

ÍNDICE ARN/ADN COMO INDICADOR DE LA CONDICIÓN FISIOLÓGICA EN EJEMPLARES DE *Donax denticulatus* EXPUESTOS A DOSIS SUBLETALES DE CADMIO

RNA/DNA INDEX AS AN INDICATOR OF THE PHYSIOLOGICAL CONDITION IN SPECIMENS OF *Donax denticulatus* EXPOSED TO SUBLETHAL DOSES OF CADMIUM

YANET ANTÓN¹, MAIRÍN LEMUS², KYUNG CHUNG³

¹Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente

²Departamento de Biología, Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán, Universidad de Oriente.

³Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente.
mlemus@sucre.udo.edu.ve

RESUMEN

Se evaluó el índice ARN/ADN en ejemplares de *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio durante 21 días e igual período de depuración. Se tomaron organismos previamente mantenidos en laboratorio y se colocaron en acuarios, con una densidad de 2 ind/ l, utilizándose las siguientes condiciones: 0 (control), 1 y 2 mg/l de cadmio, el bioensayo se realizó por duplicado. Los valores en las determinaciones de ARN y ADN en tejido blando fueron expresados en $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo. Los análisis, mostraron diferencias significativas en ARN y la relación ARN/ADN y no significativas en ADN en los ejemplares de *D. denticulatus*. En los organismos expuestos a Cd, se produjo una disminución de la concentración de ARN, resultando más afectados los expuestos a la dosis de 2 mg/l con un valor de $1,25\pm 0,12 \mu\text{g/g}$ con respecto al control ($8,72\pm 1,37 \mu\text{g/g}$). Después del proceso de depuración se observó un incremento de ARN hasta $5,6\pm 0,88 \mu\text{g/g}$, sin embargo, no alcanzaron el valor obtenido en los controles. En el índice ARN/ADN, también se observó el valor más bajo en los organismos expuestos a 2 mg/g ($1,17\pm 0,27 \mu\text{g/g}$) mientras que en los depurados a 1 mg/l el valor fue de $6,24\pm 0,93 \mu\text{g/g}$. Estos resultados demuestran que la relación ARN/ADN en *D. denticulatus* disminuyó en organismos expuestos a cadmio, asociada posiblemente con el gasto energético que implican los procesos de incorporación, metabolización y excreción del metal, que comprometieron la energía destinada a crecimiento.

PALABRAS CLAVE: Relación ARN/ADN, Cadmio, *Donax denticulatus*.

ABSTRACT

The RNA/DNA index was evaluated in specimens of *Donax denticulatus* exposed to sublethal doses of cadmium for 21 days and for a similar time span to detoxification. Previously acclimated organisms were taken and put in aquaria with a density of 2 ind/L, under the following conditions: 0 (control), 1 and 2 ppm of cadmium, and the bioassay was replicated. The RNA and DNA determination in tissues was expressed in $\mu\text{g/g}$ of wet mass. The results showed significant differences in RNA and RNA/DNA index and nonsignificant ones in DNA in the specimens of *D. Denticulatus*. In the organisms exposed to Cd, there was a decrease of RNA concentration, being more affected by the 2 mg/l dose with a value of $1.25\pm 0,12 \mu\text{g/g}$ in relation to the control ($8.72\pm 1,37 \mu\text{g/g}$). After the detoxification process an increase of up to $5.6\pm 0,88 \mu\text{g/g}$ in RNA was observed, however the value obtained in controls was not changed. Concerning the RNA/DNA index, the lowest value was also detected in organisms exposed to 2 ppm ($1.17\pm 0,27 \mu\text{g/g}$), while in those detoxicated at 1 mg/l the value was $6.24\pm 0,93 \mu\text{g/g}$. These results show that the growth rate evaluated in *D. Denticulatus* through the RNA/DNA index is affected by the exposure to the metal.

KEY WORDS: RNA/DNA index, sublethal doses, Cadmium, *Donax denticulatus*.

INTRODUCCIÓN

La relación ARN/ADN ha tenido una gran aplicación en estudios sobre la biología del crecimiento de los organismos acuáticos bajo condiciones controladas o en ambientes naturales (Chung *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2003) y más recientemente en el área de ecotoxicología. El contenido de ADN es estable e indicativo del número de células o del crecimiento por proliferación celular, el índice ARN/ADN, indica actividad metabólica asociada a la síntesis de proteínas, reflejado en un crecimiento por aumento de volumen (Clemmessen *et al.*, 1997; Clemmessen, 1988).

