polución

ambiental (Sauvé *et al.*, 2002).

La fagocitosis y la actividad de las lisozimas forman parte de las respuestas inmunológicas inespecíficas que permiten neutralizar agentes invasores, englobarlos y posteriormente degradarlos en los lisosomas, o producir la lisis de las paredes bacterianas a nivel de peptidoglicanos (Goven *et al.*, 1994; Goven y Kennedy, 1996). Algunas inmunopatologías pueden ser determinadas por un conteo total y diferencial de inmunocitos o hemocitos y su viabilidad celular (Sami *et al.*, 1992; Goven y Kennedy, 1996). En invertebrados marinos se ha demostrado que estos mecanismos pueden ser generalmente suprimidos por un amplio espectro de xenobióticos (Cheng, 1988; Sauvé *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002; Zapata *et al.*, 2005).

El impacto de contaminantes sobre la biota marina ocurre a distintos niveles de complejidad. Frecuentemente, los cambios son tempranamente detectados a nivel celular, particularmente en organelos tales como mitocondrias o lisosomas, existiendo diversas vías por las cuales la estructura o funciones de tales organelos celulares puedan ser alteradas por xenobióticos (Moore, 1985; Cheung *et al.*, 2004).

Diversos estudios se han abocado al uso del ensayo de retención de rojo neutro (RRN), con el cual se permite estimar la estabilidad de las membranas lisosomales. Lowe *et al.* (1992) describieron el uso de este ensayo *in vitro* para demostrar el daño inducido por contaminantes en diferentes tipos de células del cangrejo *Limanda limanda*. Este ensayo se fundamenta en que sólo los lisosomas de células sanas pueden tomar y retener este colorante, siendo éste acumulado en los lisosomas que se visualizan a través de microscopía óptica. Esta técnica ofrece una respuesta sensible al ser utilizada en hemocitos de bivalvos, como un modelo celular robusto rico en lisosomas (Week *et al.*, 1997).

En el ambiente, algunos organismos pueden acumular elevadas concentraciones de contaminantes en distintos tejidos sin presentar efectos tóxicos, por el contrario

existen otros compuestos que son caracterizados por una alta toxicidad y que a bajos niveles de exposición pueden causar daños severos. No obstante, el efecto de la biotransformación de estos compuestos puede incrementar la complejidad ecotoxicológica. Un importante papel en la toxicidad de diversos contaminantes lo representan la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO). La sobreproducción de estos radicales libres puede perturbar la eficiencia antioxidante, lo cual ofrece un preámbulo para alteraciones oxidativas (lipoperoxidación) de las membranas biológicas. Diversas investigaciones han demostrado el papel de estos radicales libres como intermediarios en la toxicidad de contaminantes orgánicos en bivalvos marinos: *Mytilus edulis* (Viarengo *et al.*, 1989; Livingstone, 2001), *M. galloprovincialis* (Torreilles y Guérin, 1999) y *Perna viridis* (Cheung *et al.*, 2002). Las consecuencias citotóxicas pueden ser evidenciadas como inactivación enzimática, lipoperoxidación de membranas celulares, deterioro del ADN y muerte celular (Di Giulio *et al.*, 1995; Fridovich, 1998).

La peroxidación lipídica (LPO) es un mecanismo de daño celular tanto en animales como vegetales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y biomarcador de contaminación ambiental. La descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), de las membranas biológicas generan, entre otros, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alqueno (4-HNE) (Marín *et al.*, 1993). La LPO puede perturbar las propiedades estructurales y funcionales de las membranas biológicas, alterando su fluidez y capacidad para mantener un adecuado balance (Sies, 1993). En este contexto, las alteraciones en las membranas biológicas puede comprometer la funcionabilidad de los componentes lisosomales, generando procesos degradativos que pueden traer como consecuencia la autólisis celular.

En Venezuela, la ostra *P. imbricata* se encuentra ampliamente distribuida en el Nororiente Venezolano, existiendo bancos naturales en las islas Cubagua y Margarita (Estado Nueva Esparta), Norte de la Península de Araya y en el Golfo de Cariaco (Estado Sucre) (Lodeiros *et al.*, 1999). Debido a la falta de información sobre los efectos

de contaminantes en la respuesta inmuno-celulares y bioquímicas en organismos de zonas tropicales, en esta investigación se utilizó este organismo como modelo. En diversas investigaciones se ha establecido que el uso aislado de un biomarcador no refleja los efectos de los contaminantes. En tal sentido, en esta investigación se usó una batería de marcadores biológicos, que pueden suministrar una visión integral del estatus fisiológico y molecular de los organismos, con el objetivo de evaluar los efectos que producen concentraciones no letales de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos sobre algunas respuestas inmunológicas, humorales y celulares, y el daño a membranas lisosomales de hemocitos en el bivalvo *P. imbricata*. Adicionalmente, estas respuestas fueron relacionadas con daños lipoperoxidativos en la glándula digestiva.

METODOLOGÍA

ORGANISMOS Y MANTENIMIENTO

Ejemplares de *P. imbricata* con talla promedio entre 50-60 mm fueron colectados en la zona arrecifal de la ensenada de Turpialito, en la cercanía de la estación hidrobiológica de la UDO en el Golfo de Cariaco (Cumaná, Venezuela). Los organismos se mantuvieron durante una semana en acuarios (40 l de capacidad) con agua de mar filtrada (salinidad 36‰; pH $7,6 \pm 0,2$; temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$), con aireación constante y alimentados diariamente con una mezcla de microalgas cultivadas *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros araya* (densidad celular: 5 000 cel/ml).

PREPARACIÓN DE LA FRACCIÓN DE CONTAMINANTE

La fuente de xenobióticos utilizada en los bioensayos estáticos estuvo constituida por una mezcla de lubricante usado de motores y de agua de mar filtrada en una relación 1:9 v/v. Para la realización de esta mezcla se tomó un volumen de 200 ml del aceite lubricante, se diluyó hasta un volumen 1 800 ml de agua de mar filtrada y se colocó en un frasco de vidrio de 3 000 ml de capacidad. La mezcla se mantuvo en agitación constante (con magnetos sobre planchas de agitación) durante un período de 24 horas, a temperatura ambiente. Posterior a la agitación, se dejó reposar durante una hora. La mezcla fue colectada por sifoneo y luego se filtró en papel Whatman # 1 a través de un sistema de vacío, para eliminar cualquier remanente de la fase densa. Se colectó la fracción acuosa y se utilizó como solución patrón (100% v/v).

BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN

Se realizaron experimentos preliminares para determinar concentraciones subletales de la mezcla del contaminante, las cuales garantizaron a los organismos condiciones fisiológicas aparentemente estables durante los períodos de exposición. Se utilizaron diez organismos que fueron expuestos a distintas concentraciones ascendentes (0, 25, 50, 75 y 100 %) de la fracción acuosa preparada previamente. La concentración

letal media (LC₅₀) obtenida por método de Logit para esta especie, al cabo de 96 horas, fue de 83%, con un rango de 95% de confiabilidad de 55-106%, según datos arrojados por el programa de computación desarrollado por Stephan *et al.*, 1978. Posterior a este cálculo, se seleccionaron tres concentraciones subletales (1, 10 y 20%) con su respectivo grupo control; este último fue colocado en agua de mar sin la fracción contaminante.

Los organismos fueron mantenidos en el laboratorio simulando un ambiente marino (salinidad 36 ‰; pH 7,6 ± 0,2; temperatura 25 ± 1°C), bajo condiciones controladas. Se colocaron 5 organismos por acuario (1 individuo por cada litro) y se procedió a exponerlos a las distintas concentraciones de la fracción soluble del lubricante durante 3, 5 y 7 días. Estos períodos fueron adecuados para mantener el 100% de sobrevivencia de los organismos. Los análisis se realizaron por triplicado. Se realizaron recambios diarios de agua de mar para mantener disponible la concentración del contaminante y remover las pseudoheces y/o productos de desecho provenientes del metabolismo de los organismos.