Este índice ARN/ADN puede ser utilizado como herramienta para determinar el grado de perturbación causado en organismos por la presencia de xenobioticos en el ambiente y reviste gran utilidad para evaluar áreas afectadas por la presencia de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Wo y Wu 1999; Wang 2002).

Los bivalvos, en general, han sido utilizados en ensayos de toxicidad debido a su gran capacidad para bioconcentrar tóxicos y como indicadores de stress producido por metales pesados (Martins 2004). El bivalvo *Donax denticulatus* (Mollusca: Pellecypoda) es un organismo muy común y abundante en las costas arenosas, se encuentra colonizando la zona intermareal, ambientes acuáticos extremos debido a su alto grado de perturbación física causado por el movimiento tanto de la arena como del agua (Sartre, 1984). Este molusco es muy común en el Golfo de Cariaco; zona en donde se ha determinado niveles significativos de cadmio en otros bivalvos como *Lima scabra* y *Perna viridis* (Martins, 2002; Evaristo 2007).

Considerando lo antes expuesto se estableció como objetivo de este estudio evaluar mediante la determinación de los ácidos nucleicos y del índice ARN/ADN la condición fisiológica de ejemplares de *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura de los organismos: los ejemplares de *D. denticulatus* fueron recolectados de forma manual en la zona intermareal de la costa de los Bordonos, playa San Luis, en el Golfo de Cariaco, estado Sucre a 40° 28' latitud norte y 64° 10' longitud oeste y transportados al laboratorio de Ecofisiología del Instituto Oceanográfico

de Venezuela en la Universidad de Oriente.

Aclimatación de los organismos: organismos con tallas comprendidas entre 1,86–2,30 cm de longitud antero-posterior y con un peso de 0,48–0,52 g fueron colocados en acuarios de 10 l de capacidad con agua de mar filtrada y arena esterilizada, y aclimatados en el laboratorio durante 20 días, lapso en el cual los ejemplares fueron alimentados con una suspensión microalgal (30000 cel/ml) de *Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros gracilis* 1 vez al día ad libitum. Durante la aclimatación y exposición los organismos se mantuvieron bajo condiciones controladas: pH: 7,5–8; fotoperíodo: 12/12 y salinidad 35‰, temperatura 26 ±1,5°C, oxígeno 5,6 mg/l.

Realización del bioensayo: se colocaron 20 organismos por cada acuario y se realizaron los siguientes grupos experimentales: 0 (control), 1 y 2 mg/l de cadmio (preparado con cloruro de cadmio) cada uno con sus respectivos duplicados, por un período de exposición de 21 días. Las dosis del metal se renovaron diariamente. Al finalizar el tiempo de exposición se procedió a extraer todo el tejido blando a 9 organismos por cada acuario, inmediatamente este tejido fue congelado a –17 C° hasta el momento de ser analizados. Los organismos restantes fueron colocados en agua limpia, sin metal (por duplicado), por 21 días hasta completar la fase de depuración, al final de la cual, igualmente fue extraído el tejido blando para su posterior análisis.

Las determinaciones de los ácidos nucleicos (ARN, ADN) se realizaron empleando la técnica de Canino y Calderone (1995). Se utilizó un análisis de varianza sencillo para establecer si existían diferencias significativas entre la concentración de las biomoléculas estudiadas y las diferentes condiciones establecidas.

RESULTADOS

Los análisis estadísticos de los valores promedios de la concentración de ARN, ADN y de la relación ARN/ADN en el tejido blando de *D. denticulatus* expuesto a dosis subletales de cadmio, mostraron diferencias estadísticamente significativas en ARN (Fs: 50.49; $p < 0.001$) y ARN/ADN (Fs: 49.8; $p < 0.001$) y no significativas en ADN (Tabla 1).

En ejemplares expuestos a cadmio se evidenció una disminución significativa del ARN a medida que aumentó la concentración del metal, y la posterior elevación de los valores cuando los organismos son

colocados en la fase de depuración, pero sin llegar a alcanzar los valores de los controles. Los organismos expuestos a la concentración de 2 mg/l presentaron la mayor disminución de la concentración de ARN con un valor de $1,25 \pm 0,12$ $\mu\text{g/g}$ con respecto a los controles, que presentaron un valor promedio de $8,72 \pm 1,37$ $\mu\text{g/g}$

g. Los organismos depurados durante 21 días a esta concentración, lograron incrementar los valores de ARN hasta $5,6 \pm 0,88$ $\mu\text{g/g}$, valor estadísticamente similar al presentado por los organismos depurados, previamente expuestos a 1 mg/l del metal (Figura 1).