Transcurrido cada período de exposición al contaminante, 5 bivalvos por cada tratamiento fueron sometidos a un procedimiento de extracción de hemolinfa para determinar los parámetros citológicos e inmunológicos. Además, se disectó la glándula digestiva para cuantificar los niveles de lisozima, lípidos peroxidados y proteínas totales.

EXTRACCIÓN DE HEMOLINFA

Para la extracción de la hemolinfa se procedió a mantener las valvas del organismo abiertas con ayuda de una varilla de vidrio y se realizó una punción directa del seno venoso, ubicado cerca de la porción fásica del músculo abductor, utilizando una jeringa hipodérmica de 1 ml de capacidad contentiva de 0,1 ml de agua de mar filtrada a miliporo con EDTA al 0,01 mmol/l. Se extrajo cuidadosamente de 0,5 a 1 ml del fluido, el cual se colocó en tubos de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, mantenidos a una temperatura de aproximadamente 4°C. Luego la muestra se resuspendió en 1 ml de agua de mar y EDTA 0,01 mmol/l a pH 7,8 y se conservó a 4°C

para el posterior análisis de los parámetros citológicos.

PARÁMETROS CITOLÓGICOS

Número total de hemocitos y viabilidad celular

El número total de células por ml y la viabilidad celular se determinaron por tinción diferencial con el colorante azul tripano (Sigma-Aldrich) al 0,4% siguiendo la metodología indicada en el catálogo Sigma Chemical Co. Un volumen de 1 ml del colorante se colocó en agitación constante por 1 hora y luego se centrifugó a 1 250 g durante 10 minutos, para precipitar cualquier resto de colorante que quedara insoluble; posteriormente se filtró el colorante en papel Whatman # 1 para maximizar la eliminación de material no solubilizado.

Para contar el número de células viables y total de células por ml, se mezclaron 20 μ l de la suspensión final de hemocitos con un volumen igual de azul tripano, se resuspendió y se realizó un conteo de 100 células en una cámara de Neubauer por microscopía de luz, a una magnificación de 400X. Las células vivas se diferenciaron de las muertas porque éstas últimas tomaron una coloración azul, expresándose la viabilidad como el porcentaje (%) de células vivas contadas. El número total de hemocitos por ml se determinó en los cuatro cuadrantes externos de la cámara y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula propuesta por Goven *et al.* (1994): Número de hemocitos / ml = $(X/2) \times 10^4$

PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

Fagocitosis

Para evaluar la actividad fagocítica de los hemocitos se ajustó el número total de células a una concentración de 2×10^6 de hemocitos por cada mililitro. Se empleó como antígeno la levadura comercial inactivada por calor (stock 5 mg/ml), se filtró en papel Whatman #1, aplicando vacío con la finalidad de eliminar los aglomerados y disponer de levaduras separadas. Del filtrado de levaduras se tomaron 200 μ l y se diluyó en 3 ml de agua de mar filtrada, para preparar la solución de levaduras a una concentración de 0,3

mg/ml. En un tubo de centrifuga Eppendorf de 1,5 ml de capacidad se añadió 100 µl de la suspensión de hemocitos, con un volumen igual de levaduras, se resuspendió suavemente la muestra y se centrifugó brevemente a 1 000 g por 5 minutos.

Las muestras centrifugadas se incubaron por un período de 20 a 24 horas a 4°C. Culminado el período de incubación se descartaron 100 µl del sobrenadante. Al precipitado celular se le añadió 100 µl de azul tripano al 0,4% y se resuspendió con una pipeta Pasteur. Finalmente se tomó una alícuota de 10 µl y se colocó en una cámara de Neubauer para su observación y contaje en un microscopio de luz con magnificación de 400X. Para determinar el número de fagocitos se contaron 100 células viables por cada muestra y se estableció una relación porcentual de fagocitos en la muestra analizada. Se consideraron fagocitos, los hemocitos que contenían en el interior de su citoplasma al menos una levadura visible.

LISOZIMA

El protocolo empleado para evaluar la actividad de la lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata* está basado en la lisis de la pared celular de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus*, empleando lisoplasmas de agarosa. Para la preparación del agar se utilizó una adaptación de la metodología de Nusetti *et al.* (1998), empleando buffer fosfato de potasio (KH₂PO₄) al 0,1%, 67 mmol/l a pH 6,0; agarosa (tipo II) al 1%; cloruro de sodio (NaCl) al 0,1% y *Micrococcus lysodeikticus* a 0,4 mg/ml. Se añadieron los reactivos en el buffer fosfato pH 6,0 y bajo agitación constante se disolvieron por calentamiento hasta que la mezcla se hizo homogénea y comenzó a ebulir. Se dejó enfriar la mezcla hasta 45°C aproximadamente, se colocaron volúmenes de 8 ml en placas de Petri plásticas (5 cm de diámetro), se dejó solidificar y se guardaron a 4°C hasta su posterior uso. Cada placa se perforó simétricamente en cuatro puntos diferentes, con orificios de aproximadamente 5 mm de diámetro.

A un grupo de 5 bivalvos por cada tratamiento se le extrajo la glándula digestiva, se pesó y homogenizó para los ensayos de lisozima, en buffer fosfato de potasio 100

mmol/l pH 6,24 a 4°C, en una relación peso-volumen de 20% (1 g de tejido en 8 ml de buffer fosfato K₂PO₄ / KH₂PO₄). El homogenizado resultante se centrifugó a 1 250 g por 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue empleado como fuente inmediata de lisozimas. Un volumen de 40 µl del extracto de lisozima se empleó en cada orificio de la placa con su respectiva réplica. Las lisoplacas fueron incubadas a temperatura ambiente por 48 horas, período en el cual se hicieron claramente visibles los halos de inhibición correspondientes a la lisis de la pared bacterial por acción de la lisozima. Los diámetros de los halos fueron medidos con una regla (con divisiones en mm) y se compararon con los producidos por la lisozima estándar de clara de huevo (HEL) (Tabla 1). El cálculo de la actividad se hizo utilizando un análisis de regresión lineal propuesto por Goven y Kennedy (1996), según la siguiente ecuación:

$$\text{HEL } (\mu\text{g/ml}) = \text{Antilog}_{10} [a+b (\text{diámetro en mm}) \times 10].$$

Tabla 1. Curva de calibración para estimar la actividad de la lisozima mediante halos de inhibición.

Tubos	Concentración de HEL (mmol/l)	Halos de inhibición (mm)
1	1	0,70
2	5	0,80
3	10	0,85
4	20	0,90
5	30	0,95
6	40	0,99

ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA LISOSOMAL

La estabilidad de la membrana lisosomal se realizó empleando el método de Lowe *et al.* (1992). De cada organismo fue extraído 0,5 ml de hemolinfa desde el seno venoso con una jeringa de 1,0 ml que contenía 0,5 ml de agua de mar con EDTA. Las suspensiones de hemolinfa se guardaron en tubos de centrifuga Eppendorf en un refrigerador a 4°C. Una solución madre de rojo neutro (RN) fue preparada con 20 mg del

colorante (Sigma Chemical, St. Louis) en 1 ml de dimetil sulfóxido (Sigma) (Lowe y Pipe, 1994). La solución de trabajo fue preparada previa al ensayo, usando 10 µl de la solución madre de RN y 5 ml de agua de mar con EDTA; la misma fue almacenada en cámara oscura a 10°C.

Se añadieron 10 µl de hemolinfa y la misma cantidad de la solución de trabajo de RN, se mezcló e incubó en una cámara húmeda y oscura por 1 hora aproximadamente. Según pruebas preliminares fue determinado que dentro del rango de una hora se observó el máximo promedio de células con daños en la membrana lisosomal. Las muestras fueron observadas a 400X, identificando las células que presenten una coloración o pigmentación roja en el citosol como células dañadas, con ciertas dificultades de englobar el líquido en sus lisosomas. El daño fue expresado en porcentaje de células.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La glándula digestiva fue homogenizada usando un homogenizador Poltrón Modelo HP por 20 segundos a 4°C. La proporción del homogenizado fue de 50 mg/ml de buffer Tris 100 mmol/l pH 8 a 4°C. El homogenizado se colocó en una centrifuga refrigerada a 1 000 g por 15 minutos. Se tomó 250 µl del homogenizado y fue colocado en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, las muestras y las diluciones del estandar fueron incubadas en baño de agua a 37°C con agitación constante durante 15 minutos. Luego los tubos fueron colocados en un baño de hielo y para detener la reacción se adicionó a cada tubo 250 µl de stop mix frío (ácido tricloroacético 12,5% y ácido clorhídrico 1 mmol/l), y 500 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%, agitándose constantemente. Luego estos tubos fueron colocados en un baño de agua a 90°C con agitación constante por 10 minutos. Los tubos fueron retirados del baño de agua y colocados nuevamente en baño de hielo por 10 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 3 000 g durante 10 minutos a 4°C. Luego el sobrenadante fue transferido a la celda del espectrofotómetro para su medición a 532 nm, contra un blanco constituido por todos los reactivos excepto la fracción microsomal o solución problema

(homogenizado). Se utilizó un estándar comercial de MDA para preparar la curva de calibración (Tabla 2). Los valores fueron expresados en nmol de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteína (Nusetti *et al.*, 2001).

Tabla 2. Tabla de calibración para estimar las concentraciones de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Tubo n°	Solución Stock (μ l)	Solución Salina (μ l)	Concentración (nmoles/l)
1	0	250	0,0
2	10	240	0,25
3	20	230	0,5
4	50	200	1,25
5	25	225	2,5
6	20	200	5,0

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los parámetros citológicos e inmunológicos (contaje de hemocitos, viabilidad celular, actividad de lisozimas, fagocitosis) y los indicadores de daños oxidativos (estabilidad lisosomal, TBARS y proteínas), fueron analizados por un ANOVA de dos vías con una prueba *a posteriori* de Duncan (Sokal y Rohlf, 1979).

RESULTADOS

PARÁMETROS CITOLÓGICOS

Contaje celular y viabilidad celular

El número total de hemocitos en organismos expuestos a la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) mostró diferencias altamente significativas a las diferentes concentraciones usadas y días de exposición ($F_{sc}=15,80$ y $F_{sd}=4,32$, respectivamente; $p<0,001$ para ambos factores). En la figura 1 se observa un aumento en el número total de células (NTC) sólo en los organismos expuestos a la concentración de 1% durante los 3 días de exposición, en contraste con los organismos no tratados. Contrariamente, un ligero descenso en el NTC fue mostrado a la concentración media de exposición, aunque con baja significancia estadística (Apéndice 1). Durante los 5 y 7 días, los organismos expuestos a FALUMV mostraron una tendencia a la disminución en el NTC a todas las concentraciones de exposición, evidenciándose el mayor efecto supresor a la concentración más alta (20%).

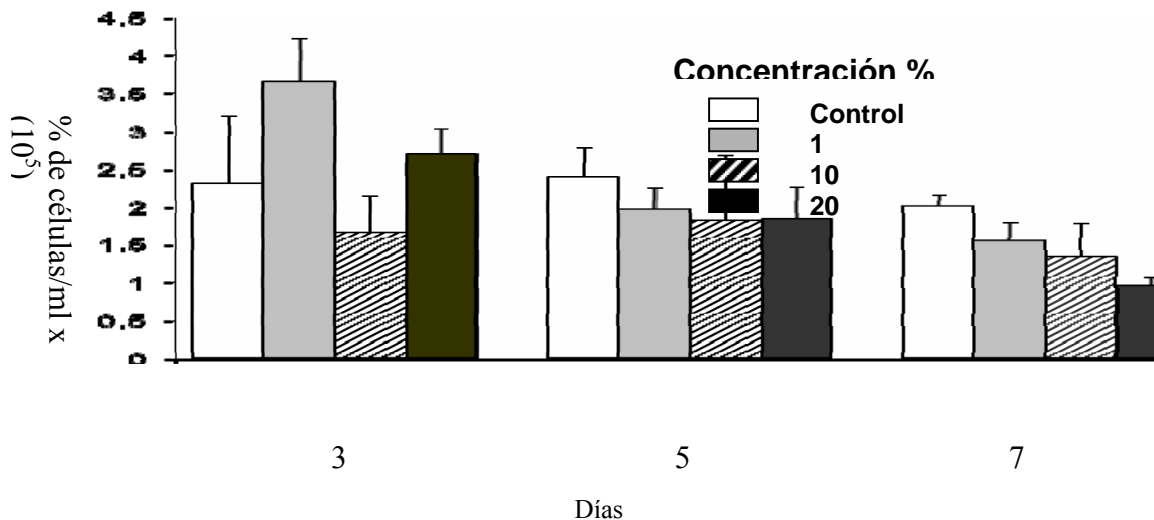


Figura 1. Contaje total de células en la hemolinfa del bivalvo *P. imbricata* expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

El porcentaje de viabilidad (PV) de hemocitos en los organismos expuestos y no

expuestos a la FALUMV varió significativamente tanto con las distintas dosis como con los días de exposición ($F_{s_c}=25,86$ y $F_{s_d}=4,28$; $p<0,001$ para ambos) (Apéndice 2). Durante los primeros 3 días de exposición, los organismos presentaron PV homogéneos cuando se contrastan con los controles. Tales porcentajes oscilaron entre 88-94% en todos los grupos experimentales. Sin embargo, después de 5 días de exposición se observó una reducción evidente en este parámetro celular en los organismos expuestos a todas las concentraciones. Los organismos expuestos a la más alta concentración de FALUMV durante 7 días fueron los más afectados, mostrando una reducción en el porcentaje de células viables aproximadamente de 66% (Figura 2).

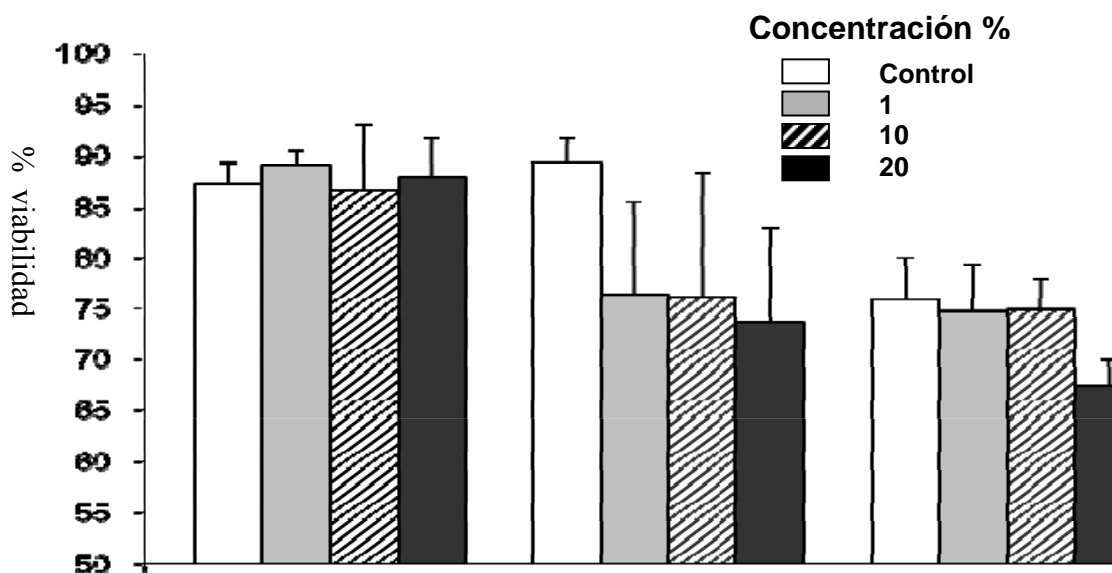


Figura 2. Viabilidad celular en la hemolinfa del bivalvo *P. imbricata* (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

Fagocitosis y actividad de la lisozima

En concordancia con los parámetros citológicos, el número de fagocitos mostró un incremento significativo durante el primer período de exposición (3 días), especialmente a las concentraciones de 10 y 20% (Apéndice 3). Posteriormente, se experimentó un decrecimiento en esta defensa inmunológica mediada por células, siendo más pronunciado el efecto a las concentraciones más elevadas durante los 7 días (Figura 3).