Tabla 1. Valores promedios de las concentraciones de ARN \pm SD ($\mu\text{g/g}$); ADN \pm SD ($\mu\text{g/g}$) y relación ARN/ADN \pm SD, en el tejido blando de organismos controles, expuestos y depurados de *Donax denticulatus*.

CONDICIÓN	ARN ($\mu\text{g/g}$)	ADN ($\mu\text{g/g}$)	ARN/ADN
Control N=9	$(8,72 \pm 1,37)^d$	$(0,82 \pm 0,018)$	$(10,8 \pm 2,53)^d$
Expuestos 1ppm N=9	$(2,61 \pm 0,35)^b$	$(1,25 \pm 0,10)$	$(2,10 \pm 0,31)^b$
Expuestos 2 ppm N=9	$(1,25 \pm 0,12)^a$	$(1,10 \pm 0,21)$	$(1,17 \pm 0,27)^a$
Depurados 1 ppm N= 9	$(5,09 \pm 0,57)^c$	$(0,82 \pm 0,07)$	$(6,24 \pm 0,93)^c$
Depurados 2 ppm N= 9	$(5,6 \pm 0,88)^c$	$(1,26 \pm 0,16)$	$(4,53 \pm 1,07)^c$
	Fs: 50.49 **	Fs: 0.9; Ns	Fs: 49.8**

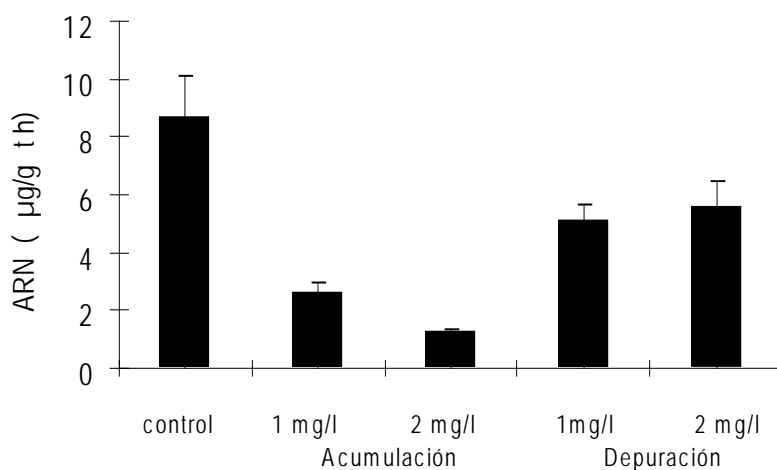


Figura 1. Concentraciones promedios de ARN ($\mu\text{g/g t h}$) en el tejido blando de ejemplares de *Donax denticulatus* en organismos controles (C), expuestos a cadmio (1 y 2 mg/l) depurados.

En los valores de ADN no hubo variaciones estadísticamente significativas, sin embargo, se halló un ligero aumento en los organismos expuestos a 1 mg/l (1,25 µg/g) y en los organismos que depuraron a 2 mg/l con un valor de 1,26 µg/g (Figura 2).

En el índice ARN/ADN, se hallaron diferencias significativas, observándose el valor más bajo en los

organismos expuestos a 2 mg/l (1,17±0,27 µg/g). Durante la depuración, estos organismos lograron incrementar este índice (Figura 3), donde se puede observar la evidente disminución de los índices correspondientes a los organismos expuestos al metal, y el posterior aumento de éste durante el período de depuración, no obstante, no llegan a alcanzar los valores correspondientes a los controles; siendo el grupo expuesto a 2 mg/l el que más evidencia esta disminución.