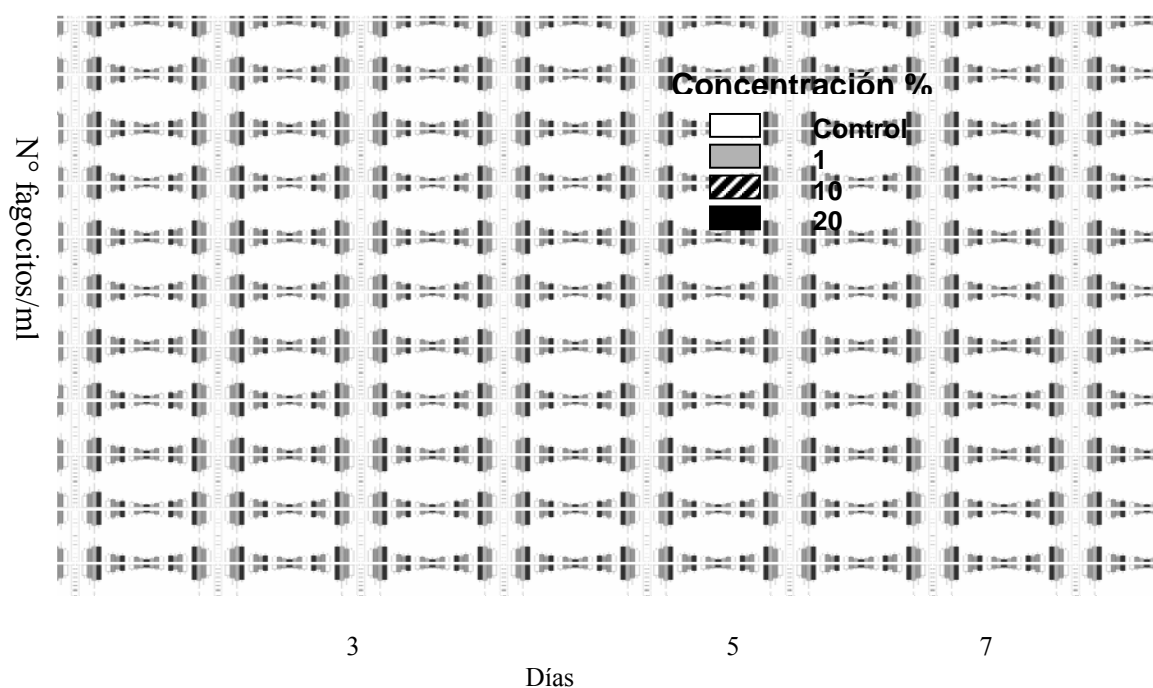


Figura 3. Número de fagocitos en la hemolinfa del bivalvo *P. imbricata* (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

La actividad de lisozima en la glándula digestiva mostró sólo diferencias altamente significativas entre las concentraciones ($F_{s_c}=4,83$; $p<0,001$) y entre los organismos sometidos a la mezcla de xenobióticos, sin embargo no mostró similar tendencia entre los días de exposición ($F_{s_c}=0,60$; $p>0,05$) (Apéndice 4). La figura 4 muestra un descenso de la actividad de la lisozima a la mayor concentración (20%)

durante los primeros 3 días de exposición. En el período de los 5 y 7 días no se evidenció cambio de la actividad de esta enzima entre organismos expuestos y no expuestos.

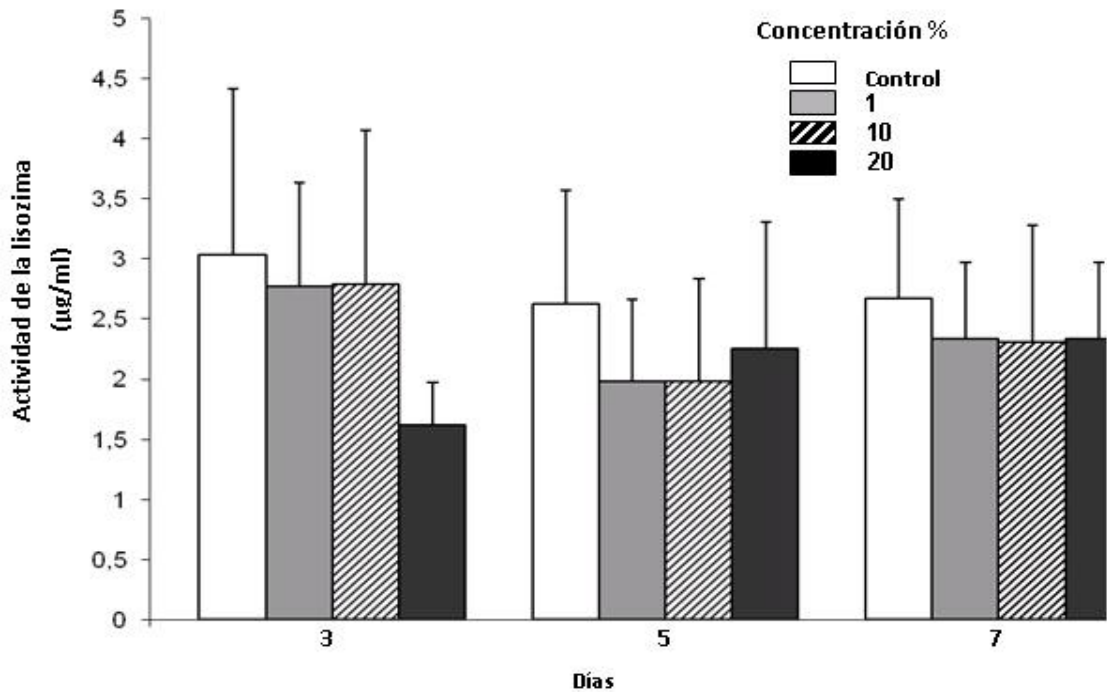


Figura 4. Actividad de la lisozima ($\mu\text{g/ml}$) en la glándula digestiva del bivalvo *P. imbricata* ($n=5$) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

ESTABILIDAD LISOSOMAL

Los organismos expuestos a las concentraciones crecientes de FALUMV presentaron una concomitante reducción en la capacidad de sus lisosomas en retener rojo neutro, evidenciado por los altos porcentaje de hemocitos dañados. El tiempo mínimo para observarse daños a nivel lisosomal fue estimado en una hora para los organismos expuestos, contrariamente los organismos controles exhibieron tiempos de retención mayores a una hora. Este parámetro mostró diferencias altamente significativas entre los organismos expuestos a las concentraciones experimentales ($F_{s_c}=22,54$; $p<0,001$) y entre los tres períodos de exposición a FALUMV ($F_{s_d}=17,17$; $p<0,001$) (Apéndice 5), observándose un incremento de daño lisosomal dependiente de las concentraciones de

exposición. El máximo porcentaje de células dañadas fue evidenciado en los organismos expuestos a 20% durante los 7 días de exposición (Figura 5).