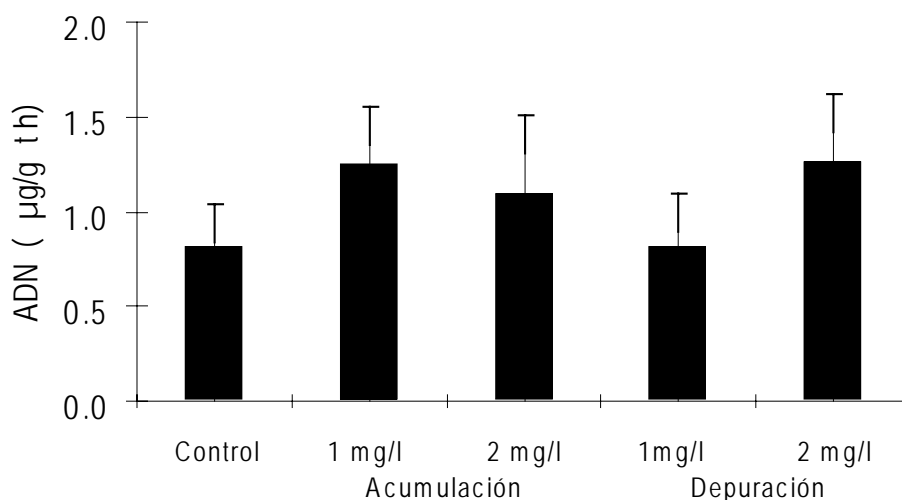


Figura 2. Concentraciones promedio de ADN (µg/g t h) en el tejido blando de ejemplares de *Donax denticulatus* en organismos controles (C), expuestos a cadmio (1 y 2 mg/l) y depurados.

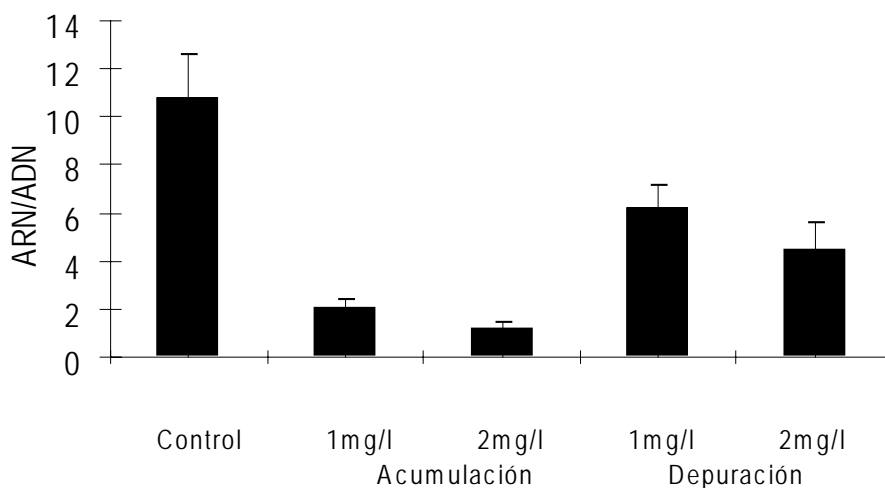


Figura 3. Valores promedio del índice ARN/ADN en el tejido blando de ejemplares de *Donax denticulatus* en organismos controles (C), expuestos a cadmio (1 y 2 mg/l) y depurados.

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos en las concentraciones de ARN y de los valores del cociente ARN/ADN en *Donax denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio, se evidenció una disminución de ambos parámetros, asociada con el aumento de la concentración del metal al que fueron expuestos, posiblemente como consecuencia del efecto tóxico del mismo. Este índice ARN/ADN ha sido considerado como indicativo del estado de la condición fisiológica en bivalvos y otros organismos (Gómez *et al.*, 1998; Bracho *et al.*, 2000; Becker *et al.* 2005), y dada la evidente disminución de este índice en el bivalvo *D. denticulatus* con respecto a la concentración del cadmio, se puede entonces inferir que el efecto tóxico de este metal es capaz, a estas concentraciones, de afectar de manera significativa el estado fisiológico de *D. denticulatus*, a medida que la dosis aumenta, produciéndose un desmejoramiento en la condición fisiológica de los organismos que merma la tasa de crecimiento de estos ejemplares.

La disminución del índice ARN/ADN en los organismos expuestos a Cd estuvo asociada a una disminución de los niveles de ARN, debido a una caída en la tasa de síntesis de estas biomoléculas. Por otro lado, aunque no se estableció diferencias significativas en los niveles de ADN, se evidenció que la exposición al metal incremento ligeramente estos valores, pudiendo estar asociado a una disminución del volumen celular, presumiblemente causado por una caída en los niveles de ARN, que pudieran estar reflejando a su vez una caída en la síntesis de proteínas asociadas con el mantenimiento del metabolismo basal.