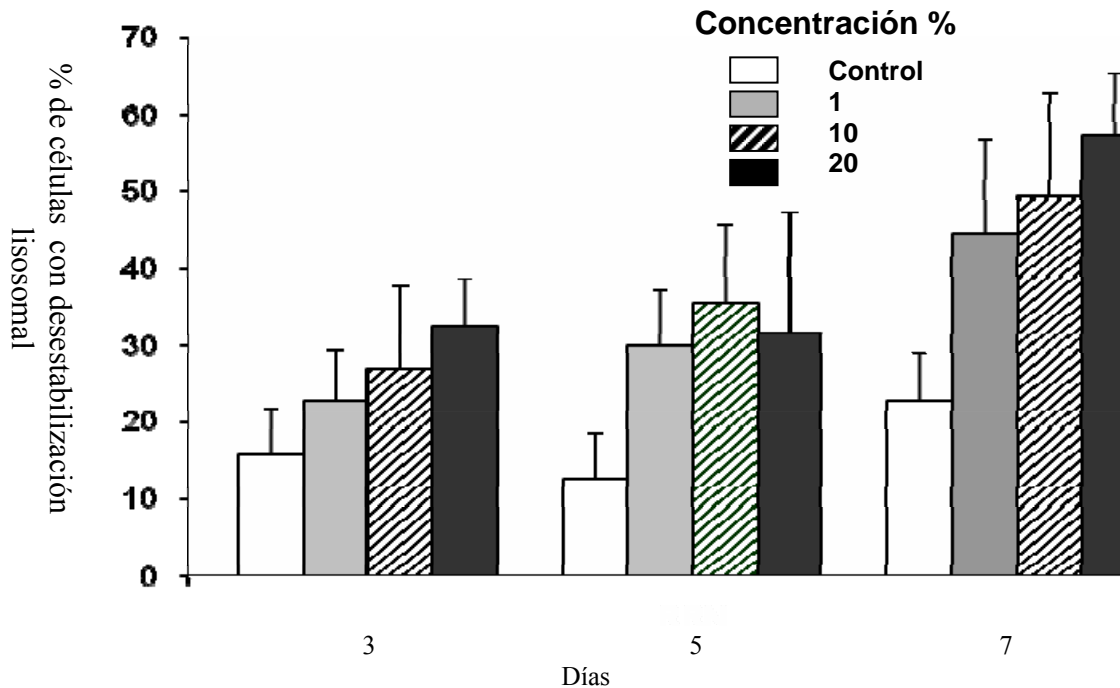


Figura 5. Porcentaje de células con lisosomas desestabilizados en la hemolinfa del bivalvo *P. imbricata* (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20%) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Los niveles de malondialdehído (MDA) en la glándula digestiva de los organismos sometidos a tres períodos de exposición no mostraron variaciones significativas con respecto a los organismos no expuestos ($F_{s_c}=1,90$; $p<0,001$), sin embargo se observaron diferencias altamente significativas entre las concentraciones experimentales ($F_{s_c}=6,17$; $p<0,001$) (Apéndice 6). Se observó un ligero incremento en los niveles de MDA en los organismos expuestos a la concentración más alta, durante los 3 y 5 días de exposición; mientras que a los 7 días no se observó una variación evidente entre las diferentes concentraciones de exposición (Figura 6). Estos datos no presentaron asociación estadística con los parámetros inmunológicos y celulares.

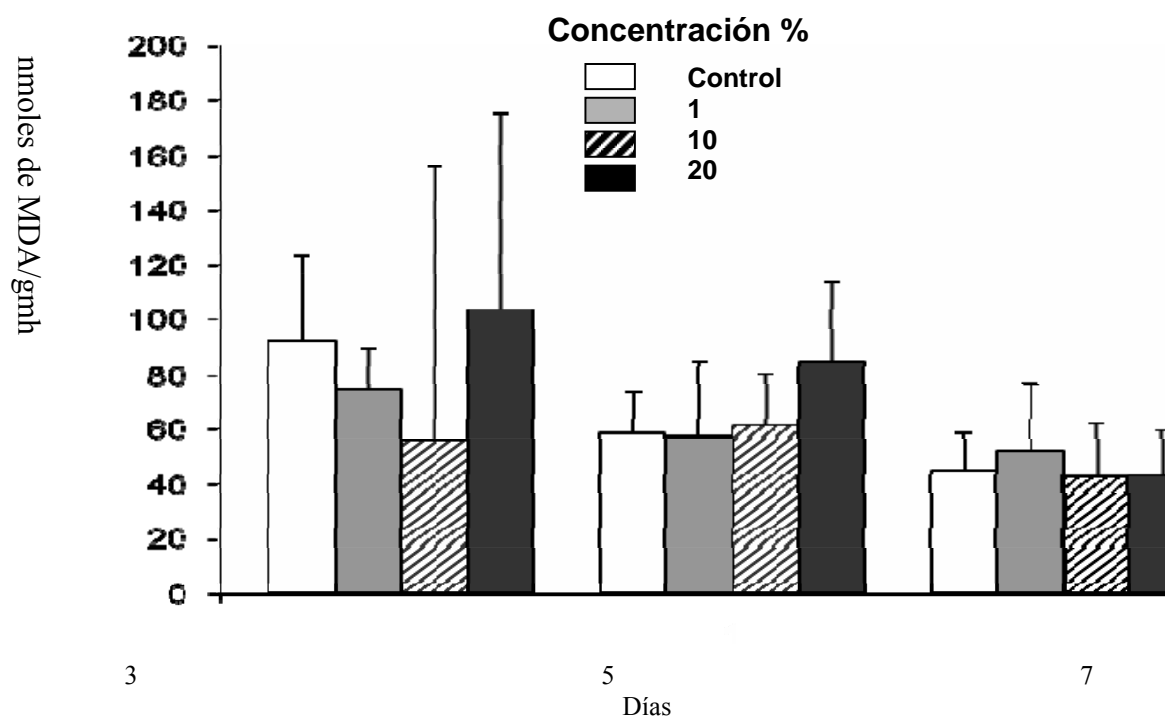


Figura 6. Niveles de malondialdehido (nmoles de MDA/gmh) en la glándula digestiva del bivalvo *P. imbricata* (n=5) expuesto a distintas concentraciones (1, 10 y 20) de FALUMV durante 3, 5 y 7 días. Las barras y las líneas de tendencias representan las medias y la desviación estándar, respectivamente.

DISCUSIÓN

En esta investigación se evidencia el potencial que presenta *P. imbricata* para modular sus respuestas inmunológicas mediadas por células en presencia de bajas concentraciones de la fracción acuosa de lubricantes de motores de vehículos (FALUMV). Estas inferencias están fundamentadas en la variación del número total de hemocitos (NTC), número de fagocitos (NF) y desestabilización lisosomal, en los organismos expuestos a FALUMV. Al parecer, esta respuesta pudo deberse a las situaciones de estrés químico a causa de la presencia de dicha mezcla acuosa.

Durante el período más temprano de exposición se observaron los primeros efectos de las alteraciones fisiológicas, fundamentados en un elevado NTC, a la dosis más baja, e incrementado NF en los organismos expuestos a FALUMV. Al parecer, los organismos fueron capaces de modular una de sus primeras líneas de defensa innata frente a una situación de estrés por mezclas de xenobióticos. Estos efectos estimulatorios sobre distintas respuestas inmunes, a bajas dosis y cortos períodos de exposición a xenobióticos, ha sido frecuentemente observado en distintas especies (Hannam *et al.*, 2009), ocasionando un aumento de la susceptibilidad a los parásitos y otros microorganismos patógenos (Girón, 2010)

Hay considerables evidencias que sugieren que la función inmune en los bivalvos es vulnerable a la modulación por el medio ambiente contaminado (Aufret *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004; Dyrinda *et al.*, 2000).