Una disminución de la condición fisiológica producida en los ejemplares expuestos a cadmio indica el stress al que los mismos fueron sometidos, esto es consecuencia de una reducción en la actividad metabólica destinada al crecimiento, debido tal vez a la acción directa o indirecta del metal, pues se ha establecido claramente que los procesos de incorporación, metabolización y eliminación de metales trae consigo un gasto energético significativo (Viarengo *et al.*, 1988). La síntesis de muchas biomoléculas tales como glutatión, metalotioninas y proteínas con capacidad de inactivar el metal requiere de energía para su síntesis. De igual forma, todas aquellas proteínas relacionadas con actividad antioxidante del cuerpo pudieran estar activadas como consecuencia de la capacidad que presenta el cadmio y otros metales para inducir estrés oxidativo en los organismos (Nusetti *et al.*, 2001; Risso-de Faverney *et al.*, 2004).

El aumento del índice ARN/ADN, cuando los organismos son depurados, indica que *D. denticulatus* tiene una buena capacidad de recuperación, aunque los valores no llegan a alcanzar los controles, si se aprecia un aumento significativo en comparación a los no expuestos. Es posible que para la recuperación total del organismo es necesario que el período de depuración sea superior a los 21 días.

CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran que concentraciones de 1 y 2 mg/l de cadmio disminuyen el índice ARN/ADN en *D. denticulatus*, y se evidencia un efecto dosis-respuesta con respecto al tóxico utilizado. Los organismos son capaces de recuperar el índice ARN/ADN cuando son transferidos a agua sin metal, sin embargo, es necesario que su período de depuración sea mayor para que logren alcanzar valores similares a los ejemplares no expuestos al tóxico.

AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial del presente estudio a través del proyecto CI 5-1803-1097/02 y al técnico Angel Antón por la colaboración prestada durante la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER C.; BREPOHL D.; FEUCHTMAYR H.; ZOLLNER E.; SOMMER F.; CLEMMESSEN C.; SOMMER U.; BOERSMA M. 2005. Impacts of copepods on marine seston and resulting effects on *Calanus finmarchicus* RNA/DNA ratios in mesocosm experiments. *Mar. Biol.* 146(3): 531-541.
- BRACHO M.; SEGNINI M.; VIÑOLES I.; CHUNG K. S. 2000. Efectos de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) según el cociente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.* 1: 159-170.
- CANINO M.; CALDERONE. M. 1995. Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. *Fish. Bull.* 93:158-165.
- CHUNG K.; SEGNINI M.; DONALDSON. M. 1998. RNA-DNA ratio as physiological condition of rainbow trout fry fasted and fed. *Ital. J. Zool.* 65: 517-519.

- CLEMMESSEN C. 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch.* 32: 134–143.
- CLEMMESSEN C.; SANCHEZ R.; ROSSI-WONGTSCHOWSKY 1997. A regional comparison of the nutritional condition of Atlantic anchovy larvae, *Engraulos anchata*, based on RNA/DNA ratios. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45: 17- 43.
- EVARISTO E. 2007. Concentración de metalotioninas en el mejillón *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae) expuestos a cobre/cadmio y a cadmio. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 55 pp.
- GIL H.; CHUNG K. S.; LEMUS M.; ALTUVE D. 2003. Relación ARN/ADN como índice de condición fisiológica del híbrido de la cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachypomus* durante el desarrollo embrionario. *Rev. Biol. Trop.* 4: 91–96.
- GÓMEZ J.; SEGNINI M.; FUENTES M. 1998. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra* medida por la relación ARN/ADN. *Scientia (Panamá)* 13: 27–34.
- MARTINS C. 2004. Acumulación y depuración de cadmio en relación con el perfil de enlazamiento de metaloproteínas en el hepatopancreas del bivalvo *Lima scabra*. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 55 pp.
- NUSETTI O.; ESCLAPES M.; SALAZAR M.; NUSETTI S.; PULIDO S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polichaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ Contam. Toxicol.* 66: 576-581.
- RISSE-DE FAVERNEY C.; ORSINI N. SOUSA G.; RAHMANI R. 2004. Cadmium induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 69: 247-258.
- SARTRE M. 1984. Relationships between environmental factors and *Donax denticulatus*. *Bull. Mar. Sci.* 19: 217-230.
- SEGNINI M.; CHUNG K. S. 2001. Ecophysiological behavior *Caquetia kraussii* (Steinachner, 1878) (Pisces: Cichlidae) exposed to different temperatures and salinities. *Rev. Biol. Trop.* 49: 147-154.
- VIARENGO A.; MANCINELLI G.; MARTINO G.; PERTICA M.; CANESI L.; MAZZUCOTELLI A. 1988. Integrated cellular stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:65-70.
- WANG W. X. 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243: 295-309.
- WO K.; LAM P.; WU R. 1999. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod *Nassarius festivus*. *Mar. Pollut. Bull.* 39: 165-173