Los órganos hematopoyéticos en bivalvos, principalmente epitelios encontrados en el seno venoso, puedan ser estimulados por estrés químico, que permite la formación de nuevas células circundantes en la hemolinfa. Se conoce que *P. imbricata* posee una flora bacteriana que convive en la hemolinfa sin causar aparentes patologías, y es posible que estos microorganismos aprovechen el estado de estrés inducido por las concentraciones de FALUMV y la sensibilidad del organismo, para pasar de

microorganismos simbióticos a patógenos, activando por ende su sistema inmune-celular. Se ha demostrado que la mayoría de los contaminantes presentes en la mezcla en estudio, incluyendo metales pesados e hidrocarburos, pueden tener efectos significantes sobre la homeostasis en el número de células sanguíneas totales (Zapata *et al.*, 2004).

En los períodos subsiguientes de experimentación, 5 y 7 días, el NTC y PV muestran un descenso significativo, lo cual permite estimar el tiempo y la concentración mínima necesaria para que la FALUMV cause un efecto detrimental a nivel celular. Los efectos supresores que surgen a consecuencia de la exposición a tóxicos hidrosolubles han sido una respuesta notoria en distintos organismos de diferentes filas, especialmente cuando los mecanismos de defensa contra la acción de xenobióticos son sobrepasados a causa de su acumulación y metabolismo que conllevan a la formación de metabolitos con elevados niveles de toxicidad (Cheng, 1988; Sauvé *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002).

La reducción en número de células circundantes en la hemolinfa durante los 5 y 7 días de exposición está relacionada, de igual forma, con el descenso del PV y NF, siendo estas señales indicativas del limitado desempeño de los hemocitos en sus funciones normales en organismos químicamente estresados por FALUMV. Se ha considerado que el ingreso de algunos xenobióticos a hemocitos puede provocar alteraciones en la fluidez de sus membranas, lo cual puede conllevar a una fragilidad frente a cambios osmóticos sanguíneos, induciendo la lisis celular. Dentro de las funciones que realizan los hemocitos se incluye digestión, transporte de metabolitos, almacenamiento de nutrientes, cicatrización y reparación de la concha, mineralización y excreción. A la vez, se encargan de la defensa intersticial como células efectoras para inmunidad, siendo responsables de la quimiotaxis, reconocimiento de patógenos mediados por lectinas, síntesis de péptidos antimicrobianos, procesos fagocíticos y encapsulación de microorganismos (Spark y Morado, 1988; Mount *et al.*, 2004). En general, todas estas funciones pueden ser limitadas por un descenso significativo del NTC.

En *P. imbricata*, de igual manera como ocurre en los vertebrados, la fagocitosis es la primera línea de defensa contra la invasión de microorganismos. Durante este proceso, el agente extraño o invasor es englobado, internalizado y destruido intracelularmente por los hemocitos, a través de mecanismos microbicidas conocidos. En distintas publicaciones ha sido demostrado que los hemocitos granulares, en mayor grado, y en poca frecuencia los hemocitos hialinos, son las células encargadas del proceso fagocítico. Tales células poseen lisosomas que pueden fundirse con las vesículas endosómicas o fagosomas. Además, durante la fagocitosis y el encapsulamiento, pueden ser liberados una diversidad de factores humorales desde los hemocitos con la finalidad de neutralizar y destruir a los agentes invasores (Goven *et al.*, 1994; Goven y Kennedy, 1996). Posiblemente los altos niveles de contaminantes hidrosolubles que se supone contiene la mezcla de FALUMV ocasionen daños celulares directos que conllevan a la disfuncionabilidad de estas células inmunes.

Los bivalvos poseen un sistema circulatorio abierto compuesto de un compartimiento circulante con láminas capilares. Los hemocitos pueden circular en vasos, pero pueden también ser restringidos en tejidos intersticiales de algunos órganos. Existen redes complejas en forma de senos que están localizadas en varios órganos, siendo los más importantes la cavidad pericardial y el músculo aductor (Lambert *et al.*, 2007; Gagnaire *et al.*, 2008). Sin embargo, en *P. imbricata* la colección más abundante de hemocitos, con menos cantidad de gametos y bacterias acompañantes, es realizada en el seno hemolinfático del músculo aductor.

En *P. imbricata*, los granulocitos muestran una alta actividad fagocítica en contraste con los hialocitos, tal como lo sugiere Hine (1999) en otras especies de bivalvos. Este detalle es corroborado en *Crassostrea virginica* (Goedken y De Guise, 2004) y en *Mytilus edulis* (Pipe *et al.*, 1997). El seno venoso y músculo aductor está involucrado en la circulación de la hemolinfa a través del cuerpo; similar a un corazón, particularmente las aurículas han sido descritas como un sitio de bioacumulación y desintoxicación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos, y otros

xenobióticos (Zaroogian y Yevich, 1994).

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. Se ha reportado que mejillones de la especie *Mytilus edulis* colectados en zonas impactadas por derrames petroleros presentan una gran producción de anión superóxido y actividad fagocitaria (Dyrynda *et al.*, 2000). 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 el estado de salud del organismo.

La modulación del sistema inmunológico por agentes contaminantes ha sido descrita en una variedad de invertebrados acuáticos, incluyendo moluscos bivalvos (Livingstong *et al.*, 2000). Por lo general, la exposición crónica a sustancias orgánicas (hidrocarburos aromáticos, pesticidas, bifenilos policlorados, entre otros) ejerce 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. 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 (Klein *et al.*, 1991) y la habilidad de producir especies reactivas del oxígeno como radicales antibacterianos (Livingstong, 2001).

Los organismos expuestos a las crecientes concentraciones de FALUMV presentaron poblaciones de hemocitos con baja capacidad de retener el colorante rojo neutro, mostrando una relación proporcional entre dosis usadas y la respuesta obtenida. El máximo porcentaje de células dañadas fue evidenciado en los organismos expuestos a la más alta concentración durante los 7 días de exposición. Este daño está asociado a una alta incidencia de desestabilización de las membranas lisosomales, que a su vez podría influenciar la reducción de la viabilidad celular. Se conoce que en bivalvos, los

lisosomas son los organelos con mayor capacidad de acumulación y homeostasis de xenobióticos, incluyendo hidrocarburos (Pruell y Quinn, 1988) y metales pesados (Nicholson, 2003).

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 en las proteínas y ácidos nucleicos si no emerge una respuesta antioxidante adecuada.

Los niveles de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) determinados en la glándula digestiva no mostraron variaciones entre los organismos experimentales, sin embargo se muestran los daños oxidativos que se produjeron en el incremento a la concentración más alta (20%) durante los 3 y 5 días de exposición de los organismos, mientras que para el último período de 7 días de exposición posiblemente se activaron respuestas antioxidantes o rutas de depuración capaces de controlar la toxicidad del contaminante, presumiblemente asociado con una excesiva producción de peroxidación de hidrógeno (H_2O_2) y oxiradicales ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) alcoxiradicales y peroxiradicales, etc. Derivados de la biotransformación de la mezcla de xenobióticos. Indicando que este órgano presenta mecanismos antioxidantes eficientes en presencia de concentraciones subletales de FALUMV. En *P. imbricata* se ha demostrado que la exposición a fracciones acuosas de Fuel Oil N° 6 puede provocar el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes y metabolizadoras de xenobióticos en la glándula digestiva de esta especie, mostrando la efectividad de los sistemas de protección oxidativa; manifestación adaptativa ante una posible situación de estrés oxidativo (Nuseti *et al.*, 2004).

La peroxidación de lípidos puede perturbar las propiedades estructurales y funcionales de las membranas biológicas, alterando su fluidez y capacidad para mantener un adecuado balance. La destrucción de sus componentes esenciales modifica la integridad y funcionalidad de los organelos. En este contexto, las alteraciones en las

membranas biológicas puede comprometer la funcionabilidad de los componentes lisosomales, generando procesos degradativos que pueden traer como consecuencia la autólisis celular (Viarengo *et al.*, 1991; Marín *et al.*, 1993).

En contraste con la actividad de la lisozima, ésta es una enzima antimicrobiana la cual actúa sobre las uniones de los peptidoglicanos de la pared de ciertas bacterias y hongos, funcionando así como un componente innato que protege al organismo de bacterias y controla la flora simbiótica natural. Se almacena en el interior de los lisosomas de los hemocitos y su liberación al medio extracelular se estimula por los procesos de fagocitosis (McHenery *et al.*, 1979; Goven *et al.*, 1994).

La actividad de lisozima en la glándula digestiva fue modulada por las distintas concentraciones de exposición, mostrando alternabilidad en su respuesta. Al parecer la actividad de lisozima en estos organismos no muestra un patrón de efecto homogéneo en presencia de las concentraciones usadas. Inicialmente fue registrado un descenso de la actividad durante los primeros 3 días de exposición a 20% de FALUMV, presumiblemente este descenso de la actividad de la lisozima observada en la glándula digestiva de *P. imbricata* durante este período de exposición (3 días), estuvo asociado posiblemente por un aumento de MDA en este tejido a esta concentración, los cuales reflejaron daños oxidativos, ocasionando cambios en las propiedades estructurales de la enzima y por consiguiente disminuir la actividad lítica. Diversos autores han demostrado descensos de la actividad de lisozima en distintas especies de invertebrados y vertebrados (Montenegro y Viana, 2000).

El incremento de la actividad de lisozima en la glándula digestiva de *P. imbricata* expuesta a corto plazo a FALUMV permite incrementar las defensas bioquímicas frente a antígenos externos. Este mecanismo de protección, cuando algunos parámetros inmuno-celulares se encuentran suprimidos, ha sido descrito en otros invertebrados marinos, tal es el caso del poliqueto *Eurythoe complanata* (Marcano *et al.*,

1997; Zapata *et al.*, 2005) y el bivalvo *Lima scabra* (Sánchez, 2008).

La respuesta bacteriolítica de lisozimas como biomarcadores en inmunoensayos de biotoxicidad de xenobióticos ha sido ampliamente examinada. En otros estudios, usando a *P. imbricata* como modelo, se demostró 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 (Nuseti *et al.*, 2004). Probablemente, la condición de estrés manifestado en el organismo durante la exposición aguda a la FALUMV muestra 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. En tal caso, si se contrastan los resultados con los hallados en los experimentos de Nuseti *et al.* (2004), *P. imbricata* presenta mayor sensibilidad a la FALUMV que a fracciones acuosas del petróleo pesado Fuel Oil N° 6.

Las distintas concentraciones de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos empleadas en los bioensayos de toxicidad aguda produjeron efectos moduladores sobre la inmunidad innata, en especial restricción a las funciones inmunológicas normales en *P. imbricata*, asociadas a la alteración de la estabilidad de los lisosomas en hemocitos.

CONCLUSIONES

P. imbricata modula sus respuestas inmune celular en los tratamientos con FALUMV, activando fagocitosis a muy corto plazo (3 días), siendo evidente el efecto perjudicial de la mezcla a partir del período de 5 días de exposición.

Las distintas concentraciones de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos afectaron perjudicialmente la integridad de las membranas lisosomales de los hemocitos de *P. imbricata* durante todos los períodos de exposición, siendo el tiempo de retención de rojo neutro el marcador celular más sensible de todos los evaluados en este estudio.

La actividad de la lisozima en hemocitos de la glándula digestiva de *P. imbricata* presentó un descenso significativo durante el primer período de exposición expuesto a la FALUMV, posiblemente asociado a daños oxidativos.

Las distintas concentraciones de la FALUMV, mostraron efectos tóxicos en los lípidos de membranas, evidenciándose a las más altas concentraciones durante los períodos de 3 y 5 días de exposición de los organismos, asociado a estrés oxidativo.

Las distintas concentraciones de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos empleadas en los bioensayos de toxicidad aguda produjeron efectos moduladores sobre la inmunidad innata, en especial restricción a las funciones inmunológicas normales en *P. imbricata*, asociadas a la alteración de la estabilidad de los lisosomas en hemocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1997. Used mineral-based crankcase oil. División de Toxicología ToxFAQs™. División de Toxicología, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, CAS 8002-05-9.
- Auffret, M., Duchemin, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., Marhic, A. 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 297-302.
- 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. *Toxicol.*, 142: 145-156.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H. 2004. Differential sensitivity of marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 66, 267-278.
- Cajaraville, M.; Uranga, J. y Angulo, E. 1998. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels. Quantitative histochemistry of enzymes related to the detoxication metabolism. *Biochem. Physiol.*, 103C: 369-377.
- Cheng, T. 1988. In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea gigas*: phagocytic and endocytic indices. *J. Invertebr. Pathol.*, 51: 215-220.
- Cheung, C.; Siu, W.; Richardson, B.; De Luca-Abbott, S. y Lam, P. 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.*, 128: 393-403.
- Cheung, C.; Zheng, G.; Lam, P. y Richardson, B. 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.*, 45: 181-191.
- Di Giulio, R.; Benson, W.; Sander, B. y Vanveld, P. 1995. *Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity*. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G. (ed). Second edition. 223-255.
- Dyrynda, E.; Law, R.; Dyrynda, P.; Kelly, C.; Pipe, R. y Ratcliffe, N. 2000. Changes in immune parameter of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a

- major oil spill ('sea Empress', Wales, UK). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 200: 155-170.
- 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.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.
- Gagnaire, B.; Duchemin, M.; Auffret, M.; Thomas-Guyon, H. y Renault, T. 2008. Comparison of hemocyte parameters in the pericardial cavity and the adductor muscle sinus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* using two types of flow cytometers. *Aquat. Living Resour.*, 21: 39-43.
- Gagnaire, B.; Thomas-Guyon, H. y Renault, T. 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 161: 501-512.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/UNEP). 1997. Joint group of experts on the scientific aspects on marine pollution. Impact of oil and related chemical and wastes on the marine environment. *Rep. Stud.*, 50: 1-4.
- Girón-Pérez, M.I. 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *Review*. 149-156.
- Goedken, M. y De Guise, S. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 539- 552.
- Goven, A.; Chen, S.; Fitzpatrick, L. y Venables, B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) celomic fluid and immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Physiol.*, 13: 607-613.
- Goven, A.; Eyambe, G.; Fitzpatrick, L.; Venables, B. y Cooper, E. 1993. Cellular biomarkers for measuring toxicity of xenobiotics: effects of polychlorinated biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes *environ. toxicol.*, 12: 863-870
- Goven, A. y Kennedy, J. 1996. Environmental pollution and toxicity in invertebrates: An earthworm model for immunotoxicology. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 24: 170-211.

- Hamza-Chaffai, A.; Pellerin, J. y Amiard, J. 2003. Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussates* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ. Inter.*, 28: 609-617.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Sundt, R.C., Gallowey, T.S. 2009. Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Elsevier, Environ. Pollut.*, 1-6.
- Hine, P. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shell. Immunol.*, 9: 367-385.
- Klein, C.; Frenkel, K. y Costa, M. 1991. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 592-604.
- Lambert, C.; Soudant, P.; Degremont, L.; Delaporte, M.; Moal, J.; Boudry, P.; Jean, F.; Huvet, A. y Samain, J. 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture*, 270: 276-288.
- Livingstone, D. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 42: 656-666.
- Livingstone, D.; Chipman, J.; Lowe, D.; Minier, C.; Michelmore, M.; Peters, L. y Pipe, R. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis*) and other mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.*, 13: 56-91.
- Lodeiros, C.; Marín, B. y Prieto, A. 1999. *Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela*. Clase Bivalvia. APUDONS. Cumaná. Venezuela.
- Lowe, D.; Moore, M. y Evans, B. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab, *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 131-140.
- Lowe, D. y Pipe, R. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.*, 30: 357-365.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- 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, L.; Nusetti, O.; Zapata, E.; Nusetti, S. y Esclapés, M. 2006. Fuel Oil No. 6 effects on antioxidant enzymes and immunological responses in the fish *Thalassophryne maculosa* (Pisces: Batrochoididae) *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 1-5.
- 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. y Collins, M. (eds). *Elsevier Oceanography*, 70: 335-364.
- Marín, R.; Provencio, T.; Rodríguez, A. y Tiskow, G. 1993. Peroxidación lipídica y actividades ATPásicas. *Acta Cientif. Venezol.*, 44: 125-130.
- Martínez, G. 2002. Algunos metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Oceanogr. Univ. Oriente*, 41: 83-93.
- McHenry, J.; Birbeck, T. y Allen, J. 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63: 25-28.
- Michels, R. y Remade, J. 1988. Use of inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur. J. Biochem.*, 177: 435-441.
- Montenegro, R.E. y Viana, M.T. 2000. Propiedades químicas y bacteriológicas de la lisozima de la almeja *Tivela stultorum*. *Ciencias marinas*. 26 : 225-251
- Moore, M. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*, 16: 134-139.
- Mount, A.; Wheeler, R.; Paradkar, P. y Snider, D. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*, 304: 297-300.
- Nicholson, S. 2003. Lysosomal membrane, phagocytosis and tolerance to emersión in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.
- Nusetti, O.; Esclapes, M.; Salazar, G.; Nusetti, S. y Pulido, S. 2001. Biomarker of oxidative stress in the Polychaete *Eurythoe complanata* Amphinoimidae Under short term copper exposure. *Bull. Environ. Toxicol.*, 66: 576-581.

- Nusetti, O.; Marcano, L.; Zapata, E.; Escalpés, M.; Nusetti, S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de Fuel Oil N° 6. *Interciencia*, 29: 324-328.
- Nusetti, O.; Salazar, R.; Rodríguez, J. y Vilas, J. 1998. Immune y biochemical responses of the Polychaeta *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of cooper. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 177-183.
- Nusetti, O.; Esclapez, 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.; Zapata, E.; Escalpés, 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
- Pipe, R.; Farley, S. y Coles, J. 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, 289: 537-45.
- Pruell, R. y Quinn, J. 1988. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crankcase oil. *Environ. Pollut.*, 49: 89-97.
- Regoli, F.; Frenzilli, G.; Bochetti, R.; Annarumma, F.; Scarcelli, V.; Fattorini, D. y Nigro, M. 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicol.*, 68: 167-178.
- Sami, S.; Faisal, M. y Huggett, R. 1992. Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Mar. Biol.*, 113: 247-252.
- 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 Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Sauvé, S.; Brosseau, P.; Pellerin, Y.; Morin, L.; Sénécal, P.; Goudreau, P. y Fournier, M. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in Vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.*, 58: 189-200.
- 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.

- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidants defence. *Eur. J. Biochem.*, 215: 213-239.
- Sparks, A. y Morado, J. 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. In: Fisher WS, editor. Disease processes in marine bivalve molluscs. Bethesda, MD: *American Fisheries Society*, 18: 139-152.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1979. *Biometría: principios, métodos estadísticos en la investigación biológica*. Ed. Blume. Madrid.
- Stephan, C.; Brush, K.; Smith, R.; Burke, J. y Andrew, R. 1978. A computer program for calculating an LC₅₀. En: *Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres*. Rodríguez, J. y Escaplés, M. (eds). Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 213 pp.
- Torreilles, J. y Guérin, M. 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 9: 509-518.
- Viarengo, A.; Pertica, M.; Canesi, L.; Accomando, R.; Mancinelli, G. y Orunesu, M. 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, Vitamin E) in the digestive gland of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Mar. Environ. Res.*, 28: 291-295.
- Viarengo, A.; Canesi, L.; Pertica, M. y Levinsgtone, D. 1991. Seasonal variation in the antioxidants defenses systems and lipids peroxidation of the digestive gland of mussel. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 189-190.
- Week, J.; Sharp, V. y Williams, T. 1997. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of green mussel *Perna viridis* (Mytilidae): a field transplant study. Technical Report WC/97/64. DFID-TDR Project R6191. Land-derived contaminant influx to Jakarta Bay, *Indonesia*, 2: 1-30.
- Zapata, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Escalpés, M. y Arredondo, L. 2005. Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Anphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas.*, 31: 1-9.
- Zarogian, G. y Yevich, P. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, 37: 355-373.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Parámetros Citológicos, Inmunológicos Y Estabilidad Lisosomal En Hemocitos Del Bivalvo <i>Pinctada Imbricata</i> Expuesto A Fracciones Solubles De Lubricantes Usados De Vehículos. (Modalidad: Investigación)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
ANTÓN M., MARIANNY J	CVLAC	13053640
	e-mail	amarianny@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Fagocitosis, estabilidad lisosomal, inmunología en bivalvos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BILOGÍA

Resumen (abstract):

Los desechos de lubricantes usados por motores constituyen un problema potencial de contaminación en ecosistemas marinos costeros, debido a que sus componentes tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados y compuestos policlorados pueden solubilizarse, quedando disponibles a la biota circundante. La absorción y biotransformación de estos xenobióticos en invertebrados marinos puede conllevar a alteraciones de las respuestas inmunológicas e inducir condiciones de estrés oxidativo por una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y otros radicales libres. En tal sentido, en este estudio se evaluaron los efectos ocasionados, a corto plazo, por una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) sobre el sistema inmune-inespecífico, estabilidad lisosomal en hemocitos y su relación con daños oxidativos sobre lípidos en glándula digestiva de la ostra perla *Pinctada imbricata*; un organismo representativo de los ecosistemas arrecifales caribeños. Los ejemplares fueron expuestos, bajo condiciones controladas, a tres concentraciones subletales de FALUMV (0, 10 y 20 % v/v) durante 3, 5 y 7 días. Algunos parámetros celulares (conteo y número total de hemocitos), junto a las defensas inespecíficas celulares (fagocitosis) y humoral (lisozima) fueron usados como marcadores para evaluar efectos inmunotóxicos. Adicionalmente, el tiempo de retención del colorante rojo neutro en hemocitos y producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la glándula digestiva fueron utilizados como indicadores de la desestabilización de las membranas lisosomales (DML) y daño oxidativo, respectivamente. Descensos significativos fueron encontrados en la mayoría de los parámetros inmunológicos-celulares en organismos expuestos a las distintas concentraciones de FALUMV a partir del quinto día de exposición, asociados a una elevada DML. La más alta concentración de FALUMV (20%) coincidió con un estado de inmunosupresión. Los niveles de TBARS mostraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones experimentales. Esta investigación evidenció un efecto inmunosupresor, principalmente del componente celular (viabilidad, número total de células y fagocitos), inducidos posiblemente por los compuestos hidrosolubles contentivos en FALUMV. El declive en algunas respuestas celulares indica concentraciones tóxicas mínimas que restringen la capacidad de defensa contra microorganismos patógenos invasores. La determinación de los parámetros celulares, inmunológicos y la desestabilización lisosomal suministran una efectiva información de alteraciones relacionadas con mezclas de xenobióticos de origen antropogénico.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Zapata V., Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12.269.219
	e-mail	edzapata2002@yahoo.com
	e-mail	
Nuseti, Osmar	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	684.534
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	
Lemus, Mairin	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	6.429.405
	e-mail	mlemus@gmail.com
	e-mail	
Marcano, Leyda	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.219.437
	e-mail	Leimar0501@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	08	12

Lenguaje: spa _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Antonm.doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:
Licenciatura Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

BIOLOGÍA

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

Universidad de Oriente Núcleo de Sucre

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°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"**.

Leído 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 *Mazley*
FECHA *5/8/09* HORA *5:30*

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO
Secretario

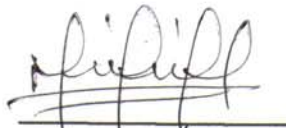


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

JABC/YGC/manuja

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 Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.



Antón Marianny
Autor 1



Edgar Zapata
Asesor